

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA E POTENCIAL DE
DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS
PROVENIENTES DE MEDULA ÓSSEA, TECIDO ADIPOSEO E
CORDÃO UMBILICAL DE EQUINOS

DANIELLE JAQUETA BARBERINI

Botucatu, SP
Julho - 2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA E POTENCIAL DE
DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS
PROVENIENTES DE MEDULA ÓSSEA, TECIDO ADIPOSEO E
CORDÃO UMBILICAL DE EQUINOS

DANIELLE JAQUETA BARBERINI

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária para obtenção do título de
Mestre.

Orientador: Prof. Ass. Dr. Rogério Martins
Amorim

Botucatu, SP
Julho - 2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Barberini, Danielle Jaqueta.

Caracterização imunofenotípica e potencial de diferenciação de células-tronco mesenquimais provenientes de medula óssea, tecido adiposo e cordão umbilical de equinos / Danielle Jaqueta Barberini. - Botucatu, 2013

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Rogério Martins Amorim

Capes: 50501062

1. Tecido adiposo. 2. Cordão umbilical. 3. Equino. 4. Medula óssea.

Palavras-chave: Cordão umbilical; Equinos; Medula óssea; Tecido adiposo; Terapia celular alogênica.

Nome do Autor: Danielle Jaqueta Barberini

Título: CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA E POTENCIAL DE
DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS
PROVENIENTES DE MEDULA ÓSSEA, TECIDO ADIPOSEO E CORDÃO
UMBILICAL DE EQUINOS

COMISSÃO EXAMINADORA

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

Prof. Adj. Alexandre Secorun Borges
Membro
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ-UNESP-Botucatu

Profa. Raquel Yvonne Arantes Baccarin
Membro
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ-USP-São Paulo

Data da Defesa: 15 de julho de 2013.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família:

Aos meus pais, Valdir e Claudete, por tornarem possível a realização de todos os meus sonhos, vibrarem comigo a cada conquista, por me incentivarem nos momentos de angústia, pelo amor e apoio durante toda minha vida, pelos conselhos perante as dificuldades, e por sempre iluminarem meus passos e terem orgulho de quem eu sou.

A minha irmã Fabiene, pela amizade, companheirismo, momentos de alegria, descontração e até mesmo “discussões”.

As minhas avós, Leonildes e Lourdes *in memorian*, e ao meu avô Felipe por cada oração e torcida realizados,.

Sou eternamente grata pelo carinho de vocês, amor e amizade presente em nossas vidas.

“Às vezes temos que ir para poder voltar”

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Rogério Martins Amorim, pelos seus ensinamentos, dedicação, atenção, incentivo e confiança prestados, possibilitando a concretização deste Trabalho.

A Profa. Fernanda da Cruz Landim-Alvarenga, pelos conselhos e por abrir as portas do Laboratório de cultivo celular possibilitando a realização do experimento.

As minhas grandes amigas, de perto e as que mesmo longe se fazem presentes, pelo companheirismo nas horas de diversão e também por muitas vezes enxugarem minhas lágrimas, pelos conselhos, força, paciência e por sempre me ouvirem e estarem por perto quando precisei!

Aos meus pais, meu eterno agradecimento, pelo esforço em me dar a oportunidade de realizar uma faculdade.

A toda equipe do laboratório de cultivo celular, pela amizade, trabalho em equipe, ensinamentos e pela ajuda nunca negada.

Aos funcionários da pós-graduação, pela disposição com que sempre me receberam.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Veterinária – FMVZ, pela atenção e carinho com que trataram os animais, sem o auxílio de vocês este trabalho não seria concluído.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo apoio financeiro com bolsa de Mestrado.

À FMVZ – UNESP, pela oportunidade de cursar a Pós-graduação, por ceder suas instalações e serviços para que esse trabalho pudesse ser realizado.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Vantagens e Desvantagens das principais fontes para obtenção de CTMs.....	8
---	---

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Médias percentuais da caracterização imunofenotípica das CTM-MO, CTM-TA e CTM-CU pela técnica de citometria de fluxo..... 47
- Tabela 2** - Valores percentuais individuais dos animais dos grupos CTM-MO, CTMA-TA e CTM-CU pela técnica de citometria de fluxo, para os marcadores CD 90, CD 44, CD34, CD105 e MHC II.....58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – CTMs da MO, TA e CU durante cultivo celular.....	43
Figura 2 – Potencial de diferenciação das CTMs da MO, TA e CU de equinos.....	44
Figura 3 - Expressão de marcadores de superfície celular pela técnica de citometria de fluxo das CTMs da MO, TA e CU.....	45
Figura 4 - Avaliação da expressão do MHC-II nas CTMs da MO, TA e CU pela técnica de imunocitquímica.....	46

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	1
ABSTRACT	2
CAPÍTULO 1	
INTRODUÇÃO.....	3
REVISÃO DE LITERATURA.....	5
1 Células-tronco (CT).....	5
2 Células-tronco mesenquimais (CTMs).....	6
2.1 Comparação das fontes para aquisição das CTMs.....	7
2.2 Terapia Autóloga X Alogênica.....	9
2.3 Utilização das CTMs.....	11
2.3.1 Uso de CTMs em medicina equina.....	12
CAPÍTULO 2 – Trabalho Científico	14
CAPÍTULO 3	
CONCLUSÕES GERAIS	48
BIBLIOGRAFIA	49
Anexos.....	58

BARBERINI, D.J. **Caracterização imunofenotípica e potencial de diferenciação de células-tronco mesenquimais provenientes de medula óssea, tecido adiposo e cordão umbilical de equinos**. Botucatu, 2013. 80 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Estudos com células-tronco mesenquimais (CTMs) estão em crescente avanço, baseando-se em evidências das suas propriedades imunomodulatórias, anti-inflamatórias e de regeneração dos tecidos. Porém, ainda não há consenso sobre qual a melhor fonte de obtenção das CTMs de equinos. O objetivo deste estudo foi avaliar o cultivo, a caracterização imunofenotípica e o potencial de diferenciação de CTMs provenientes da medula óssea (CTM-MO), tecido adiposo (CTM-TA) e cordão umbilical (CTM-CU) de equinos, a fim de se definir qual é a melhor fonte para compor um banco de células visando a terapia alogênica. As CTM-MO, CTM-TA e CTM-CU foram cultivadas *in vitro* e avaliadas quanto aos marcadores CD105, CD44, CD34, CD90 e MHC-II através da citometria de fluxo, e o MHC-II também pelo método de imunocitoquímica. Adicionalmente, as CTMs foram avaliadas *in vitro* quanto ao potencial de diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica. A coleta e cultivo das CTM-MO, CTM-TA e CTM-CU se mostraram viáveis, e foram capazes de se diferenciar em linhagem osteogênica, adipogênica e condrogênica. As CTMs revelaram elevada expressão dos marcadores CD105, CD44 e CD90 e baixa ou ausência de expressão dos marcadores MHC-II e CD34. O MHC-II não foi expressado pela técnica de imunocitoquímica em nenhuma das CTMs estudadas. A MO, TA e CU são fontes viáveis para obtenção de CTMs de equinos, sendo confirmada as características imunofenotípicas e de multipotencialidade. No entanto, as CTM-MO e CTM-TA apresentaram melhor caracterização imunofenotípica, *in vitro*, quando comparadas com as CTM-CU.

Palavras-chave: terapia celular alogênica; equinos; células-tronco mesenquimais; medula óssea; tecido adiposo; cordão umbilical

BARBERINI, D.J. **Immunophenotypic characterization and potential of differentiation of mesenchymal stem cells from equine bone marrow, adipose tissue and umbilical cord.** Botucatu, 2013. 80 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista

ABSTRACT

Studies with mesenchymal stem cells (MSCs) are increasing due to their immunomodulatory and anti-inflammatory properties, and tissue regeneration. However, there is still no agreement about the best source of equine MSCs. The aim of this study was to evaluate cell culture, immunophenotypic characterization and potential of differentiation of equine MSCs from bone marrow (BM-MSC), adipose tissue (AT-MSC) and umbilical cord (UC-MSC), in order to define which is the best source for a cell bank aiming allogeneic therapy. The BM-MSC, AT-MSC and UC-MSC were cultured *in vitro* and assessed for CD105, CD44, CD34, CD90 and MHC-II markers by flow cytometry, and MHC-II also by immunocytochemistry. Additionally, MSCs were evaluated *in vitro* for osteogenic, adipogenic and chondrogenic potential. The harvest procedure and cell culture of BM-MSC, AT-MSC and UC-MSC were feasible and the MSCs were able to differentiate into osteogenic, adipogenic and chondrogenic lineages. MSCs showed high expression for CD105, CD44 and CD90 and low or negative expression for CD34 and MHC-II. The MHC-II was not expressed by immunocytochemistry technique in any of the MSCs studied. The BM, AT and UC are feasible sources for harvesting equine MSCs, and their immunophenotypic and multipotentiality characteristics were confirmed. However, BM-MSC and AT-MSC showed better *in vitro* immunophenotypic characterization when compared to UC-MSC.

Key words: allogeneic cell therapy, equine, mesenchymal stem cells, bone marrow, adipose tissue, umbilical cord

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

O Brasil possui o terceiro maior rebanho de equinos do mundo, gerando 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos, e o agronegócio relacionado com a espécie equina resulta em um faturamento anual de R\$ 7,3 bilhões (GUERRA; MEDEIROS, 2006). Pesquisas envolvendo novas modalidades de terapia para esses animais, como as pesquisas com células-tronco mesenquimais (CTMs), estão em crescente avanço na última década (SMITH et al., 2003; KOERNER et al., 2006; ALVES et al., 2009; DE SCHAUWER et al., 2010; BURK et al., 2013a) sendo estudados o potencial de diferenciação e caracterização das células-tronco mesenquimais, e sua possível aplicação terapêutica em enfermidades neurológicas (MAIA et al., 2012), músculoesqueléticas (GUTIERREZ-NIBEYRO, 2011), dentre outras em equinos.

Diversas fontes estão sendo estudadas para obtenção das CTMs, tendo como objetivo alternativas que forneçam grande número de células, com capacidade multi ou pluripotente, capacidade de resistir a congelação, características imunossupressoras e sem danos aos animais.

A medula óssea é uma das fontes mais estudadas e utilizadas para a obtenção de células-tronco adultas, sendo possível encontrar as células-tronco hematopoiéticas (CTH) e as mesenquimais (CTMs) (SCHWINDT et al., 2005). No entanto, o tecido adiposo também é uma abundante e acessível fonte de CTMs capaz de fornecer um grande número de células necessárias para a utilização em terapias celulares (GIMBLE; GUILAK, 2003).

Adicionalmente, as células da membrana amniótica (LANGE-CONSIGLIO et al., 2013) e do cordão umbilical (tecido, sangue e geléia de Wharton), são uma fonte promissora para obtenção de CTMs, pois são menos imunogênicas, sua coleta não é invasiva e podem se diferenciar em células neurais e endoteliais (ROGERS; CASPER, 2004; CRUZ et al., 2009; SENEGAGLIA et al., 2009).

Os princípios da terapia com CTMs são baseados em evidências que sugerem que estas células melhoram a regeneração e função dos tecidos pela

habilidade de auto renovação (TAYLOR et al., 2007), de diferenciação em linhagens mesodermas, neuroectodermas e endodermas (CHEN Y et al., 2008), síntese de fatores de crescimento e liberação de citocinas anti-inflamatórias e imunomodulatórias (NÖTH et al., 2010; BORJESSON; PERONI, 2011; BURK et al., 2013a).

A ausência da expressão do complexo de histocompatibilidade principal classe II (MHC-II) na superfície celular é uma importante característica imunomodulatória, pois fornece às CTMs o potencial de escapar do reconhecimento das células T (RYAN et al., 2005), tornando-as viáveis para a criação de um banco de células para serem utilizadas em terapias alogênicas (BORJESSON; PERONI, 2011; CARRADE et al., 2011a; CARRADE et al., 2011b; SOLE et al., 2012).

A eficácia e segurança dos tratamentos e as características básicas das CTMs ainda não são totalmente esclarecidas. As CTMs em muitos casos são utilizadas empiricamente para tratamentos, não se obtendo total certeza de que os resultados conseguidos são, de fato, devido às CTMs e não a outro tipo de célula ou fatores administrados simultaneamente (KOCH et al., 2008; SCHNABEL et al., 2009). Portanto, é crucial a definição correta através de testes de caracterização apropriados antes de se classificar um tipo celular específico como uma célula tronco. Infelizmente, não há consenso sobre os critérios de caracterização para CTMs de origem animal, especificamente em equinos (De SCHAUWER et al., 2010).

Tendo em vista que ainda não está totalmente estabelecida a melhor fonte tecidual para obtenção das CTMs, e que apenas uma pequena parcela das pesquisas visa à aplicação clínica destas células em modelos animais, principalmente em equinos, o objetivo desta pesquisa foi caracterizar imunofenotipicamente e avaliar o potencial de diferenciação celular de diversas fontes (medula óssea, tecido adiposo e cordão umbilical) para obtenção de CTMs em equinos, a fim de se definir qual é a melhor fonte para compor um banco de células visando a terapia alogênica.

REVISÃO DE LITERATURA

1 Células-Tronco (CT)

As células-tronco (CT) são células indiferenciadas e não especializadas, capazes de se auto replicar dando origem a uma grande população de células semelhantes, e de se diferenciar em células especializadas de múltiplas linhagens. Para isso, elas utilizam dois tipos de divisão celular: divisão simétrica (cada CT origina duas células-filha idênticas) e assimétrica (cada CT origina uma célula filha idêntica, e uma célula progenitora) (TAYLOR et al., 2007; KOCH et al., 2008; BYDLOWSKI et al., 2009; DAHLGREN, 2009; GATTEGNO-HO et al., 2012).

Estas células podem ser classificadas segundo sua potencialidade (habilidade para diferenciação) em totipotente (capacidade de criar um organismo inteiro), pluripotente (capacidade de se diferenciar em células das três camadas germinativas: mesoderma, endoderma e ectoderma), multipotente (capacidade de diferenciação a um número limitado de linhagens) e unipotentes (KOCH et al., 2008), podendo tornar-se precursoras de células neurais, ósseas, hepáticas, além dos três tipos de músculo: cardíaco, esquelético e liso (SCHWINDT et al., 2005).

Também podem ser classificadas de acordo com sua origem em embrionárias (encontradas nos embriões) e adultas (extraídas dos diversos tecidos, tais como medula óssea, tecido adiposo e cordão umbilical) (SCHWINDT et al., 2005; DAHLGREN, 2009). As células-tronco embrionárias exibem ilimitada capacidade de renovação e pluripotência in vitro, porém a predisposição destas células em formar teratomas dificulta sua possível aplicação clínica (NÖTH et al., 2010; GATTEGNO-HO et al., 2012).

Por outro lado, as células-tronco adultas, encontradas em tecidos adultos e responsáveis pela manutenção tecidual normal, tem sua utilização menos controversa, pois não envolve a clonagem e são menos prováveis em formar tumores (pelo seu potencial de diferenciação limitado - multipotentes) (LEUNG et al., 2006; GATTEGNO-HO et al., 2012).

2 Células-Tronco Mesenquimais (CTMs)

As células-tronco mesenquimais (CTMs) são células progenitoras multipotentes, não hematopoiéticas, facilmente isoladas a partir de diversos tecidos adultos, e caracterizadas por sua extensa habilidade proliferativa e de se diferenciar *in vitro* em diversas linhagens mesenquimais em resposta a um estímulo apropriado, incluindo osteoblastos, adipócitos, condrócitos, tenócitos e miócitos (CHAMBERLAIN et al., 2007; CHEN F et al., 2007; DAHLGREN, 2009; NÖTH et al., 2010), já sendo demonstrado seu uso em cartilagem, osso e tendão de equinos (SMITH et al., 2003; TAYLOR et al., 2007). Adicionalmente, apesar de controverso, as CTMs também podem se diferenciar em resposta a estímulos específicos, em células de outras linhagens germinativas como neurônios, células da glia e hepatócitos (CHEN Y et al., 2008; WU; TAO, 2012).

O fato das CTMs poderem se diferenciar em diferentes tipos celulares *in vitro*, sua relativa facilidade de expansão em cultura, características imunológicas, secreção de citocinas que modulam a resposta inflamatória, reestabelecem o suprimento vascular e reparam o tecido lesionado, fazem das CTMs uma fonte promissora de CT para a terapia celular (CHAMBERLAIN et al., 2007; MONTEIRO et al., 2010).

Para a caracterização das CTMs, alguns marcadores de superfície (*Clusters Designation – CD*) tem sido utilizados e avaliados segundo sua expressão ou não, como por exemplo, os marcadores positivos CD29 (integrina), CD44, CD73, CD90 (Thy-1), CD105 (TGF- β), CD166 (ALCAM) e MHC-I; e marcadores negativos como o CD14, CD34, CD45 e MHC-II (Le BLANC et al., 2003; RYAN et al., 2005; KERN et al., 2006; CHEN F et al., 2007; De SCHAUWER et al., 2010). Ainda não há um único marcador ou uma combinação de marcadores que se mostram específicos e exclusivos das CTMs, sendo que estes são encontrados também em outros tipos celulares (CHEN F et al., 2007; BYDLOWSKI et al., 2009; MONTEIRO et al., 2010).

Em humanos há critérios mínimos estabelecidos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular para a caracterização das CTMs, elas devem ser aderentes ao plástico, expressarem os marcadores de superfície CD105, CD73 e CD90, e não expressarem os marcadores CD45, CD34, CD14 ou

CD11b, CD79 α ou CD19 e HLA-DR, e ainda, se diferenciarem em osteoblastos, adipócitos e condroblastos *in vitro* (DOMINICI et al., 2006).

No entanto, a imunofenotipagem em equinos é dificultada pela falta de marcadores específicos, disponibilidade limitada de anticorpos monoclonais anti-cavalo (De SCHAUWER et al., 2010; BORJESSON; PERONI, 2011; BURK et al., 2013b) e evidências que alguns marcadores de outras espécies não apresentam reação cruzada com a espécie equina (CARVALHO et al., 2009).

Por causa destas limitações, a aderência ao plástico, a diferenciação nas linhagens osteogênica, condrogênica e adipogênica, a expressão dos CD90, CD44, a não expressão do CD34 (CARVALHO et al., 2009; MAIA et al., 2013), ou segundo De Schauwer et al. (2010) a expressão dos CD 29, CD 44 e CD 90, e não expressão dos CD14, CD79 α e MHC-II, são as propriedades disponíveis mais confiáveis para a caracterização das CTMs equinas.

Sendo assim, para conseguir resultados promissores na terapia com células-tronco em cavalos, avanços devem ser realizados na caracterização das células-tronco equinas (BURK et al., 2013b).

2.1 Comparação das fontes para a aquisição das CTMs

As CTMs existem em todos os órgãos e tecidos pós-natais (BYDLOWSKI et al., 2009), sendo comprovadas sua aquisição de cérebro, baço, fígado, rim, pulmão, medula óssea, músculo, timo e pâncreas de camundongos (MEIRELLES et al., 2006).

Diversas fontes podem ser utilizadas para obtenção de CTMs em equinos, como sangue do cordão umbilical (REED; JOHNSON, 2008; BARTHOLOMEW et al., 2009), tecido do cordão umbilical (VIDAL et al., 2012), subendotélio da veia umbilical e geléia de Wharton (TROYER; WEISS, 2008), tecido adiposo (CARVALHO et al., 2009; MAMBELLI et al., 2009), medula óssea (COLLEONI et al., 2009; RANERA et al., 2012; MAIA et al., 2013), membrana amniótica (LANGE-CONSIGLIO et al., 2013), sangue periférico (KOERNER et al., 2006) e tendão (BURK et al., 2013b).

Atualmente, a medula óssea e tecido adiposo são as fontes mais comuns de obtenção de CTMs (KOERNER et al., 2006; RICHARDSON et al., 2007; ALVES et al., 2009; GUTIERREZ-NIBEYRO, 2011).

As vantagens e desvantagens das principais fontes de CTMs podem ser visualizadas no Quadro 1.

QUADRO 1

Vantagens e Desvantagens das principais fontes para obtenção de CTMs

FONTE	VANTAGENS	DESVANTAGENS
Medula óssea (MO)	- facilidade de coleta (RICHARDSON et al., 2007) - coleta mais rápida, causa menos desconforto ao animal e o resultado estético é melhor (ALVES et al., 2009).	- dificuldade e risco da coleta (BREMS; JEBE, 2008; LANGE-CONSIGLIO et al., 2013), o que requer um profissional treinado (ALVES et al., 2009). - pode ser um processo doloroso por ser um procedimento invasivo (DAHLGREN, 2009; LANGE-CONSIGLIO et al., 2013) - potencial de diferenciação limitado (RICHARDSON et al., 2007) -proliferação diminui de acordo com o número de passagens <i>in vitro</i> (VIDAL et al., 2012; LANGE-CONSIGLIO et al., 2013) - não se proliferam após confluência de 100%; não se diferenciam em células da glia; e possuem menor aderência, devido sua heterogenicidade celular (LANGE-CONSIGLIO et al., 2013) - diferenciação condrogênica ruim (BURK et al., 2013a)
Tecido Adiposo (TA)	- facilidade de coleta (RICHARDSON et al., 2007; BREMS; JEBE, 2008). - CTMs em maior número e com melhor qualidade de proliferação do que MO (BREMS; JEBE, 2008; MAMBELLI et al., 2009; BORJESSON; PERONI, 2011)	- maior lesão no local da coleta do que MO (RICHARDSON et al., 2007)
Cordão umbilical (Sangue-SCU, Tecido-TCU e Geléia de Wharton-GW)	- SCU: facilidade de coleta sem danos ao potro e a égua (RICHARDSON et al., 2007; BARTHOLOMEW et al., 2009); pode ter maior multipotencialidade (RICHARDSON et al., 2007); expressam marcadores embrionários e diferenciam-se em linhagem hepatogênica e muscular (REED; JOHNSON, 2008); melhor diferenciação condrogênica (BURK et al., 2013a) - TCU: células em maior número e com alta capacidade proliferativa (BORJESSON; PERONI, 2011; BURK et al., 2013a) -GW: facilidade de isolamento e expansão <i>in vitro</i>; diferenciação em cardiomiócitos, células do músculo esquelético e células neurais (WANG et al., 2004; TROYER; WEISS, 2008)	-SCU: Pouco número de células (RICHARDSON et al., 2007); não se diferencia em adipócitos (REED; JOHNSON, 2008); diferenciação osteogênica ruim (BURK et al., 2013a); dificuldade de isolamento, atingindo no máximo 63% das amostras (KERN et al., 2006; SECCO et al., 2008; TROYER; WEISS, 2008).

2.2 Terapia Autóloga X Alogênica

Normalmente, as CTMs são obtidas dos próprios pacientes (autólogas), pois não resultam em nenhum efeito deletério significativo durante o processo da implantação (como por exemplo, formação de tumores no local) (RICHARDSON et al., 2007). No entanto, o uso de células autólogas para o tratamento possui limitações, como sua utilização em lesões agudas (pois a expansão das CTMs através da cultura demora de 10 a 21 dias) (CARRADE et al., 2011a) e em pacientes idosos, devido há diminuição na proliferação, no potencial de diferenciação e na quantidade de CTMs nestes pacientes (CHEN F et al., 2007).

Estudos realizados em diversas espécies sugerem que o uso alogênico (provenientes de um doador) de CTMs para aplicações clínicas é possível, indiferentemente do tecido de origem, pois estas células apresentam baixa imunogenicidade *in vitro*, e podem escapar do processo normal de reconhecimento de aloantígenos (RYAN et al., 2005; LEUNG et al., 2006; CARRADE et al., 2011b).

Um mecanismo pelo qual a terapia alogênica mostra-se promissora, não induzindo respostas imunes significativas (STEWART, 2011; SOLE et al., 2012), é a diferente expressão do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) na superfície celular. As CTMs expressam MHC-I, mas não expressam o MHC-II (LE BLANC et al., 2003; NIEMEYER et al., 2007; BORJESSON; PERONI, 2011). A expressão do MHC-I pelas CTMs é importante pois a expressão protege as CTMs de certos mecanismos de eliminação das células NK (RYAN et al., 2005). A não expressão do MHC-II impede que o organismo que recebe células indiferenciadas, as reconheça como não próprias, e realize sua rejeição (MONTEIRO et al., 2010). Esta característica já foi comprovada em CTMs derivadas do tecido do cordão umbilical (CARRADE et al., 2011b), da MO e da membrana amniótica, no entanto, esta última fonte começa a expressar o MHC-II na 5ª passagem (LANGE-CONSIGLIO et al., 2013), tornando seu uso incerto para as terapias alogênicas deste momento em diante.

Em humanos é descrito o fenótipo imune das CTMs como: MHC I+, MHC-II-, CD40-, CD80- e CD86-, sendo não imunogênico, o que possivelmente

torna o transplante alogênico sem imunossupressão viável (CHAMBERLAIN et al., 2007; BYDLOWSKI et al., 2009).

O tratamento alogênico em cavalos oferece a vantagem de um tratamento para lesões agudas, pois permitem um tratamento rápido, e a utilização de uma população celular mais homogênea, com capacidade de diferenciação comprovada, e sem o período de defasagem associado com o isolamento e expansão de CTMs autólogas (BORJESSON; PERONI, 2011; CARRADE et al., 2011a; CARRADE et al., 2011b), o que viabiliza a utilização de um banco de células a partir de cavalos doadores (PERONI; BORJESSON, 2011; BURK et al., 2013a).

Diversos cavalos já foram tratados com aplicações intralesionais e intravenosas de CTMs alogênicas da MO para desordens como osteocondrose, osteoartrite e tendinite, com resultado positivo e sem reações imunes (PERONI; BORJESSON, 2011).

Guest et al. (2010) compararam aplicações alogênicas de CTMs da MO e células-tronco embrionárias em diferentes áreas do tendão flexor digital superficial de equinos, sendo que nenhuma das fontes produziu sinais de resposta imune ou formação de tumores.

Outro estudo avaliando a utilização de CTMs alogênicas em equinos foi realizado por Sole et al. (2012), utilizando CTMs provenientes da medula óssea na perfusão regional intravenosa e intra-arterial, sem reação imune em ambas as técnicas utilizadas.

Carrade et al. (2011a) verificaram através da injeção de CTMs autólogas e alogênicas de sangue e tecido do cordão umbilical, pela via intra-articular (articulação hígida), as respostas locais e sistêmicas de 16 cavalos. Houve uma resposta inflamatória local, de curto prazo, auto limitante, sem claudicação ou tumefação notável, e sem diferença entre o grau e o tipo de inflamação desencadeada por CTMs tanto autólogas quanto alogênicas. Quanto a resposta sistêmica, a aplicação alogênica não desencadeou nenhuma reação imune.

Em outro estudo, Carrade et al. (2011b) utilizaram CTMs do tecido do cordão umbilical alogênicas e autólogas e inocularam por via intradérmica em cavalos. Não houve diferença entre os métodos, mesmo após a segunda

aplicação, sendo que nenhuma estimulou ou suprimiu a proliferação basal de células T.

Em humanos, Yang et al. (2010) trataram 114 pacientes sofrendo de diversas enfermidades (atrofia sistêmica múltipla, ataxia, paraplegia, esclerose múltipla, esclerose lateral amiotrófica, entre outras) com CTMs alogênicas do sangue do cordão umbilical. Foram realizadas 4 a 5 aplicações intratecal e intravenosa, sendo que nenhum efeito adverso (hematológico, bioquímico e imunológico) foi observado durante o momento da inoculação nem após o período de acompanhamento, que chegou a 4 anos.

Ainda não há relatos de reações imunogênicas (TAYLOR et al., 2007; GUEST et al., 2008; BURK et al., 2013b), mas Chen F et al. (2007) relataram que a utilização de CTMs alogênicas para reparação tecidual pode acarretar riscos de rejeição imunológica e reação alogênica pelo hospedeiro.

2.3 Utilização de CTMs

A terapia celular é baseada no conceito de que uma população celular multi ou pluripotente no local da injúria tecidual pode proliferar, diferenciar e se organizar de maneira que resulte em um tecido normal, tanto estruturalmente quanto funcionalmente (BURK et al., 2013b).

As CTMs exibem um potencial anti-inflamatório e imunomodulatório através da interação célula-célula (com células imunes como linfócitos B e T, células *natural killers* e células dendríticas), da secreção de fatores solúveis no ambiente local (prostaglandina E2, interleucina-4, IL-6, IL-10, fator de transformação do crescimento β (TGF- β), fator de crescimento hepático (HGF), IFN- γ , entre outros) e induzem tolerância imune aos transplantes alogênicos. Além disso, elas possuem um perfil de fatores tróficos bioativos e moléculas de adesão que inibem a formação de cicatriz, apoptose, aumentam a angiogênese, e estimulam células progenitoras intrínsecas (RYAN et al., 2005; AGGARWAL; PITTENGER, 2005; CHAMBERLAIN et al., 2007; MONTEIRO et al., 2010; BORJESSON; PERONI, 2011; CARRADE et al., 2011a; PERONI; BORJESSON, 2011; BURK et al., 2013b).

Na medicina veterinária em geral, estudos estão sendo realizados em doenças sanguíneas, hepáticas, cardíacas, entre outras, pelo fato das CTMs

originarem osso, cartilagem, músculo, estroma medular, tendão, gordura e outros tecidos conjuntivos (GATTEGNO-HO et al., 2012).

Deve-se salientar que o tratamento com CTMs não substitui ou acelera a reabilitação padrão, sendo um tratamento adicional para otimizar o resultado (BURK et al., 2013b).

2.3.1 Uso de CTMs em medicina equina

A utilização desta terapia na medicina equina está em intensa expansão, pois fornece aos veterinários uma opção para o tratamento de condições musculoesqueléticas de difícil regeneração, como tendão, ligamentos, menisco e cartilagem (CLEGG; PINCHBECK, 2011; GUTIERREZ-NIBEYRO, 2011; STEWART, 2011).

No momento, a MO e o TA são as fontes de CTMs mais comumente utilizadas para a regeneração musculoesquelética em cavalos (GUTIERREZ-NIBEYRO, 2011; BURK et al., 2013a), sendo relatados em tendinopatias, osteoartrite, laminite, cistos subcondrais, injúria de menisco, tendões e ligamentos (RICHARDSON et al., 2007; TAYLOR et al., 2007; BREMS; JEBE, 2008; BORJESSON; PERONI, 2011; CLEGG; PINCHBECK, 2011; STEWART, 2011; BURK et al., 2013b).

Para as lesões musculoesqueléticas, o tratamento com CTMs derivadas da MO resultaram no retorno da função em 70% dos casos ortopédicos (articulações) e 86% dos casos de tecidos moles (ligamentos, tendões), confirmando bons resultados clínicos para esta finalidade (FERRIS et al., 2009).

A aplicação das CTMs da MO parece melhorar a cicatrização tendínea, demonstrada por Smith et al. (2003), pois estas células possuem o potencial de produzir matriz tendínea, ao invés de tecido cicatricial pobremente funcional. E consequentemente, ocorre diminuição na reincidência de injúrias (BURK et al., 2013b), sendo demonstrado a taxa de reinjúria dos cavalos após a inoculação de CTMs de 27,4%, mostrando que o tratamento é seguro e eficaz (GODWIN et al., 2012).

A utilização de CTMs para osteoartrite (OA) foi relatada por Frisbie e Stewart (2011), que sugeriram que os efeitos benéficos (suporte ao

metabolismo dos condrócitos) são mediados por fatores solúveis ou por efeitos em outros tecidos articulares, pois elas não permaneceram no local inoculado.

Adicionalmente, para a regeneração de cartilagem articular em equinos, a melhor fonte seriam células da própria cartilagem, pois as provenientes da MO resultam em hipertrofia da cartilagem após a indução condrogênica, podendo gerar mineralização da cartilagem e, consequentemente, comprometer sua reparação (MCCARTHY et al., 2012).

Para defeitos condrais, as CTMs da MO melhoraram a qualidade do tecido de reparação em todas as articulações tratadas, fornecendo melhora a longo prazo (MCILWRAITH et al., 2010).

A utilização de CTMs podem também desempenhar um papel importante na regulação de doenças inflamatórias do sistema nervoso central, embora as suas interações com a barreira hematoencefálica não sejam completamente elucidadas (PERONI; BORJESSON, 2011).

Carstanjen et al. (2006) utilizaram CTMs para o reparo de defeito no palato mole de equino, inoculando as CTMs da MO próximo a área de sutura após a cirurgia corretiva, verificando que as células se organizaram de maneira similar as células nativas do palato mole, indicando sucesso no enxerto.

Outra possível utilização das CTMs seria no tratamento de feridas crônicas com resposta inflamatória aberrante e hiperplástica, tais como as observadas com tecido de granulação exuberante em cavalos (PERONI; BORJESSON, 2011).

CAPÍTULO 2

TRABALHO CIENTÍFICO

Trabalho a ser enviado para a revista *Stem Cell Research & Therapy*.

Células-tronco mesenquimais provenientes de medula óssea, tecido adiposo e cordão umbilical de equinos: caracterização imunofenotípica e potencial de diferenciação

Danielle Jaqueta Barberini¹, Natália Pereira Paiva Freitas¹, Mariana Sartori Magnoni³, Leandro Maia¹, Amanda Jerônimo Listoni², Marta Cristina Heckler¹, Mateus Jose Sudano⁴, Marjorie Assis Golim³, Fernanda da Cruz Landim-Alvarenga⁴, Rogério Martins Amorim^{1§}

¹Departamento de Clínica Veterinária – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu – SP, Brasil

²Biologia Geral e Aplicada – Instituto de Biociências - UNESP – Botucatu - SP, Brasil

³Hemocentro de Botucatu– Faculdade de Medicina de Botucatu — UNESP – SP, Brasil

⁴Departamento de Radiologia e Reprodução Animal - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu – SP, Brasil

[§]Autor para correspondência

Endereços de email:

DJB: daniellebarberini@yahoo.com.br

NPPF: netfreitas7@yahoo.com.br

MSM: msartori_unesp@yahoo.com.br

LM: leandromaia@fmvz.unesp.br

AJL: amandajeronimo@ibb.unesp.br

MCH: m_cth@yahoo.com.br

MJS: mateusjsudano@yahoo.com.br

MAG: marjorie_unesp@yahoo.com.br

FCLA: fernanda@fmvz.unesp.br

RMA: rmamorim@fmvz.unesp.br

Resumo

Introdução

Estudos com células-tronco mesenquimais (CTMs) estão em crescente avanço, baseando-se nas propriedades imunomodulatórias, anti-inflamatórias e de regeneração dos tecidos. No entanto, ainda não há consenso sobre a melhor fonte de obtenção das CTMs de equinos para a composição de um banco de células para terapia alogênica. Este estudo teve como objetivo a avaliação do cultivo, a caracterização imunofenotípica e o potencial de diferenciação de CTMs provenientes da medula óssea (CTM-MO), tecido adiposo (CTM-TA) e cordão umbilical (CTM-CU) de equinos, a fim de se definir qual é a melhor fonte para compor um banco de células visando à terapia alogênica.

Métodos

As CTMs da MO, TA e CU foram cultivadas e avaliadas *in vitro* quanto ao potencial de diferenciação osteogênico, adipogênico e condrogênico.

Adicionalmente avaliou-se a expressão dos marcadores CD105, CD44, CD34, CD90, MHC-II através de citometria de fluxo, e o MHC-II também pelo método de imunocitoquímica. Para interpretação dos resultados da citometria de fluxo, foi realizada análise estatística através da ANOVA.

Resultados

A coleta e cultivo das CTMs da MO, TA e CU se mostraram viáveis, com a média de crescimento celular até a terceira passagem de 25 dias para CTM-MO, 15 dias para CTM-TA e 26 dias para CTM-CU. As CTMs de todas as fontes foram capazes de se diferenciar em linhagem osteogênica (após 10 dias para CTM-MO e CTM-TA e 15 dias para CTM-CU), adipogênica (após oito dias para CTM-MO e CTM-TA e 15 dias para CTM-CU) e condrogênica (após 21 dias para CTM-MO, CTM-TA e CTM-CU). As CTMs revelaram elevada expressão dos marcadores CD105, CD44 e CD90 e baixa ou ausência de expressão dos marcadores MHC-II e CD34. A análise imunocitoquímica não revelou expressão do MHC-II.

Conclusões

A MO, TA e CU de equinos são fontes viáveis para obtenção de CTMs, sendo confirmadas suas características imunofenotípicas e de multipotencialidade. Devido à baixa expressão do MHC-II pelas CTMs, todas as fontes podem ser utilizadas em estudos clínicos envolvendo terapia alogênica em equinos. No entanto, as CTM-MO e CTM-TA apresentaram melhores resultados na caracterização imunofenotípica, destacando-se como as melhores fontes de obtenção de CTMs.

Palavras-chave: terapia celular alogênica; equinos; células-tronco mesenquimais; medula óssea; tecido adiposo; cordão umbilical

Introdução

As células-tronco mesenquimais (CTMs) são células progenitoras multipotentes, não hematopoiéticas, facilmente isoladas a partir de diversos tecidos adultos, e caracterizadas por sua extensa habilidade proliferativa e de se diferenciar *in vitro* em diversas linhagens mesenquimais em resposta a um estímulo apropriado, incluindo osteoblastos, adipócitos, condrócitos, tenócitos e miócitos

A identificação das CTMs equinas é realizada principalmente pela capacidade de aderência ao plástico e de se diferenciarem em múltiplas linhagens

necessário para o isolamento e expansão de CTMs autólogas, e por permitir a utilização de uma população celular mais homogênea com capacidade de diferenciação comprovada

Delineamento experimental

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizados dez equinos mestiços, de ambos os sexos, com idade entre seis e 13 anos, e clinicamente sadios, divididos aleatoriamente para a colheita da medula óssea e tecido adiposo. Para a obtenção do cordão umbilical, foram coletadas duas amostras provenientes de dois partos e quatro amostras provenientes de matadouro de equinos.

Coleta e isolamento das células-tronco mesenquimais

Medula óssea

A coleta e isolamento de CTM-MO foram realizadas através da punção aspirativa da medula óssea conforme a metodologia descrita por Maia et al.

USA), seguida de nova centrifugação a 340G por 40 minutos. Com a obtenção das células mononucleares, foi acrescido o meio DMEN baixa glicose/F12 na proporção de 1:1 e a amostra centrifugada duas vezes a 340G por 10 minutos. As células foram cultivadas em garrafas de 25cm² (Sarstedt, USA) contendo meio com 80% de DMEN baixa glicose/F12 na proporção de 1:1, 20% soro fetal bovino (Invitrogen, USA), 1% de penicilina/estreptomicina (Invitrogen, USA) e 1,2% de anfotericina B (Invitrogen, USA), em estufa a 37°C em atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% CO₂. O meio de cultura foi trocado aproximadamente a cada 3 dias.

Tecido adiposo

A coleta do tecido adiposo foi realizada na região acima do músculo glúteo dorsal (base da cauda) conforme Carvalho et al.

Cordão umbilical

A amostra de cordão umbilical foi lavada três vezes em HBSS/penicilina e dissecada separando veia e artérias. O tecido do cordão foi fragmentado e colocado em solução de collagenase tipo 1 (Invitrogen, USA) a 0,04% a 37°C por 60 minutos e processado conforme descrito para o tecido adiposo, porém utilizou-se meio contendo DMEM alta glicose (Invitrogen, USA), como descrito por Corradetti et al.

novamente no meio de cultura, sendo esse volume dividido em duas garrafas. As células foram cultivadas sob as mesmas condições descritas anteriormente.

Diferenciação osteogênica, condrogênica e adipogênica das CTMs

Durante a terceira passagem (P3), amostras de CTM-MO, CTM-TA e CTM-CU foram acondicionados em placas de 6 Wells (Sarstedt, USA) em triplicatas, para diferenciação osteogênica e adipogênica, e incubadas em estufa a 37°C em atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% CO₂. Após confluência de 80%, o meio de manutenção foi removido e o meio de diferenciação Stempro adipogenesis e Stempro osteogenesis (Invitrogen, USA) foi adicionado aos cultivos. O meio foi trocado a cada 3 dias, e a diferenciação em tecido adiposo foi confirmada pela deposição de gotículas de gordura no citoplasma pela coloração Oil Red 0,5% (Sigma-Aldrich Corp, USA). A diferenciação em tecido ósseo foi confirmada pela coloração positiva da matriz de cálcio extracelular pelo corante Alizarin Red 2% (Sigma-Aldrich Corp, USA).

Para a diferenciação condrogênica, um *pellet* de CTMs foi cultivado em um tubo Falcon e incubadas em estufa a 37°C em atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% CO₂. Após dois dias o meio de manutenção foi removido, e adicionado o meio de diferenciação Stempro chondrogenesis (Invitrogen, USA), com troca a cada 3 dias. Para a confirmação da diferenciação condrogênica, os *pellets* foram corados com Alcian Blue (ph=2,5) e Azul de Toluidina (ph=1) para identificar proteoglicanos.

Caracterização das CTMs

Citometria de fluxo

A análise imunofenotípica das CTM-MO, CTM-TA e CTM-CU foi realizada na P3 com o citômetro de fluxo FACS Calibur (BD, Franklin Lakes, NJ, USA), utilizando os anticorpos mouse anti-rat CD90-FITC (clone OX7, Caltag Laboratories, USA), mouse anti-human CD34-FITC (clone 581, BD, USA), mouse anti-human CD105-FITC (clone SN6, Abcam, FL, USA), mouse anti-horse CD44 (clone CVS18, abD Serotec, UK) e mouse anti-horse MHC class II monomorphic (clone CVS20, abD Serotec, UK). Para os marcadores primários não conjugados foi utilizado o anticorpo secundário goat anti-mouse IgG-FITC (abD Serotec, UK). Os protocolos utilizados foram os descritos pelos fabricantes.

Imunocitoquímica para MHC-II

Amostras em P3 foram acondicionadas em placas de 24 “wells” (Sarstedt, USA). Após confluência de 80%, as células foram fixadas e permeabilizadas com Cytotfix/Cytoperm™ (BD, USA), sendo em seguida conduzido o bloqueio da peroxidase endógena por 20 minutos. Após esse período as amostras foram incubadas por uma hora em solução de leite em pó a 3% para o bloqueio de proteínas inespecíficas. Em seguida, o anticorpo primário mouse anti-horse MHC class II monomorphic (clone CVS20, abD Serotec, UK) e o controle negativo IgG anti mouse (Dako Cytomation, DNK) foram incubados por 18 horas a 4°C, no escuro. Os anticorpos primários foram detectados por incubação no sistema de polímeros HiDef HRP mouse/rabbit

Polymer Detection System (Cell Marque, CA, USA). A revelação da reação foi conduzida utilizando a solução de substrato cromogênico DAB (Dako Cytomation, DNK) por 5 minutos, seguida de contracoloração com Hematoxilina de Harris (Merck, BRA) por 1 minuto. A avaliação da reação foi realizada em microscópio de luz invertido (Leica Microsystems, GER).

Adicionalmente, foi realizado o controle positivo para o anticorpo MHC-II, utilizando amostra de tecido muscular equino.

Análise estatística

Para análise estatística, as variáveis dependente binomiais (porcentagem de marcação do CD105, CD90, CD44, CD34, MHC-II) foram analisadas através da ANOVA utilizando-se o PROC GLM do SAS (SAS, Inst. Inc., Cary, NC, EUA). Fontes de variação no modelo incluindo fonte (GCU, GMO e GTA) e animais foram considerados como efeitos fixo e aleatório, respectivamente. A transformação de arcosseno foi aplicada aos dados expressos em porcentagem. Se a ANOVA foi significativa as médias foram separadas utilizando o LSD. Os dados não transformados são apresentados como média dos quadrados mínimos e erro padrão. Para todas as análises foi adotado o nível de significância de 5%.

Resultados

Cultivo celular

Todas as CTMs cultivadas da MO, TA e CU aderiram às garrafas nos primeiros dias de cultivo. Sendo que a aderência das CTMs ao plástico da

garrafa foi observado com 48 horas para as CTM-MO, 32 horas para CTM-TA e 48 horas para CTM-CU.

O início da morfologia fibroblastóide das CTMs foi visualizada em média com $4,8 \pm 1,30$ dias de cultivo para as CTMs provenientes da MO, $3,5 \pm 2,12$ para as do TA e cinco dias para as provenientes do CU.

A confluência celular de aproximadamente 80% variou entre as amostras, sendo alcançada com 11 dias nas CTM-MO, e em média $7,3 \pm 1,52$ dias nas CTM-TA e $15,25 \pm 6,65$ dias nas CTM-CU (Figura 1). Após a primeira passagem, a confluência de 80% foi alcançada em média com $5,2 \pm 1,64$ dias para CTM-MO, três dias para CTM-TA e $6,16 \pm 2,40$ dias para CTM-CU.

Desde o momento do cultivo primário até a terceira passagem, quando foi realizada a caracterização e diferenciação celular, foram necessários em média $25 \pm 3,93$ dias para as CTM-MO, $15,5 \pm 0,70$ dias para as CTM-TA e $26,75 \pm 7,22$ dias para as CTM-CU.

Potencial de diferenciação nas linhagens mesodermiais

O potencial de diferenciação *in vitro* das CTM-MO e TA para as linhagens osteogênica e adipogênica foi demonstrado após o décimo e oitavo dia, respectivamente. As CTM-CU não se diferenciaram neste intervalo de tempo, necessitando de novas repetições da diferenciação. A diferenciação tanto em osteócitos quanto adipócitos ocorreu somente após 15 dias nestas células.

A diferenciação em tecido ósseo foi confirmada pela coloração positiva da matriz de cálcio pelo corante Alizarin Red. Adicionalmente, foi observada mudança da morfologia fibroblastóide para poligonal em grande proporção de

células (Figura 2). A diferenciação em tecido adiposo foi confirmada pela deposição de gotículas de gordura no citoplasma, confirmada pela coloração Oil Red (Figura 2).

A diferenciação condrogênica ocorreu após 21 dias para as CTMs da MO, TA e CU, e foi confirmada pela deposição de matriz hialina, rica em proteoglicanos. Foram realizadas as colorações Alcian Blue (áreas azuis) e Azul de Toluidina (áreas róseas metacromáticas) (Figura 2) que identificaram matriz extracelular rica em proteoglicanos.

Caracterização imunofenotípica

A análise imunofenotípica das CTM-MO, CTM-TA e CTM-CU em P3 através da citometria de fluxo, revelou CTMs com elevada expressão dos marcadores CD90, CD105 e CD44, e baixa ou ausência de expressão dos marcadores CD34 e MHC II (Figura 3). Foram utilizadas um mínimo de 10.000 células para a avaliação pela citometria. A média percentual das marcações com seu desvio padrão para cada fonte de CTMs podem ser observados na Tabela 1.

As CTMs provenientes da MO, TA e CU não apresentaram expressão do MHC-II na avaliação pela técnica de imunocitoquímica (Figura 4).

Discussão

Diversas fontes já foram estudadas para obtenção de CTMs em equinos, como medula óssea

estudo foram realizadas durante a terceira passagem, pois foi quando se obteve um cultivo homogêneo, corroborando com outro estudo

linhagens mesodermas. Porém estudos relatam que a diferenciação osteogênica é melhor em CTMs da MO

diferentemente de outros trabalhos

pois apresentaram os melhores resultados na citometria de fluxo. No entanto, Koerner et al.

diferenças quanto à imunocaracterização e o potencial de diferenciação entre os estudos realizados.

Conclusões

A MO, TA e CU de equinos são fontes viáveis para obtenção de CTMs, tendo sido confirmada as características imunofenotípicas e de multipotencialidade destas células. Baseado na baixa expressão do MHC-II, as CTM-MO, CTM-TA e CTM-CU podem ser utilizadas em estudos clínicos envolvendo terapia alogênica em equinos. No entanto, sob as condições experimentais deste estudo, as CTM-MO e CTM-TA apresentaram melhores resultados na caracterização imunofenotípica *in vitro*, quando comparadas com as CTM-CU, destacando-se como as melhores fontes de obtenção de CTMs.

Lista de abreviaturas

CTMs: células-tronco mesenquimais

CTM-MO: células-tronco mesenquimais provenientes da medula óssea

CTM-TA: células-tronco mesenquimais provenientes do tecido adiposo

CTM-CU: células-tronco mesenquimais provenientes do cordão umbilical

MHC-II: complexo de histocompatibilidade principal classe II

CTH: células-tronco hematopoiéticas

MO: medula óssea

TA: tecido adiposo

SCU: sangue do cordão umbilical

TCU: tecido do cordão umbilical

CU: cordão umbilical

P3: terceira passagem

Interesses conflitantes

Os autores declaram não terem interesses conflitantes.

Contribuições dos autores

DJB realizou as coletas das fontes de MO, TA e CU, o isolamento e cultivo das CTMs, a imunocitoquímica e a diferenciação celular, a marcação das CTMs para a citometria de fluxo, e redigiu o manuscrito. NPPF auxiliou coletas de TA, participou no isolamento e cultivo das CTMs do TA, auxiliou no preparo das CTMs para citometria de fluxo. MSM realizou as análises e a interpretação dos dados de citometria de fluxo das CTM-TA e CTM-CU. LM participou da coleta, isolamento e cultivo das CTMs da MO, auxiliou na imunocitoquímica e na diferenciação celular. AJL participou do isolamento e cultivo das CTMs da MO, auxiliou na técnica e na coloração das diferenciações celulares. MCH participou das coletas de MO, auxiliou no isolamento e cultivo das CTMs do CU. MJS realizou a análise estatística e interpretação dos dados. MAG realizou as análises e a interpretações dos dados de citometria de fluxo das CTM-MO. FCLA participou da concepção do estudo e do isolamento e cultivo das CTMs. RMA concebeu o estudo, participou das coletas das amostras de MO, realizou

a elaboração e coordenação do estudo, e auxiliou a redigir o manuscrito. Todos os autores leram e aprovaram o manuscrito final.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela FUNDUNESP (Fundação para o desenvolvimento da Unesp) e pelo CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico). Agradecimento a FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela bolsa de Mestrado durante o desenvolvimento do estudo. Os órgãos de financiamento não desempenharam nenhum papel no desenvolvimento do estudo, na coleta, análise e interpretação dos dados, na redação do manuscrito, ou na decisão de enviar o manuscrito para publicação. Ao Médico Veterinário Dr. Campo Amor, pela ajuda na coleta dos cordões umbilicais no haras.

Referências

1. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J: **Concise review: Mesenchymal stem cells: Their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing.** *Stem Cells* 2007, **25**:2739-2749.
2. Nöth U, Rackwitz L, Steinert AF, Tuan RS: **Cell delivery therapeutics for musculoskeletal regeneration.** *Adv Drug Deliv Rev* 2010, **62**:765-783.

3. Taylor SE, Smith RKW, Clegg PD: **Mesenchymal stem cell therapy in equine musculoskeletal disease: scientific fact or clinical fiction?** *Equine Vet J* 2007, **39**:172–180.
4. Guest DJ, Smith MRW, Allen WR: **Monitoring the fate of autologous and allogeneic mesenchymal progenitor cells injected into the superficial digital flexor tendon of horse: preliminary study.** *Equine Vet J* 2008, **40**:178-181.
5. Carrade DD, Owens SD, Galuppo LD, Vidal MA, Ferraro GL, Librach F, Buerchler S, Friedman MS, Walker NJ, Borjesson DL: **Clinicopathologic findings following intra-articular injection of autologous and allogeneic placentally derived equine mesenchymal stem cells in horses.** *Cytotherapy* 2011, **13**:419-430.
6. Chen Y, Shao JZ, Xiang LX, Dong XJ, Zhang GR: **Mesenchymal stem cells: A promising candidate in regenerative medicine.** *Int J Biochem Cell Biol* 2008, **40**:815–820.
7. Wu X, Tao R: **Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells.** *HBPD Int* 2012, **11**:360-371.
8. Reed SA, Johnson SE: **Equine umbilical cord blood contains a population of stem cells that express Oct4 and differentiate into mesodermal and endodermal cell types.** *J Cell Physiol* 2008, **215**:329-336.
9. Gutierrez-Nibeyro SD: **Commercial cell-based therapies for musculoskeletal injuries in horses.** *Vet Clin North Am Equine Pract* 2011, **27**:363-371.

10. Sole A, Spriet M, Galuppo LD, Padgett KA, Borjesson DL, Wisner ER, Brosnan RJ, Vidal MA: **Scintigraphic evaluation of intra-arterial and intravenous regional limb perfusion of allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the normal equine distal limb using (99m) Tc-HMPAO.** *Equine Vet J* 2012, **44**:594-599.
11. Carvalho AM, Alves ALG, Golim MA, Moroz A, Hussni CA, Oliveira PGG, Deffune E: **Isolation and immunophenotypic characterization of mesenchymal stem cells derived from equine species adipose tissue.** *Vet Immunol Immunopathol* 2009, **132**:303-306.
12. Ranera B, Lyahyaia J, Romero A, Vázquez FJ, Remacha AR, Bernal ML, Zaragoza P, Rodellar C, Martín-Burriel I: **Immunophenotype and gene expression profiles of cell surface markers of mesenchymal stem cells derived from equine bone marrow and adipose tissue.** *Vet Immunol Immunopathol* 2011, **144**:147–154.
13. Lange-Consiglio A, Corradetti B, Meucci A, Perego R, Bizzaro D, Cremonesi F: **Characteristics of equine mesenchymal stem cells derived from amnion and bone marrow: *in vitro* proliferative and multilineage potential assessment.** *Equine Vet J* 2013, in press.
14. Rogers I, Casper RF: **Umbilical cord blood stem cells.** *Best Pract Res Clin Ob* 2004, **18**:893-908.
15. Guest DJ, Ousey JC, Smith MRW: **Defining the expression of marker genes in equine mesenchymal stromal cells.** *Stem Cells Cloning* 2008, **1**:1-9.
16. Pascuccia L, Curinab G, Mercatia F, Marinib C, Dall'Aglio C, Paternesi B, Ceccarelli P: **Flow cytometric characterization of culture expanded**

- multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) from horse adipose tissue: Towards the definition of minimal stemness criteria.** *Vet Immunol Immunopathol* 2011, **144**:499– 506.
17. De Schauwer C, Meyer E, Van de Walle GR, Soom AV: **Markers of stemness in equine mesenchymal stem cells: a plea for uniformity.** *Theriogenology* 2010, **75**:1431-1443.
18. Borjesson DL, Peroni JF: **The regenerative medicine laboratory: facilitating stem cell therapy for equine disease.** *Clin Lab Med* 2011, **31**:109-123.
19. Burk J, Badylak SF, Kelly J, Brehm W: **Equine cellular therapy – from stall to bench to bedside?** *Cytometry* 2013, **83**:103-113.
20. Carrade DD, Lane MW, Kent MS, Clark KC, Walker NJ, Borjesson DL: **Comparative Analysis of the Immunomodulatory Properties of Equine Adult-Derived Mesenchymal Stem Cells.** *Cell Med* 2012, **4**(1):1–11.
21. Ranera B, Ordovás L, Lyahyai J, Bernal ML, Fernandes F, Remacha AR, Romero A, Vázquez FJ, 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* 2012, **44**:33–42.
22. Hoynowski SM, Fry MM, Gardner BM, Leming MT, Tucker JR, Black L, Sand T, Mitchell KE. **Characterization and differentiation of equine umbilical cord-derived matrix cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 2007, **362**:347–353.

23. Lovati AB, Corradetti B, Lange-Consiglio A, Recordati C, Bonacina E, Bizzaro D, Cremonesi F: **Comparison of equine bone marrow-, umbilical cord matrix and amniotic fluid-derived progenitor cells.** *Vet Res Commun* 2011, **35**:103–121.
24. De Schauwer C, Piepers S, Van de Walle GR, Demeyere K, Hoogewijs MK, Govaere JLJ, Braeckmans K, Soom AV, Meyer E: **In Search for Cross-Reactivity to Immunophenotype Equine Mesenchymal Stromal Cells by Multicolor Flow Cytometry.** *Cytometry Part A* 2012, **81A**:312-323.
25. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, Deans RJ, Keating A, Prockop DJ, Horwitz EM: **Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for cellular therapy position statement.** *Cytotherapy* 2006, **8**:315-317.
26. Burk J, Ribitsch I, Gittel C, Juelke H, Kasper C, Staszky C, Brehm W: **Growth and differentiation characteristics of equine mesenchymal stromal cells derived from different sources.** *Vet J* 2013, **195**:98–106.
27. Richardson LE, Dudhia J, Clegg PD, Smith R: **Stem cells in veterinary medicine – attempts at regenerating equine tendon after injury.** *Trends Biotechnol* 2007, **25**:409-416.
28. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kl"uter H, Bieback K: **Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue.** *Stem Cells* 2006, **24**:1294-1301.
29. Carrade DD, Affolter VK, Outerbridge CA, Watson JL, Galuppo LD, Buerchler S, Kumar V, Walker NJ, Borjesson DL: **Intradermal injections**

- of equine allogeneic umbilical cord-derived mesenchymal stem cells are well tolerated and do not elicit immediate or delayed hypersensitivity reactions. *Cytotherapy* 2011, **13**:1180-1192.
30. Peroni JF, Borjesson DL: **Anti-inflammatory and immunomodulatory activities of stem cells.** *Vet Clin North Am Equine Pract* 2011, **27**:351-362.
31. Ryan JM, Barry FP, Murphy JM, Mahon BP: **Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection.** *J Inflamm* 2005, **2**:8.
32. Maia L, Landim-Alvarenga FC, Da Mota LSLS, Golim MA, Amorim RL, De Vita B, Barberini DJ, Listoni AJ, Moraes CN, Heckler MCT, Amorim RM: **Immunophenotypic, Immunocytochemistry, Ultrastructural, and Cytogenetic Characterization of Mesenchymal Stem Cells From Equine Bone Marrow.** *Microsc Res Tech* 2013, **76**:618–624.
33. Corradetti B, Lange-Consiglio A, Barucca M, Cremonesi F, Bizzaro D: **Size-sieved subpopulations of mesenchymal stem cells from intervacular and perivascular equine umbilical cord matrix.** *Cell Prolif* 2011, **44**:330–342.
34. Bartholomew S, Owens SD, Ferraro GL, Carrade DD, Lara DJ, Librach FA, Borjesson DL, Galuppo LD: **Collection of equine cord blood and placental tissues in 40 Thoroughbred mares.** *Equine Vet J* 2009, **41**:724-728.
35. Koerner J, Nesic D, Romero JD, Brehm W, Mainil-Varlet P, Grogan SP: **Equine peripheral blood-derived progenitors in comparison to bone marrow-derived mesenchymal stem cells.** *Stem Cells* 2006, **24**:1613-1619.

36. Colleoni S, Bottani E, Tessaro I, Mari G, Merlo B, Romagnoli N, Spadari 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* 2009, **33**:811-821.
37. Vidal MA, Walker NJ, Napoli E, Borjesson DL: **Evaluation of senescence in mesenchymal stem cells isolated from equine bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord tissue.** *Stem Cells Dev* 2012, **21**:273-283.
38. Toupadakis CA, Wong A, Genetos DC, Cheung WK, Borjesson DL, Ferraro GL, Galuppo LD, Leach JK, Owens SD, Yellowley CE: **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**:1237-1245.
39. Troyer DL, Weiss ML: **Concise review: Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population.** *Stem Cells* 2008, **26**:591-599.
40. Iacono E, Brunori L, Pirrone A, Pagliaro PP, 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* 2012, **143**:455–468.
41. Vidal MA, Robinson SO, Lopez MJ, Paulsen DB, Borkhsenius O, Johnson JR, Moore RM, Gimble JM: **Comparison of Chondrogenic Potential in Equine Mesenchymal Stromal Cells Derived from Adipose Tissue and Bone Marrow.** *Vet Surg* 2008, **37**:713–724.

42. Radcliffe CH, M. Flaminio MJBF, Fortier LA: **Temporal Analysis of Equine Bone Marrow Aspirate During Establishment of Putative Mesenchymal Progenitor Cell Populations.** *Stem Cells Dev* 2010, **19**:269-281.
43. Braun J, Hack A, Weis-Klemm M, Conrad S, Trembl S, Kohler K, Walliser U, Skutella T, Aicher WK: **Evaluation of the osteogenic and chondrogenic differentiation capacities of equine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells.** *Am J Vet Res* 2010, **71**:1228-1236.
44. Secco M, Zucconi E, Vieira NM, Fogac LLQ, Cerqueira A, Carvalho MDF, Jazedje T, Okamoto OK, Muotri AR, Zatz M: **Multipotent Stem Cells from Umbilical Cord: Cord Is Richer than Blood!** *Stem Cells* 2008, **26**:146-150.
45. De Vita B, Campos LL, Listoni AJ, Maia L, Sudano MJ, Curcio BR, Landim-Alvarenga FC, Prestes NC: **Isolamento, caracterização ediferenciação de células-tronco mesenquimais do líquido amniótico equino obtido em diferentes idades gestacionais.** *Pesq Vet Bras* 2013, **33**:535-542.
46. Mambelli LI, Santos EJC, Frazão PJR, Chaparro MB, Kerkis A, Zoppa ALV, Kerkis I: **Characterization of equine adipose tissue-derived progenitor cells before and after cryopreservation.** *Tissue Eng* 2009, **15**:87-94.

Figuras

Figura 1 – CTMs da MO, TA e CU durante cultivo celular apresentando confluência $\geq 80\%$

CTMs provenientes da MO (A), TA (B) e CU (C) apresentando confluência de aproximadamente 80% da garrafa com 11, 7 e 15 dias de cultivo, respectivamente. (A) e (B) Aumento de 100x e (C) aumento de 200x.

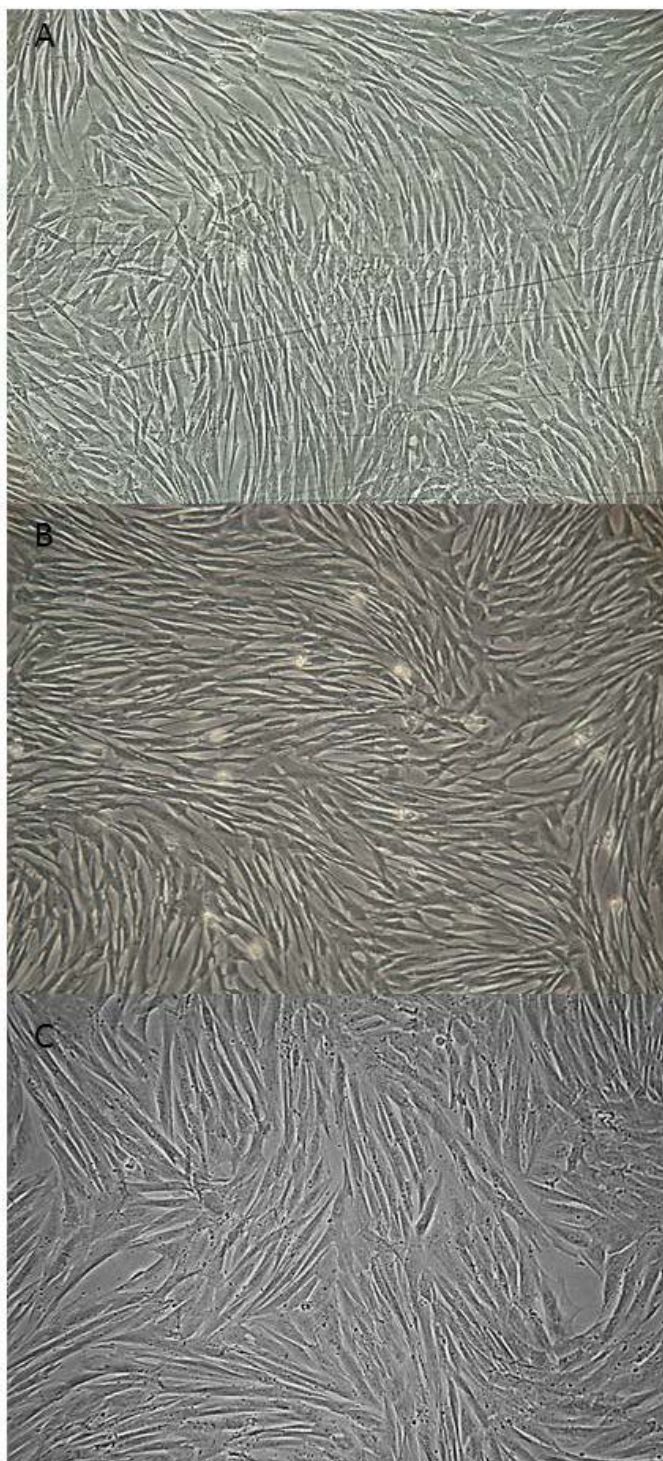


Figura 2 – Potencial de diferenciação das CTMs da MO, TA e CU de equinos

Diferenciação das CTMs da MO (A,D,G,J), do TA (B,E,H,K) e do CU (C,F,I,L) nas três linhagens mesenquimais durante a terceira passagem. (A-C) CTMs apresentando depósitos de gordura intracitoplasmáticos, confirmando a linhagem adipogênica. (D-F) CTMs coradas com Alizarin Red evidenciando formação de matriz de cálcio. (G-L). CTMs após diferenciação condrogênica coradas com Alcian Blue (G-I) e com Azul de toluidina (J-L) mostrando matriz hialina. Aumento de 100x (D-L), 200x (B) e 400x (A,C).

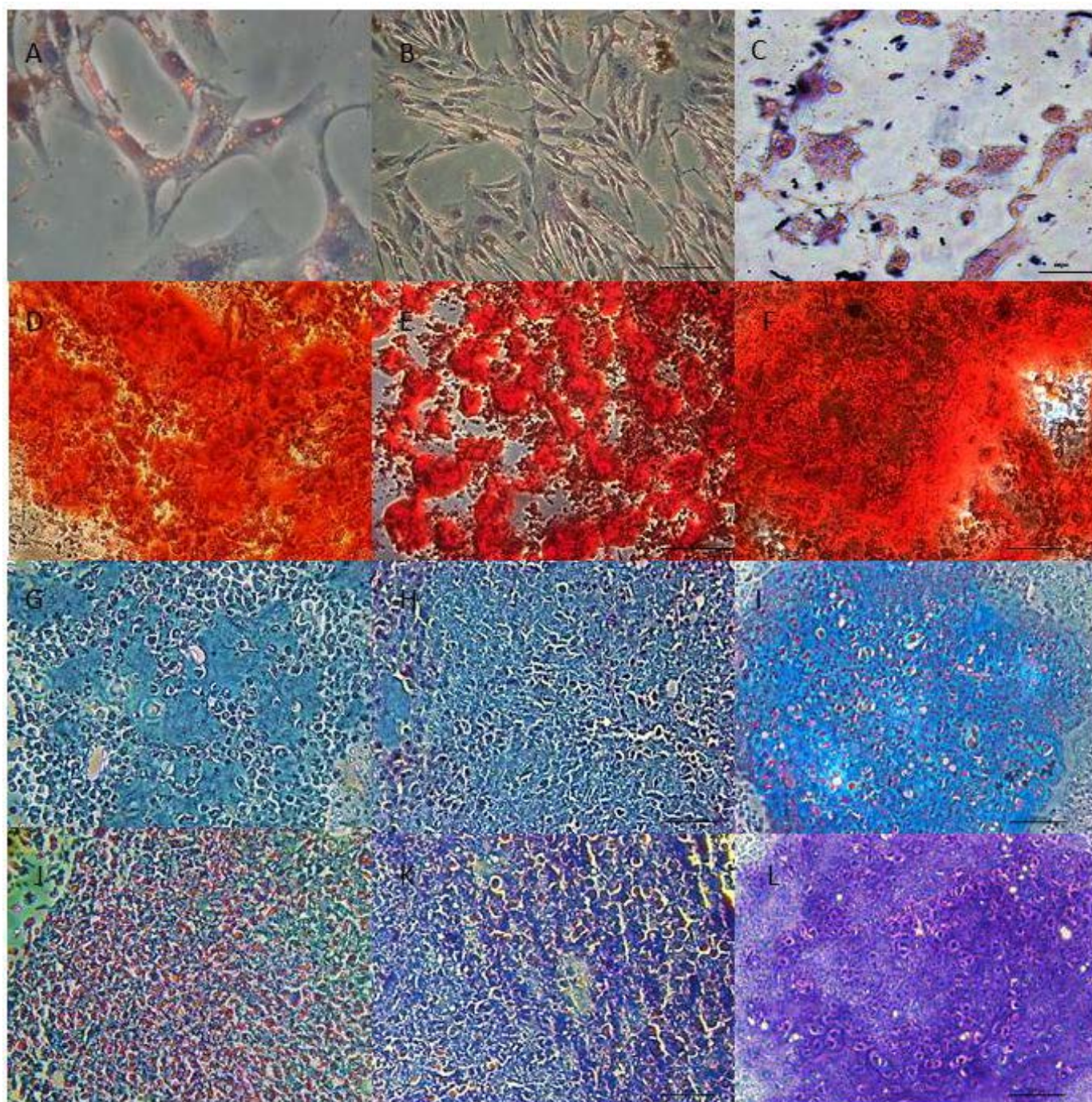


Figura 3 – Expressão de marcadores de superfície celular pela técnica de citometria de fluxo das CTMs da MO, TA e CU

Histogramas representando o perfil das amostras de CTM-MO, CTM-TA e CTM-CU analisadas pela técnica de citometria de fluxo após a terceira passagem, avaliando-se os marcadores de superfície celular CD90, CD44, CD105, CD34 e MHC-II. As CTMs foram positivas para CD90, CD44 e CD105, negativas para CD34 e apresentaram baixa expressão do MHC-II.

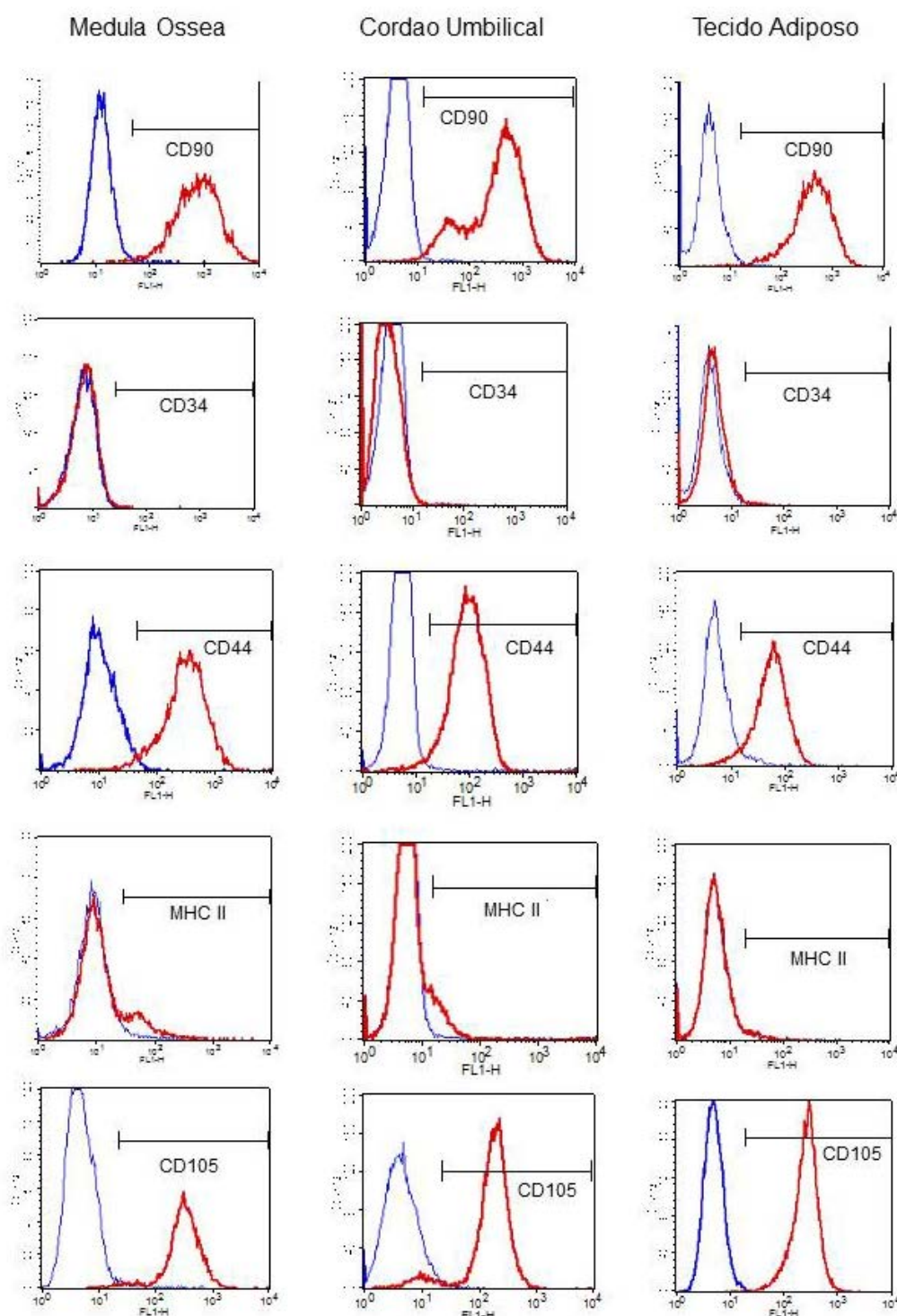
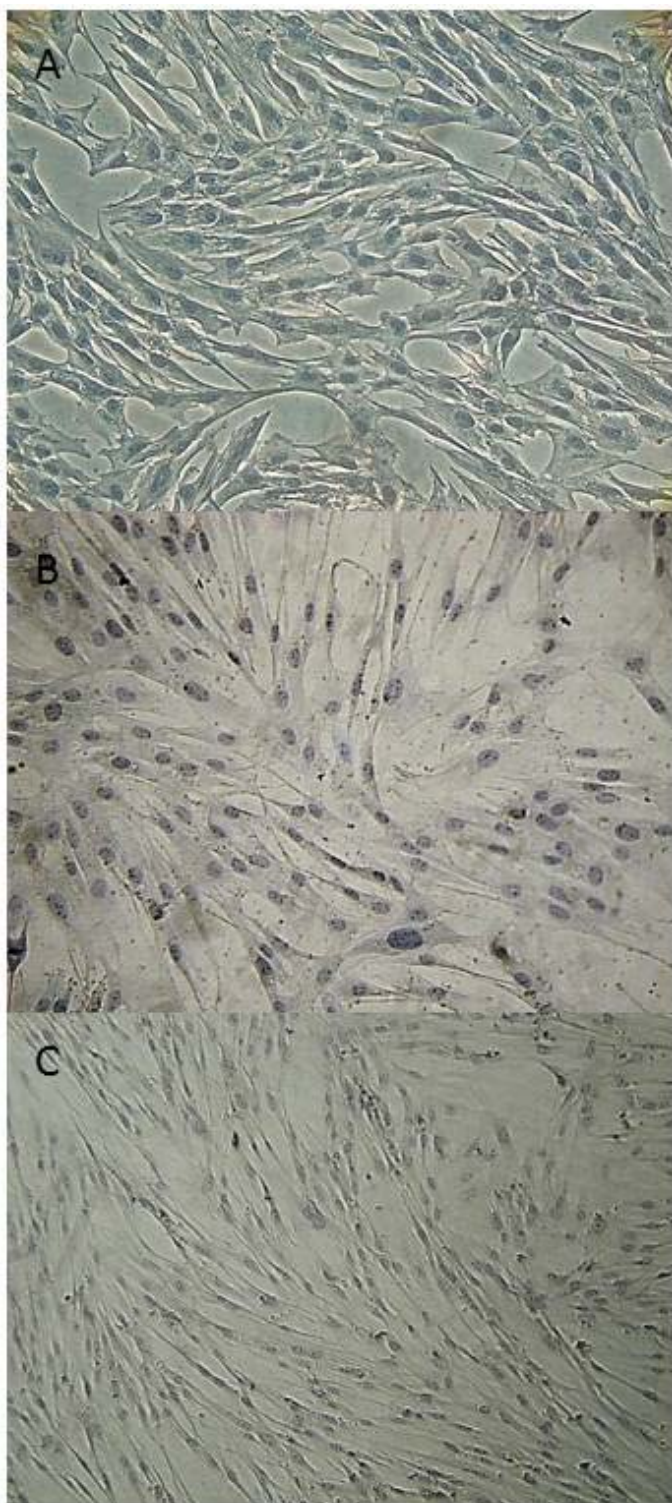


Figura 4 – Avaliação da expressão do MHC-II nas CTMs da MO, TA e CU pela técnica de imunocitoquímica

Imunocitoquímica das CTMs da MO (A), TA (B) e CU (C) de equinos durante a terceira passagem, para avaliação da expressão do marcador de superfície celular MHC-II. As CTMs das fontes analisadas não expressaram o MHC-II. Aumento de 100x (C) e 200x (A,B).



Tabelas

Tabela 1: Médias percentuais da caracterização imunofenotípica das CTM-MO, CTM-TA e CTM-CU pela técnica de citometria de fluxo

Médias percentuais de marcação das CTMs provenientes da MO, TA e CU na terceira passagem, através da técnica de citometria de fluxo, para os marcadores CD90, CD105, CD44, CD34 e MHC-II.

Tratamento	Marcação				
	CD105	CD90	CD44	CD34	MHC-II
GCU	94.2±2.1	67.7±6.5 ^a	95.7±1.5	0.20±0.3 ^a	5.9±1.8
GMO	97.7±2.3	98.2±7.1 ^b	96.2±1.6	0.28±0.3 ^a	6.8±2.0
GTA	94.2±2.3	99.2±7.1 ^b	92.4±1.6	1.21±0.3 ^b	3.8±2.0
Valor de P	0.5442	0.0033	0.1994	0.0197	0.4896

^{ab} Letras Sobrescritas distintas na mesma coluna diferem (P<0.05).

CAPÍTULO 3

CONCLUSÕES GERAIS

Dentre as condições experimentais descritas pode-se concluir que:

- A coleta, o isolamento e cultivo das CTMs provenientes da medula óssea, tecido adiposo e cordão umbilical foram realizados com êxito, mostrando-se eficiente e confiável para produção desses tipos celulares.

- A proliferação das CTMs *in vitro* varia de acordo com os animais e com a fonte estudada, sendo que o tempo necessário para se obter uniformemente >80% de confluência celular (3ª passagem) nas condições experimentais foi de aproximadamente 25 dias para medula óssea, 15 dias para tecido adiposo e 26 dias para células do cordão umbilical.

- As CTMs provenientes da medula óssea, tecido adiposo e cordão umbilical de equinos quando submetidas a estímulos específicos *in vitro*, se diferenciaram em linhagens osteogênicas, condrogênicas e adipogênicas, comprovando sua multipotência de acordo com os critérios da Sociedade Internacional de Terapia Celular.

- A análise imunofenotípica das CTMs provenientes da medula óssea, tecido adiposo e cordão umbilical de equinos revelou elevada expressão dos marcadores CD90, CD105 e do CD 44, e baixa ou ausência da expressão do marcador CD34 e MHC II, comprovando as características esperadas das CTMs.

- Os resultados obtidos com a baixa expressão do MHC-II das CTMs da medula óssea, tecido adiposo e cordão umbilical indicam que estas células podem escapar do processo normal de reconhecimento de aloantígenos, uma característica vantajosa para o uso em terapia alogênica a partir de um banco de células.

- Nas condições experimentais descritas, as CTMs da medula óssea e tecido adiposo apresentaram melhores resultados na caracterização imunofenotípica *in vitro*, quando comparadas com as CTMs do cordão umbilical.

BIBLIOGRAFIA

AGGARWAL, S.; PITTENGER, M. F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, v. 105, n. 4, p. 1815-1822, 2005.

ALVES, A.L.G.; CARVALHO A.M.; OLIVEIRA P.G.G.; HUSSNI C.A.; WATANABE M.J.; ALVARENGA M.L.; DEFFUNEE E. Comparison between stem cells obtained from equine bone marrow and adipose tissue. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF THE WORLD EQUINE VETERINARY ASSOCIATION, 11, 2009, Guarujá. *Proceedings...* Guarujá, 2009.

BARTHOLOMEW, S.; OWENS S.D.; FERRARO G.L.; CARRADE D.D.; LARA D.J.; LIBRACH F.A.; BORJESSON D.L.; GALUPPO L.D. Collection of equine cord blood and placental tissues in 40 Thoroughbred mares. *Equine Veterinary Journal*, v. 41, n. 8, p. 724-728, 2009.

BORJESSON, D.L.; PERONI, J.F. The regenerative medicine laboratory: facilitating stem cell therapy for equine disease. *Clinics in Laboratory Medicine*, v. 31, p. 109-123, 2011.

BREMS, R.; JEBE, E.C. Comparison of treatments with autolog; cultured stem cells from adipose tissue or bone marrow. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF WORLD EQUINE VETERINARY ASSOCIATION, 10, 2008, Moscow. *Proceedings...* Moscow, 2008. p. 523.

BURK J.; RIBITSCH I.; GITTEL C.; JUELKE H.; KASPER C.; STASZYK C.; BREHM W. Growth and differentiation characteristics of equine mesenchymal stromal cells derived from different sources. *The Veterinary Journal*, v. 195, p. 98-106, 2013a.

BURK, J.; BADYLAK S.F.; KELLY J.; BREHM W. Equine cellular therapy – from stall to bench to bedside? *Cytometry*, v. 83, n. 1, jan., p. 103-113, 2013b.

BYDLOWSKI, S. P.; DEBES A.A.; MASELLI L.M.F.; JANZ F.L. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 31, v. 1, p.25-35, 2009.

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

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

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

CARRADE D.D.; AFFOLTER V.K.; OUTERBRIDGE C.A.; WATSON J.L.; GALUPPO L.D.; BUERCHLER S.; KUMAR V.; WALKER N.J.; BORJESSON D.L. Intradermal injections of equine allogeneic umbilical cord-derived mesenchymal stem cells are well tolerated and do not elicit immediate or delayed hypersensitivity reactions. *Cytotherapy*, v. 13, p. 1180-1192, 2011b.

CHAMBERLAIN, G.; FOX J.; ASHTON B.; MIDDLETON J. Concise review: Mesenchymal stem cells: Their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*, v. 25, n. 11, p. 2739-2749, nov., 2007.

CHEN, F. H.; SONG L.; MAUCK R.L.; WAN-JU L.; TUAN R.S. Mesenchymal Stem Cells. In: LANZA R.; LANGER R.; VACANTI J. *Principles of Tissue*

Engineering. 3. ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2007. chap. 55, p. 823-843.

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

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

COLLEONI S.; BOTTANI E.; TESSARO I.; MARI G.; MERLO B.; ROMAGNOLI N.; SPADARI 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. *Veterinary Research Communications*, v.33, p. 811-821, 2009.

CRUZ, L. E. JORGE M.C.; MACHADO J.J.; HOSNNE JR N. A.; INVITTI A. L.; BALDUINO A.; VIANNA V.; ELLOVITCH S.R.S.; URAGO K.P.T.; MENESES-COSTA A.P.; RIBEIRO M.G.; NICOLA M.H.A.; SANBERG P.R. Sangue de cordão umbilical para uso autólogo ou grupo de pacientes especiais. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 31, n.1, p. 36-44, 2009.

DAHLGREN, L. A. Stem Cell Therapy. In: ROBINSON, N. E.; SPRAYBERRY, K. A. *Current Therapy in Equine Medicine*. 6. ed. St. Louis: Saunders, 2009. chap. 199, p. 908-911.

DE SCHAUWER, C.; MEYER E.; VAN DE WALLE G.R.; SOOM A.V. Markers of stemness in equine mesenchymal stem cells: a plea for uniformity. *Theriogenology*. p.1-13, 2010.

DOMINICI, M.; LE BLANC K.; MUELLER I.; SLAPER-CORTENBACH I.; MARINI F.C.; KRAUSE D.S.; DEANS R.J.; KEATING 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.

FERRIS D.J.; FRISBIE D.D.; KISIDAY J.D.; MCILWRAITH C.W.; HAGUE B.A.; MAJOR M.D.; SCHNEIDER R.K.; ZUBROD C.J.; WATKINS J.J.; KAWCAK C.E.; GOODRICH L.R. Clinical follow-up of horses treated with bone marrow-derived mesenchymal stem cells for musculoskeletal lesions. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AAEP, 2009, Las Vegas. *Proceedings...* Las Vegas, 2009. v. 55. p. 59-60.

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

GATTEGNO-HO, D.; ARGYLE, S. A.; ARGYLE, D. J. Stem cells and veterinary medicine: Tools to understand diseases and enable tissue regeneration and drug discovery. *The Veterinary Journal*, v. 191, p. 19-27, 2012.

GIMBLE, J.M.; GUILAK, F. Adipose-derived adult stem cells: isolation characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy*. v. 5, n. 5, p. 362-369, 2003.

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

GUERRA, P.; MEDEIROS, S.A.F. Cavalo: Velocidade de R\$ 7,3 bi por ano. *Agroanalysis*, 2006. Disponível em: <http://www.agroanalysis.com.br/materia_detalhe.php?idMateria=114>. Acesso em: 15 abr. 2013.

GUEST, D.J.; SMITH, M.R.W.; ALLEN, W.R. Monitoring the fate of autologous and allogeneic mesenchymal progenitor cells injected into the superficial digital

flexor tendon of horse: preliminary study. *Equine Veterinary Journal*. v. 40, n. 2, p. 178 – 181, 2008b.

GUEST, D.J.; SMITH, M.R.W.; ALLEN, W.R. Equine embryonic stem-like cells and mesenchymal stromal cells have different survival rates and migration patterns following their injection into damaged superficial digital flexor tendon. *Equine Veterinary Journal*, v. 42, n. 7, p. 636-642, 2010.

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

KERN S.; EICHLER H.; STOEVE J.; KLÜTER H.; BIEBACK K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*. v. 24, p. 1294-1301, 2006.

KOCH, T.G.; BERG, L.C.; BETTS, D.H. Concepts for the clinical use of stem cells in equine medicine. *Canadian Veterinary Journal*. v. 49, p. 1009-1017, 2008.

KOERNER J.; NESIC D.; ROMERO J.D.; BREHM W.; MAINIL-VARLET P.; GROGAN S.P. Equine peripheral blood-derived progenitors in comparison to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, v. 24, p. 1613-1619, 2006.

LANGE-CONSIGLIO, A.; CORRADETTI B.; MEUCCI A.; PEREGO R.; BIZZARO D.; CREMONESI F. Characteristics of equine mesenchymal stem cells derived from amnion and bone marrow: *in vitro* proliferative and multilineage potential assessment. *Equine Veterinary Journal*, 2013 (in press).

LE BLANC, K.; TAMMIK C.; ROSENDAHL K.; ZETTERBERG E.; RINGDE´N O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Experimental Hematology*. v. 31, p. 890-896, 2003.

LEUNG, V.Y.L.; CHAN, D.; CHEUNG, K.M.C. Regeneration of intervertebral disc by mesenchymal stem cells: potentials, limitations, and future direction. *European Spine Journal*. v. 15, n. 3, p. 406-413, 2006.

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. Potencial de transdiferenciação neural das células-tronco mesenquimais da medula óssea de equino. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.32, n.5, p. 444-452, 2012.

MAIA, L.; LANDIM-ALVARENGA F.C.; DA MOTA L.S.L.S.; GOLIM M.A.; AMORIM R.L.; DE VITA B.; BARBERINI D.J.; LISTONI A.J.; MORAES C.N.; HECKLER M.C.T.; AMORIM R.M. Immunophenotypic, Immunocytochemistry, Ultrastructural, and Cytogenetic Characterization of Mesenchymal Stem Cells From Equine Bone Marrow. *Microscopy Research and Technique*, v.76, p. 618-624, 2013.

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

MCCARTHY H.E.; BARA J.J.; BRAKSPEAR K.; SINGHRAO S.K.; ARCHER C.W.A. The comparison of equine articular cartilage progenitor cells and bone marrow-derived stromal cells as potential cells sources for cartilage repair in the horse. *The Veterinary Journal*, v. 192, p. 345-351, 2012.

MCILWRAITH W.; FRISBIE D.D.; KISIDAY J.D.; KAWCAK C.E.; WERPYPY N.M.; RODKEY W.G.; STEADMAN R.S. Use of bone marrow-derived culture-expanded mesenchymal stem cells to augment healing of chondral defects treated with microfracture. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AAEP, 2010, Baltimore. *Proceedings...* Baltimore, 2010.

MEIRELLES, L.S.; CHAGASTELLES, P.C.; NARDI, N.B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of Cell Science*, v. 119, n. 11, p. 2204-2213, 2006.

MONTEIRO, B.S.; ARGOLO NETO, N.; DEL CARLO, R.J. Células-tronco mesenquimais. *Ciência Rural*, v. 40, n. 1, Santa Maria, jan/fev, 2010.

NIEMEYER P.; KORNACKER M.; MEHLHORN A.; SECKINGER A.; VOHRER J.; SCHMAL H.; KASTEN P.; ECKSTEIN V.; DKAMP N.P.S.; KRAUSE U. Comparison of immunological properties of bone marrow stromal cells and adipose tissue-derived stem cells before and after osteogenic differentiation in vitro. *Tissue Engineering*. v. 13, n. 1, p. 111-121, 2007.

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

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

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 Veterinary Journal*, v. 44, n.1, p.33-42, 2012.

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

RICHARDSON L.E.; DUDHIA J.; CLEGG P.D.; SMITH R. Stem cells in veterinary medicine – attempts at regenerating equine tendon after injury. *Trends in Biotechnology*. v. 25, n. 9, p. 409-416, 2007.

ROGERS, I.; CASPER, R.F. Umbilical cord blood stem cells. *Best Practice and Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*, v. 18, n. 6, p. 893-908, 2004.

RYAN J.M.; BARRY F.P.; MURPHY J.M.; MAHON B.P. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *Journal of Inflammation*. v. 2, n. 8, 2005.

SCHNABEL L.V.; LYNCH M.E.; VAN DER MEULEN M.C.; YEAGER A.E.; KORNATOWSKI M.A.; NIXON A.J. Mesenchymal stem cells and insulin-like growth factor-I gene enhanced mesenchymal stem cells improve structural aspects of healing in equine flexor digitorum superficialis tendons. *Journal of Orthopaedic Research*. p. 1-7, 2009.

SCHWINDT, T.T.; BARNABÉ, G.F.; MELLO, L.E.A.M. Proliferar ou diferenciar? Perspectivas de destino das células-tronco. *Jornal Brasileiro de Neurocirurgia*, v. 16, n.1, p. 13-19, 2005.

SECCO M.; ZUCCONI E.; VIEIRA N.M.; FOGAC L.L.Q.; CERQUEIRA A.; CARVALHO M.D.F.; JAZEDJE T.; OKAMOTO O.K.; MUOTRI A.R.; ZATZ M. Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood! *Stem Cells*, v. 26, p. 146-150, 2008.

SENEGAGLIA, A.C.; REBELATTO C.L.K.; SUSS P.H.; BROFMAN P.R.S. Expansão de células-tronco da medula óssea e do sangue de cordão umbilical humano. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 31, n.1, p.9-14, 2009.

SMITH, R. K. W.; KORDA M.; BLUNN G.W.; GOODSHIP A.E. Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. *Equine Veterinary Journal*, v.35, n.1, p. 99-102, 2003.

SOLE A.; SPRIET M.; GALUPPO L.D.; PADGETT K.A.; BORJESSON D.L.; WISNER E.R.; BROSNAN R.J.; VIDAL M.A. Scintigraphic evaluation of intra-arterial and intravenous regional limb perfusion of allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the normal equine distal limb using (99m) Tc-HMPAO. *Equine Veterinary Journal*, v.44, n.5, p. 594-599, set, 2012.

STEWART, M. C. Cell-based therapies: current issues and future directions. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, v. 27, p. 393-399, 2011.

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

TROYER, D.L.; WEISS, M.L. Concise review: Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem Cells*, v. 26, p. 591-599, 2008.

VIDAL, M.A.; WALKER N.J.; NAPOLI E.; BORJESSON D.L. Evaluation of senescence in mesenchymal stem cells isolated from equine bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord tissue. *Stem Cells and Development*, v. 21, n.2, p. 273-283, 2012.

WANG H.S.; HUNG S.H.; PENG S.T.; HUANG C.C.; WEI H.M.; GUO Y.J.; FU Y.S.; LAI M.C.; CHEN C.C.. Mesenchymal stem cells in the Wharton's Jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells*, v. 22, p. 1330-1337, 2004.

WU, X.; TAO R. Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International*, v. 11, n. 4, p. 360-371, aug, 2012.

YANG W.Z.; ZHANG Y.; WU F.; MIN W.P.; MINEV B.; ZHANG M.; LUO X.L.; RAMOS F.; ICHIM T.E.; RIORDAN N.H.; HU X. Safety evaluation of allogeneic umbilical cord blood mononuclear cell therapy for degenerative conditions. *Journal of Translational Medicine*, v. 8, n. 75, 2010.

ANEXOS

Anexo 1

TABELA 2

Valores percentuais individuais dos animais dos grupos CTM-MO, CTMA-TA e CTM-CU pela técnica de citometria de fluxo, para os marcadores CD 90, CD 44, CD34, CD105 e MHC II.

Animal / Grupo	CD 105	CD 90	CD 44	CD 34	MHC II
Animal 01 / GMO	99,44%	96,05%	98,93%	0,07%	9,75%
Animal 02 / GMO	96,73%	99,02%	97,16%	0,1%	6,9%
Animal 03 / GMO	96,37%	99,84%	94,90%	0,36%	9,97%
Animal 04 / GMO	98,29%	98,90%	95,36%	0,35%	2,71%
Animal 05 / GMO	97,45%	97,12%	94,58%	0,02%	4,91%
Animal 06 / GTA	93,55%	99,65%	94,98%	0,55%	11,35%
Animal 07 / GTA	99,14%	98,33%	94,64%	0,61%	2,06%
Animal 08 / GTA	96,83%	99,43%	92,16%	0,30%	1,97%
Animal 09 / GTA	81,44%	99,24%	84,50%	3,44%	1,78%
Animal 10 / GTA	99,86%	99,58%	95,62%	1,13%	1,81%
Animal 11 / GCU	99,44%	97,32%	96,56%	0,52%	13,91%
Animal 12 / GCU	97,62%	52,12%	99,03%	0,32%	10,09%
Animal 13 / GCU	95,75%	72,46%	96,49%	0,01%	0,71%
Animal 14 / GCU	92,54%	49,14%	89,13%	0,01%	1,02%
Animal 15 / GCU	94,01%	97,47%	98,86%	0,31%	7,92%
Animal 16 / GCU	86,06%	37,84%	93,99%	0,01%	1,90%

Anexo 2

Normas de publicação da Revista *Stem Cell Research & Therapy*.

Overview of manuscript sections for Research articles

Manuscripts for Research articles submitted to *Stem Cell Research & Therapy* should be divided into the following sections (in this order):

- Title page
- Abstract
- Keywords
- Introduction
- Methods
- Results and discussion
- Conclusions
- List of abbreviations used (if any)
- Competing interests
- Authors' contributions
- Authors' information
- Acknowledgements
- Endnotes
- References
- Illustrations and figures (if any)
- Tables and captions
- Preparing additional files

Title page

The title page should:

- provide the title of the article
- list the full names, institutional addresses and email addresses for all authors
- indicate the corresponding author

Please note:

- the title should include the study design, for example "A versus B in the treatment of C: a randomized controlled trial" or "X is a risk factor for Y: a case control study"
- abbreviations within the title should be avoided

Abstract

The Abstract of the manuscript should not exceed 350 words and must be structured into separate sections: **Introduction**, the context and purpose of the study; **Methods**, how the study was performed and statistical tests used; **Results**, the main findings; **Conclusions**, brief summary and potential implications. Please minimize the use of abbreviations and do not cite references in the abstract. **Trial registration**, if your research reports the results of a controlled health care intervention, please list your trial registry, along with the unique identifying number (e.g. **Trial registration**: Current Controlled Trials ISRCTN73824458). Please note that there should be no space between the letters and numbers of your trial registration number. We recommend manuscripts that report randomized controlled trials follow the CONSORT extension for abstracts.

Please minimize the use of abbreviations and do not cite references in the abstract. Please see also our guide for writing an easily accessible abstract.

Keywords

Three to ten keywords representing the main content of the article.

Introduction

The Introduction section should be written in a way that is accessible to researchers without specialist knowledge in that area and must clearly state - and, if helpful, illustrate - the background to the research and its aims. Reports of clinical research should, where appropriate, include a summary of a search of the literature to indicate why this study was necessary and what it aimed to contribute to the field. The section should end with a brief statement of what is being reported in the article.

Methods

The methods section should include the design of the study, the setting, the type of participants or materials involved, a clear description of all interventions and comparisons, and the type of analysis used, including a power calculation if appropriate. Generic drug names should generally be used. When proprietary brands are used in research, include the brand names in parentheses in the Methods section.

For studies involving human participants a statement detailing ethical approval and consent should be included in the methods section. For further details of the journal's editorial policies and ethical guidelines see ['About this journal'](#).

For further details of the journal's data-release policy, see the policy section in ['About this journal'](#).

Results and discussion

The Results and discussion may be combined into a single section or presented separately. Results of statistical analysis should include, where appropriate, relative and absolute risks or risk reductions, and confidence intervals. The Results and discussion sections may also be broken into subsections with short, informative headings.

Conclusions

This should state clearly the main conclusions of the research and give a clear explanation of their importance and relevance. Summary illustrations may be included.

List of abbreviations

If abbreviations are used in the text they should be defined in the text at first use, and a list of abbreviations can be provided, which should precede the competing interests and authors' contributions.

Competing interests

A competing interest exists when your interpretation of data or presentation of information may be influenced by your personal or financial relationship with other people or organizations. Authors must disclose any financial competing

interests; they should also reveal any non-financial competing interests that may cause them embarrassment were they to become public after the publication of the manuscript.

Authors are required to complete a declaration of competing interests. All competing interests that are declared will be listed at the end of published articles. Where an author gives no competing interests, the listing will read 'The author(s) declare that they have no competing interests'.

When completing your declaration, please consider the following questions:

Financial competing interests

- In the past five years have you received reimbursements, fees, funding, or salary from an organization that may in any way gain or lose financially from the publication of this manuscript, either now or in the future? Is such an organization financing this manuscript (including the article-processing charge)? If so, please specify.
- Do you hold any stocks or shares in an organization that may in any way gain or lose financially from the publication of this manuscript, either now or in the future? If so, please specify.
- Do you hold or are you currently applying for any patents relating to the content of the manuscript? Have you received reimbursements, fees, funding, or salary from an organization that holds or has applied for patents relating to the content of the manuscript? If so, please specify.
- Do you have any other financial competing interests? If so, please specify.

Non-financial competing interests

Are there any non-financial competing interests (political, personal, religious, ideological, academic, intellectual, commercial or any other) to declare in relation to this manuscript? If so, please specify.

If you are unsure as to whether you, or one your co-authors, has a competing interest please discuss it with the editorial office.

Authors' contributions

In order to give appropriate credit to each author of a paper, the individual contributions of authors to the manuscript should be specified in this section.

An 'author' is generally considered to be someone who has made substantive intellectual contributions to a published study. To qualify as an author one should 1) have made substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data; 2) have been involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content; and 3) have given final approval of the version to be published. Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content. Acquisition of funding, collection of data, or general supervision of the research group, alone, does not justify authorship.

We suggest the following kind of format (please use initials to refer to each author's contribution): AB carried out the molecular genetic studies, participated in the sequence alignment and drafted the manuscript. JY carried out the immunoassays. MT participated in the sequence alignment. ES participated in the design of the study and performed the statistical analysis. FG conceived of the study, and participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

All contributors who do not meet the criteria for authorship should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support.

Authors' information

You may choose to use this section to include any relevant information about the author(s) that may aid the reader's interpretation of the article, and understand the standpoint of the author(s). This may include details about the authors' qualifications, current positions they hold at institutions or societies, or any other relevant background information. Please refer to authors using their initials. Note this section should not be used to describe any competing interests.

Acknowledgements

Please acknowledge anyone who contributed towards the article by making substantial contributions to conception, design, acquisition of data, or analysis

and interpretation of data, or who was involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content, but who does not meet the criteria for authorship. Please also include the source(s) of funding for each author, and for the manuscript preparation. Authors must describe the role of the funding body, if any, in design, in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. Please also acknowledge anyone who contributed materials essential for the study. If a language editor has made significant revision of the manuscript, we recommend that you acknowledge the editor by name, where possible.

The role of a scientific (medical) writer must be included in the acknowledgements section, including their source(s) of funding. We suggest wording such as 'We thank Jane Doe who provided medical writing services on behalf of XYZ Pharmaceuticals Ltd.'

Authors should obtain permission to acknowledge from all those mentioned in the Acknowledgements section.

Endnotes

Endnotes should be designated within the text using a superscript lowercase letter and all notes (along with their corresponding letter) should be included in the Endnotes section. Please format this section in a paragraph rather than a list.

References

All references, including URLs, must be numbered consecutively, in square brackets, in the order in which they are cited in the text, followed by any in tables or legends. Each reference must have an individual reference number. Please avoid excessive referencing. If automatic numbering systems are used, the reference numbers must be finalized and the bibliography must be fully formatted before submission.

Only articles, datasets, clinical trial registration records and abstracts that have been published or are in press, or are available through public e-print/preprint servers, may be cited; unpublished abstracts, unpublished data and personal communications should not be included in the reference list, but may be

included in the text and referred to as "unpublished observations" or "personal communications" giving the names of the involved researchers. Obtaining permission to quote personal communications and unpublished data from the cited colleagues is the responsibility of the author. Footnotes are not allowed, but endnotes are permitted. Journal abbreviations follow Index Medicus/MEDLINE. Citations in the reference list should include all named authors, up to the first 30 before adding 'et al.'..

Any *in press* articles cited within the references and necessary for the reviewers' assessment of the manuscript should be made available if requested by the editorial office.

Style files are available for use with popular bibliographic management software:

- [BibTeX](#)
- [EndNote style file](#)
- [Reference Manager](#)
- [Zotero](#)

Examples of the *Stem Cell Research & Therapy* reference style are shown [below](#). Please ensure that the reference style is followed precisely; if the references are not in the correct style they may have to be retyped and carefully proofread.

All web links and URLs, including links to the authors' own websites, should be given a reference number and included in the reference list rather than within the text of the manuscript. They should be provided in full, including both the title of the site and the URL, in the following format: **The Mouse Tumor Biology Database** [http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do]. If an author or group of authors can clearly be associated with a web link, such as for weblogs, then they should be included in the reference.

Examples of the Stem Cell Research & Therapy reference style

Article within a journal

Koonin EV, Altschul SF, Bork P: **BRCA1 protein products: functional motifs.** *Nat Genet* 1996, **13**:266-267.

Article within a journal supplement

Orengo CA, Bray JE, Hubbard T, LoConte L, Sillitoe I: **Analysis and**

assessment of ab initio three-dimensional prediction, secondary structure, and contacts prediction. *Proteins* 1999, **43**(Suppl 3):149-170.

In press article

Kharitonov SA, Barnes PJ: **Clinical aspects of exhaled nitric oxide.** *Eur Respir J*, in press.

Published abstract

Zvaifler NJ, Burger JA, Marinova-Mutafchieva L, Taylor P, Maini RN: **Mesenchymal cells, stromal derived factor-1 and rheumatoid arthritis [abstract].** *Arthritis Rheum* 1999, **42**:s250.

Article within conference proceedings

Jones X: **Zeolites and synthetic mechanisms.** In *Proceedings of the First National Conference on Porous Sieves: 27-30 June 1996; Baltimore*. Edited by Smith Y. Stoneham: Butterworth-Heinemann; 1996:16-27.

Book chapter, or article within a book

Schnepf E: **From prey via endosymbiont to plastids: comparative studies in dinoflagellates.** In *Origins of Plastids. Volume 2*. 2nd edition. Edited by Lewin RA. New York: Chapman and Hall; 1993:53-76.

Whole issue of journal

Ponder B, Johnston S, Chodosh L (Eds): **Innovative oncology.** In *Breast Cancer Res* 1998, **10**:1-72.

Whole conference proceedings

Smith Y (Ed): *Proceedings of the First National Conference on Porous Sieves: 27-30 June 1996; Baltimore*. Stoneham: Butterworth-Heinemann; 1996.

Complete book

Margulis L: *Origin of Eukaryotic Cells*. New Haven: Yale University Press; 1970.

Monograph or book in a series

Hunninghake GW, Gadek JE: **The alveolar macrophage.** In *Cultured Human Cells and Tissues*. Edited by Harris TJR. New York: Academic Press; 1995:54-56. [Stoner G (Series Editor): *Methods and Perspectives in Cell Biology*, vol 1.]

Book with institutional author

Advisory Committee on Genetic Modification: *Annual Report*. London; 1999.

PhD thesis

Kohavi R: **Wrappers for performance enhancement and oblivious decision graphs.** *PhD thesis*. Stanford University, Computer Science Department; 1995.

Link / URL

The Mouse Tumor Biology Database

[<http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do>]

Link / URL with author(s)

Corpas M: The Crowdfunding Genome Project: a personal genomics community with open source values

[<http://blogs.biomedcentral.com/bmcblog/2012/07/16/the-crowdfunding-genome-project-a-personal-genomics-community-with-open-source-values/>]

Dataset with persistent identifier

Zheng, L-Y; Guo, X-S; He, B; Sun, L-J; Peng, Y; Dong, S-S; Liu, T-F; Jiang, S; Ramachandran, S; Liu, C-M; Jing, H-C (2011): **Genome data from sweet and grain sorghum (*Sorghum bicolor*)**. *GigaScience*.

<http://dx.doi.org/10.5524/100012>.

Clinical trial registration record with persistent identifier

Mendelow, AD (2006): **Surgical Trial in Lobar Intracerebral Haemorrhage**.

Current Controlled Trials. <http://dx.doi.org/10.1186/ISRCTN22153967>

Preparing illustrations and figures

Illustrations should be provided as separate files, not embedded in the text file. Each figure should include a single illustration and should fit on a single page in portrait format. If a figure consists of separate parts, it is important that a single composite illustration file be submitted which contains all parts of the figure. There is no charge for the use of color figures.

Please read our [figure preparation guidelines](#) for detailed instructions on maximising the quality of your [figures](#).

Formats

The following file formats can be accepted:

- PDF (preferred format for diagrams)
- DOCX/DOC (single page only)
- PPTX/PPT (single slide only)
- EPS
- PNG (preferred format for photos or images)
- TIFF
- JPEG

- BMP

Stem Cell Research & Therapy will edit all figures supplied by the author. For this reason it is especially important that authors should supply figures in vector form, to facilitate such editing.

Figure legends

The legends should be included in the main manuscript text file at the end of the document, rather than being a part of the figure file. For each figure, the following information should be provided: Figure number (in sequence, using Arabic numerals - i.e. Figure 1, 2, 3 etc); short title of figure (maximum 15 words); detailed legend, up to 300 words.

Please note that it is the responsibility of the author(s) to obtain permission from the copyright holder to reproduce figures or tables that have previously been published elsewhere.

Preparing a personal cover page

If you wish to do so, you may submit an image which, in the event of publication, will be used to create a cover page for the PDF version of your article. The cover page will also display the journal logo, article title and citation details. The image may either be a figure from your manuscript or another relevant image. You must have permission from the copyright to reproduce the image. Images that do not meet our requirements will not be used.

Images must be 300dpi and 155mm square (1831 x 1831 pixels for a raster image).

Allowable formats - EPS, PDF (for line drawings), PNG, TIFF (for photographs and screen dumps), JPEG, BMP, DOC, PPT, CDX, TGF (ISIS/Draw).

Preparing tables

Each table should be numbered and cited in sequence using Arabic numerals (i.e. Table 1, 2, 3 etc.). Tables should also have a title (above the table) that summarizes the whole table; it should be no longer than 15 words. Detailed legends may then follow, but they should be concise. Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

Smaller tables considered to be integral to the manuscript can be pasted into the end of the document text file, in A4 portrait or landscape format. These will be typeset and displayed in the final published form of the article. Such tables

should be formatted using the 'Table object' in a word processing program to ensure that columns of data are kept aligned when the file is sent electronically for review; this will not always be the case if columns are generated by simply using tabs to separate text. Columns and rows of data should be made visibly distinct by ensuring that the borders of each cell display as black lines. Commas should not be used to indicate numerical values. Color and shading may not be used; parts of the table can be highlighted using symbols or bold text, the meaning of which should be explained in a table legend. Tables should not be embedded as figures or spreadsheet files.

Larger datasets or tables too wide for a landscape page can be uploaded separately as additional files. Additional files will not be displayed in the final, laid-out PDF of the article, but a link will be provided to the files as supplied by the author.

Tabular data provided as additional files can be uploaded as an Excel spreadsheet (.xls) or comma separated values (.csv). As with all files, please use the standard file extensions.

Preparing additional files

Although *Stem Cell Research & Therapy* does not restrict the length and quantity of data included in an article, we encourage authors to provide datasets, tables, movies, or other information as additional files.

Please note: All Additional files **will be published** along with the article. Do not include files such as patient consent forms, certificates of language editing, or revised versions of the main manuscript document with tracked changes. Such files should be sent by email to editorial@stemcellres.com, quoting the Manuscript ID number.

Results that would otherwise be indicated as "data not shown" can and should be included as additional files. Since many weblinks and URLs rapidly become broken, *Stem Cell Research & Therapy* requires that supporting data are included as additional files, or deposited in a recognized repository. Please do not link to data on a personal/departmental website. The maximum file size for additional files is 20 MB each, and files will be virus-scanned on submission.

Additional files can be in any format, and will be downloadable from the final published article as supplied by the author.

Certain supported files formats are recognized and can be displayed to the user in the browser. These include most movie formats (for users with the Quicktime plugin), mini-websites prepared according to our guidelines, chemical structure files (MOL, PDB), geographic data files (KML).

If additional material is provided, please list the following information in a separate section of the manuscript text:

- File name (e.g. Additional file 1)
- File format including the correct file extension for example .pdf, .xls, .txt, .pptx (including name and a URL of an appropriate viewer if format is unusual)
- Title of data
- Description of data

Additional files should be named "Additional file 1" and so on and should be referenced explicitly by file name within the body of the article, e.g. 'An additional movie file shows this in more detail [see Additional file 1]'.

Additional file formats

Ideally, file formats for additional files should not be platform-specific, and should be viewable using free or widely available tools. The following are examples of suitable formats.

- Additional documentation
 - PDF (Adobe Acrobat)
- Animations
 - SWF (Shockwave Flash)
- Movies
 - MP4 (MPEG 4)
 - MOV (Quicktime)
- Tabular data
 - XLS, XLSX (Excel Spreadsheet)
 - CSV (Comma separated values)

As with figure files, files should be given the standard file extensions.

Style and language

General

Currently, *Stem Cell Research & Therapy* can only accept manuscripts written in English. Spelling should be US English or British English, but not a mixture.

There is no explicit limit on the length of articles submitted, but authors are encouraged to be concise.

Language editing

For authors who wish to have the language in their manuscript edited by a native-English speaker with scientific expertise, BioMed Central recommends [Edanz](#). BioMed Central has arranged a 10% discount to the fee charged to BioMed Central authors by Edanz. Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication. Please contact [Edanz](#) directly to make arrangements for editing, and for pricing and payment details.

Help and advice on scientific writing

The abstract is one of the most important parts of a manuscript. For guidance, please visit our page on [Writing titles and abstracts for scientific articles](#).

Tim Albert has produced for BioMed Central a [list of tips](#) for writing a scientific manuscript. [American Scientist](#) also provides a list of resources for science writing. For more detailed guidance on preparing a manuscript and writing in English, please visit the [BioMed Central author academy](#).

Abbreviations

Abbreviations should be used as sparingly as possible. They should be defined when first used and a list of abbreviations can be provided following the main manuscript text.

Typography

- Please use double line spacing.
- Type the text unjustified, without hyphenating words at line breaks.
- Use hard returns only to end headings and paragraphs, not to rearrange lines.
- Capitalize only the first word, and proper nouns, in the title.
- All pages should be numbered.
- Use the *Stem Cell Research & Therapy* [reference format](#).
- Footnotes are not allowed, but endnotes are permitted.

- Please do not format the text in multiple columns.
- Greek and other special characters may be included. If you are unable to reproduce a particular special character, please type out the name of the symbol in full. **Please ensure that all special characters used are embedded in the text, otherwise they will be lost during conversion to PDF.**

Units

SI units should be used throughout (liter and molar are permitted, however).