

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS AUTÓLOGAS
PARA TRATAMENTO DE ÉGUAS COM ENDOMETRITE CRÔNICA
DEGENERATIVA**

GIOVANA D'ANDRÉA PAVÃO

**Botucatu-SP
Fevereiro 2013**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS AUTÓLOGAS
PARA TRATAMENTO DE ÉGUAS COM ENDOMETRITE CRÔNICA
DEGENERATIVA**

GIOVANA D'ANDRÉA PAVÃO

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Botucatu junto ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária para obtenção do título de Doutora em Medicina Veterinária. Área de concentração Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Alvarenga

Botucatu-SP
Fevereiro 2013

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

Pavão, Giovana D´Andréa.

Utilização de células tronco mesenquimais autólogas para o tratamento de éguas com endometrite crônica degenerativa / Giovana D´Andréa Pavão. – Botucatu : [s.n.], 2013

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

Orientador: Marco Antonio Alvarenga

Capes: 40101002

1. Tratamento veterinário. 2. Células-tronco. 3. Égua. 4. Endométrio - Doenças – Tratamento.

Palavras-chave: Célula tronco mesenquimal; Éguas; Endometrite.

Nome do autor: Giovana D'Andréa Pavão. Título: **Utilização de Célula Tronco Mesenquimal Autóloga para o Tratamento de éguas com Endometrite Crônica Degenerativa**

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Marco Antonio Alvarenga

Orientador

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP Botucatu

Prof. Dr. Rogério Martins Amorim

Membro. Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ- UNESP Botucatu

Prof. Dr. José Antonio Dell'Aqua Júnior

Membro. Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP Botucatu

Prof. Dr. Márcio Teoro do Carmo

Membro. Pós Doutor em Medicina Veterinária

Profa Dra Cláudia Barbosa Fernandes

Membro do. Departamento de Reprodução Animal

VRA- USP

Data da Defesa: 4 de Fevereiro de 2013

Dedicatória

Dedico este trabalho à Deus por me guiar em todos meus caminhos

Aos meus pais Sonia Marina D'Andréa Pavão e José Antonio Geraldo Rodrigues Pavão e à minha irmã Alessandra D'Andréa Pavão Bellot pelo incentivo e presença em todos os momentos

Agradecimentos

Primeiramente agradeço à Deus!

Agradeço minha mãe e meu pai e irmã pelo incentivo, motivação e participação em todas as minhas etapas

Agradeço meu namorado Edson Luiz Pontes Perger, por toda paciência, amor e incentivo nesta fase.

Agradeço meus grandes amigos André Escobar, Karen Batsckhi, Tajuji Ackel Orta e Suzana Kirata pela amizade e companheirismo e incentivo

Agradeço meu orientador Marco Antonio Alvarenga por toda dedicação, paciência e contribuição intensa pela confecção deste trabalho. Obrigada pelos ensinamentos que proporcionou durante esta fase.

Agradeço ao colega Márcio Teoro do Carmo pela amizade, dedicação e participação em todo o trabalho

Agradeço a Profa Fernanda Landim pelo carinho, amizade e contribuição integral desde os tempos do Mestrado até o Doutorado

Agradeço o colega Ian por ajudar e participar na imunohistoquímica

Agradeço todos estagiários, funcionários, docentes e colegas da pós graduação do Departamento de Reprodução Animal pela convivência e participação direta ou indireta nesta fase

Agradeço a Deus e a MeishuShama!

Lista de Figuras

- Figura 01:** Agulha de punção de medula óssea da marca *Jamshid* (A) e coleta da Medula Óssea (MO) do esterno da égua com seringa contendo Heparina e DPBS (B)..... 16
- Figura 02:** Filtragem das amostras de sangue com Equipo para transfusão sanguínea (A) e centrifugação a 1500rpm (B).....16
- Figura 03:** Amostra da medula óssea junto com o gradiente Ficoll antes da centrifugação (A) e Presença de “halo” transparente constituído de células mononucleares (B).....17
- Figura 03:** Amostra da medula óssea junto com o gradiente de densidade “Ficoll” antes da centrifugação (A) e após a centrifugação em 1500 rpm, presença de “halo” transparente constituído de células mononucleares (B).....17
- Figura 04:** Aspecto das células mesenquimais eqüinas em cultivo *in vitro* (A) Início da aderência das células demonstrando aspecto arredondado. (B) Células aderidas com morfologia alongada semelhante a fibroblastos. (C) Confluência de 80% de linhagem celular indiferenciada.....18
- Figura 05:** Processo de coleta do tecido adiposo de equino. Realização da assepsia e incisão na região paralela a base da cauda (A-G); Retirada do fragmento de gordura (H); Sutura e incisão (I-J); Tecido Adiposo coletado (K).....19
- Figura 06:** Célula Tronco Mesenquimal (CTMs) do tecido adiposo de equino cultivadas *in vitro*, (A) Células aderidas com morfologia arredondada e algumas com aspecto fibroblastóide; (B) Crescimento *in vitro* das CTMs com morfologia alongada e aspecto semelhante a fibroblastos. (C) Confluência de 80% das CTMs formando uma linhagem celular.....20
- Figura 07:** Agulha de esclerose humana utilizada para a injeção das células tronco mesenquimais através da endoscopia.....25

Figura 08: Administração de célula tronco mesenquimal no endométrio das éguas com agulha de esclerose (seta) associada ao endoscópio.....25

Figura 09: Foto da avaliação histológica de égua (n⁰08) previamente ao tratamento (D0) com célula tronco do estrato compacto (A) e do estrato esponjoso (B), observa-se baixa densidade glandular. Aumento de 200x.....34

Figura 10: Foto da avaliação histológica de égua (n⁰08) após o tratamento com célula tronco (D60) no estrato compacto (A) e no estrato esponjoso (B), observa-se uma evidente melhora na densidade e na distribuição glandular. Aumento de 200x.....35

Figura 11: Avaliação histológica uterina através da coloração de Masson em égua (égua 02) previamente ao tratamento com célula tronco (A), observa-se uma grande área de fibrose (marcado em azul) no corte histológica representando o estrato esponjoso. Após 60 dias do tratamento (B), observa-se uma diminuição no grau de fibrose (coloração azul) e aumento da distribuição glandular. Aumento de 200x.....40

Figura 12: Avaliação histológica em égua (égua 02) previamente ao tratamento com célula tronco, (A) observando-se uma grande área de fibrose (marcado em verde por meio da aplicação do Software AVSOFT BIOVIEW, 2006) no corte histológico representando a o estrato esponjoso. A avaliação histológica de fibrose uterina na mesma égua após 60 dias de tratamento demonstra uma diminuição no grau de fibrose no corte histológico bem como aumento na distribuição glândular (B). Aumento de 200x.....40

Figura 13: Avaliação Imunoistoquímica do colágeno tipo III em égua (égua 01) tratada com célula tronco. (A) No D0 observa uma grande área marrom escura entre as glândulas (setas), indicando a presença de colágeno tipo III. Além disso foi observada uma menor densidade glandular aumento de 200x. (B) Avaliação Imunoistoquímica do colágeno tipo III em égua tratada com célula tronco no D60 (B). Observa uma diminuição no tom de marrom, indicando uma diminuição no colágeno tipo III, associada a uma maior densidade glandular. Aumento de 200x.....43

Figura 14: Avaliação Imunoistoquímica do colágeno tipo III em égua (égua 01) tratada com célula tronco. No D0 (A) a marcação verde, através do programa computadorizado demonstra a presença de colágeno tipo III entre as glândulas endometriais, aumento de 200x. Após 60 dias do tratamento com células tronco (B) a coloração verde, demonstra uma diminuição no colágeno tipo III entre as glândulas endometriais. Aumento de 200x.....44

Lista de Gráficos

- Gráfico 01:** Representação do número médio de decréscimo da quantidade de ninho glandular entre os tempos D0, D15 e D60.....32
- Gráfico 02:** Representação do percentual de decréscimo da quantidade de ninhos glandulares do D0 até o D15 e do D0 ao D60.....33
- Gráfico 03:** Gráfico representando as modas da classificação do infiltrado inflamatório no estrato compacto do endométrio entre o início do tratamento D0 e após o tratamento D15, D30 e D60 seguindo classificação por escore 1- Ausente; 2- Ausente/Leve; 3- Leve; 4- Leve/Moderado; 5- Moderado; 6- Moderado/Severo; 7- Severo.....36
- Gráfico 04:** Gráfico representando as modas da classificação do infiltrado inflamatório difuso no início do tratamento (D0) e após o tratamento (D15 até D60) seguindo o escore sendo - Ausente; 2- Ausente/Leve; 3- Leve; 4- Leve/Moderado; 5- Moderado; 6- Moderado/Severo; 7- Severo.....37
- Gráfico 5:** Representação gráfica da evolução ao longo do tempo (D0 e D60) da área de fibrose por meio da Coloração de Tricrômio de Masson, demonstrando diminuição do percentual de área com fibrose.....38

Lista de Tabelas

- Tabela 01:** Caracterização das células tronco mesenquimais obtidas da medula óssea e do tecido adiposo.....22
- Tabela 02:** Média e erro padrão da média do número de ninhos glandulares ao longo do tempo.....32
- Tabela 03:** Mediana da classificação do infiltrado inflamatório agudo caracterizado pela presença de neutrófilos no estrato compacto do endométrio entre os momentos.....36
- Tabela 04:** Mediana da classificação da presença de infiltrado inflamatório difuso de células mononucleares no estrato esponjoso entre os momentos.....37
- Tabela 05:** Análise computadorizada do número médio (\pm erro padrão) de glândulas endometriais contadas em cinco campos histológicos aleatórios nos diferentes tempos.....38
- Tabela 06:** Área (pixel^2) média (\pm erro padrão) de fibrose (Coloração de Masson) contadas em dez campos histológicos aleatórios de cada biópsia nos diferentes grupos.....38
- Tabela 07:** Mediana do escore para presença de colágeno tipo III marcado através de imunohistoquímica ao longo do tempo.....41
- Tabela 08:** Mediana da classificação da Intensidade de marcação da coloração das lâminas de imunohistoquímica de colágeno tipo III (fibrose) entre (D0-D60).....41
- Tabela 09:** Mediana da classificação da distribuição da imunohistoquímica de colágeno tipo III (fibrose) entre os momentos D0 até D60.....41
- Tabela 10:** Área (pixel^2) média (\pm erro padrão) de colágeno III (Imunohistoquímica) contadas em dez campos histológicos aleatórios de cada biópsia.....42

PAVÃO, G.D. **Utilização de Células Tronco Mesenquimais Autólogas para tratamento de éguas com Endometrite Crônica Degenerativa.** Botucatu, 2013. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O trabalho teve por objetivo avaliar a eficiência da terapia celular no tratamento do endométrio de éguas com processo degenerativo crônico caracterizado pela presença de fibrose uterina. Foram utilizadas 10 éguas, de raça Quarto de Milha com idade entre 14 e 23 anos, com massa corpórea entre 400 a 600 Kg, e bom escore corporal com históricos reprodutivos de subfertilidade e grau severo de fibrose uterina detectada previamente pelo exame histológico realizado por meio da biópsia endometrial. O material foi coletado no dia zero (D0) antes do tratamento com células tronco mesenquimais (CTMs) e 15 dias (D15), 30 dias (D30) e 60 dias (D60) após o tratamento. As amostras foram classificadas segundo o modelo proposto por Kenney & Doig (1986) em grau de fibrose: Grau I - normal, Grau IIA – inflamação crônica leve, Grau IIB – inflamação crônica com infiltrado moderado, Grau III – inflamação crônica degenerativa grave. Estas amostras foram submetidas à confecção de lâminas para coloração de Tricrômio de Masson, Coloração de Hematoxilina e Eosina (HE) e Imunohistoquímica. A punção da medula óssea foi realizada em 10 éguas com idade entre 14 e 23 anos e o material coletado foi submetido ao Laboratório. O cultivo celular *in vitro* foi realizado em meio DMEM alta glicose em estufa com 37,5°C, em atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% de CO₂. Após atingir a confluência de 80% na placa de cultivo, estas células foram removidas e injetadas intra-endometrial com uma concentração de 2x10⁷ células/mL em um volume de 0,5 ml em 20 (vinte) diferentes pontos (sítio de administração) espaçados entre um centímetro, com o auxílio de endoscópio flexível, totalizando um volume de 10 mL aplicado. Nas avaliações realizadas, verificou-se diminuição significativa dos ninhos glandulares, mudança significativa de células polimorfonucleares de ausente no início do tratamento (D0) à moderado 60 dias após (D60); alteração de células mononucleares indo de leve no D0 à moderado no D60; aumento significativo do número de glândulas endometriais; diminuição da marcação do colágeno III avaliado pelo software tendo $\geq 75\%$ de fibrose no D0 e $\leq 24\%$ no D60; diminuição da intensidade de marcação do colágeno III avaliado pelo software entre o início e após o tratamento com CTMs; não houve alteração significativa em relação a distribuição de colágeno III entre os momentos; porém houve tendência na diminuição da área de colágeno III entre D0 e D60. Assim, podemos concluir que o tratamento com CTMs foi eficaz em melhorar a distribuição glandular, e diminuir área de fibrose, sem promover processo inflamatório exacerbado.

Palavras-chave: Célula Tronco Mesenquimal, Endometrite, Éguas

PAVÃO, GD. **Use of Mesenchymal Stem Cells Autologues to treat mares with endometritis crônica degenerativa.** Botucatu, 2013. Thesis (Ph.D.) - School of Veterinary Medicine, Campus of Botucatu, São Paulo State University. Botucatu, 2013. Thesis (Ph.D.) - School of Veterinary Medicine, Campus of Botucatu, São Paulo State University.

ABSTRACT

The study aimed to evaluate the efficiency of cell therapy in the treatment of endometrial mares with chronic degenerative process characterized by the presence of uterine fibroids. We used 10 mares bred Quarter Horses aged between 14 and 23 years, with body mass between 400 and 600 kg, with good body and reproductive history of subfertility and severe degree of uterine fibrosis detected previously by histological examination performed by endometrial biopsy. The material was collected on day zero (D0) before treatment with mesenchymal stem cells (MSCs) and 15 days (D15), 30 days (D30) and day 60 (D60) post-treatment. The samples were classified according to the model proposed by Kenney & Doig (1986) in fibrosis: Grade I - normal, Grade IIA - mild chronic inflammation, IIB Grade - moderate chronic inflammatory infiltrate, Grade III - severe degenerative chronic inflammation. These samples were submitted for preparation of slides for staining Masson's trichrome, hematoxylin and eosin staining (HE) and immunohistochemistry. A bone marrow puncture was performed in 10 mares aged between 14 and 23 years and the collected material was submitted to the Laboratory. The in vitro cell cultivation was performed in DMEM with high glucose kiln 37.5 ° C in humidified atmosphere containing 95% air and 5% CO₂. After reaching 80% confluence on plate culture, these cells were removed and injected intra-endometrial at a concentration of 2x10⁷ cells \ ml in a volume of 0.5 ml for 20 (twenty) different point (site of administration) spaced of an inch, with the aid of flexible endoscope, for a total volume of 10 ml applied. In the assessments, there was a significant reduction in glandular nests, change polymorphonuclear cell siginificativa absent at baseline (D0) to moderate 60 days (D60); amendment of mononuclear cells in going from mild to moderate in D0 D60; significant increase in the number of endometrial glands, decreased collagen III marking software and evaluated by $\geq 75\%$ and \leq D0 fibrosis in 24% D60; decreased intensity staining of collagen III evaluated by the software from the beginning and after treatment with MSCs, there was no significant change in the distribution ratio of collagen III between moments, but there was a trend in the reduction of the area of collagen III between D0 and D60. We conclude that treatment with MSCs was effective in improving the glandular distribution, and reducing the area of fibrosis without promoting inflammation exacerbated.

Keywords: Mesenchymal Stem Cell, Endometritis, Mares

SUMÁRIO

RESUMO	XI
ABSTRACT	XII
1.INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
3. OBJETIVO	14
4. PRÉ-EXPERIMENTO	15
4.1 Material e Métodos.....	15
4.1.2 Coleta e Cultivo das Células Tronco Mesenquimais obtidas da Medula Óssea.....	15
a) Punção Aspirativa da medula óssea.....	15
b) Isolamento e Cultivo das Células Tronco Mesenquimais da Medula Óssea.....	15
4.1.3 Coleta e Cultivo das Células Tronco obtidas do Tecido Adiposo.....	18
a) Obtenção do tecido adiposo.....	18
b) Isolamento e Cultivo das Células Tronco Mesenquimais do Tecido Adiposo.....	19
4.2 Viabilidade das Células Tronco Mesenquimais da Medula Óssea e do Tecido Adiposo	20
4.3 Caracterização das Células Tronco Mesenquimais da Medula Óssea e do Tecido Adiposo	21
4.4 Diferenciação para tecido óssea, cartilaginosa e gordurosa.....	21
4.5 Resultados do Pré-Experimento.....	22
5. EXPERIMENTO: Avaliação do Potencial Terapêutico das Células TroncoMesenquimais obtidas da Medula Óssea em Éguas com Fibrose Uterina.....	24
5.1 MATERIAL E MÉTODOS	24
5.1.1 Transferência das Células Tronco Mesenquimais para o útero das éguas...24	
5.1.2 Avaliação Histológica	26

5.1.2.1 Hematoxilina e Eosina (HE).....	26
5.1.2.2 Coloração de Tricrômio de Masson	26
5.1.2.3 Imunohistoquímica	26
5.1.2.3.1 Quantificação de colágeno tipo III	27
5.1.2.3.2 Intensidade de marcação para colágeno tipo III.....	27
5.1.2.3.3 Distribuição da quantidade de colágeno tipo III	27
5.1.2.3.4 Área de colágeno tipo III	27
5.2 Processamento dos fragmentos obtidos	27
5.3 Padronização da Técnica de Imunohistoquímica.....	28
6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
7. RESULTADOS	32
7.1 Resultados da avaliação histológica.....	32
7.2 Resultados da avaliação por Imunohistoquímica	41
8. DISCUSSÃO	45
9. CONCLUSÃO	54
10. REFERÊNCIAS	55

1- INTRODUÇÃO

A equideocultura Brasileira ocupa posição de destaque internacional não só pelo expressivo número de animais, sendo a segunda maior população de eqüinos puros de raça do mundo, como também pela excelência de seu plantel. Adicionalmente, a indústria do cavalo é uma importante área geradora de divisas e empregos no Brasil. Nosso país é hoje também um país de referência no estudo e na utilização de biotécnicas aplicadas a reprodução eqüina. Técnicas de reprodução assistida como: a inseminação artificial, congelação de sêmen e embriões, transferência de embriões (T.E.), transferência de oócito (T.O), Produção de Embrião *in vitro* (P.I.V.), inseminação intracitoplasmática (I.C.S.I.) e transferência de gametas intra-falopiana (G.I.F.T.), tem despertado grande interesse entre criadores e associações de criadores de cavalos.

Desta forma a falha da concepção tem sido assunto de grande interesse frente ao seu impacto na equideocultura. Existem muitas razões pelas quais éguas falham na concepção, estando a eficiência reprodutiva da fêmea eqüina diretamente correlacionada com a capacidade uterina de manter um ambiente adequado para o desenvolvimento embrionário, crescimento fetal e parto normal. A endometrite é uma das principais causas de redução da fertilidade em éguas (TROEDSSON, 1999; ALVARENGA, 1996).

A endometrite em éguas é dividida em: endometrite induzida pelo acasalamento, infecção uterina por microorganismos e endometrite crônica degenerativa (LEBLANC, 2003; TROEDSSON, 1997; RICKETTS, 1987), tendo as alterações inflamatórias e fibróticas do útero classificadas por Kenney & Doig, (1986), que dividiu-as em categorias I, II e III correspondendo como inflamação e ou fibrose, mínima, discreta a moderada e severa respectivamente.

Com o intuito de se aumentar a eficiência do tratamento destas afecções uma série de procedimentos tem sido realizados. No entanto, algumas éguas denominadas susceptíveis, não respondem bem aos tratamentos convencionais e não conseguem debelar a infecção de uma forma eficiente, a qual se torna persistente, sub-clínica e/ou crônica. Nestes animais com exacerbação do processo inflamatório se estabelece um alto grau de fibrose peri-glandular, o que leva a queda drástica da fertilidade da fêmea (KENNEY & DOIG, 1986).

O interesse na aplicação de terapia celular com células tronco, tem se tornado uma ferramenta importante no tratamento de diversas afecções, merecendo, na espécie equina, destaque das terapias celulares para lesão de tendão (FORTIER e SMITH, 2008). No entanto, a aplicação desta biotecnologia para re-introduzir animais sub-férteis de alto valor genético a reprodução plena tem sido pouco explorada.

As células-tronco possuem a capacidade de se auto-regenerar e se diferenciar em diversos tipos celulares. Estas células têm um papel importante no desenvolvimento dos seres vivos e um enorme potencial de utilização em medicina regenerativa. As células-tronco classificam-se em embrionárias, obtidas da massa celular interna de embriões no início de seu desenvolvimento e, somáticas, ou adultas, encontradas em tecidos já diferenciados de fetos, recém nascidos ou adultos (FRIEL et al., 2005). As células-tronco somáticas podem ser obtidas da medula óssea, do sangue periférico, do cordão umbilical, do tecido adiposo e do fígado (HERZOG et al., 2003).

Células-tronco obtidas de medula óssea têm sido usadas na prática médica como fonte de células hematopoiéticas e os transplantes de medula fazem parte do tratamento de doenças hematológicas há várias décadas. As células-tronco hematopoiéticas promovem a reconstituição hematopoiética e de outros tecidos, estando presentes no embrião, sangue periférico, medula óssea e sangue do cordão umbilical (HERZOG et al., 2003).

Mais recentemente observou-se que na medula óssea há um outro tipo de células-tronco—denominada célula tronco mesenquimal (CTM) que têm alta capacidade de se renovar e diferenciar em várias linhagens de tecido conjuntivo. Em determinadas condições, as CTM podem dar origem a células de diversos tecidos incluindo cartilagem, osso, músculo e gordura (REYES, et al., 2001). Além da medula óssea, CTM podem ser isoladas também do tecido adiposo, de vários tecidos fetais e numerosos outros tecidos de adultos. A propriedade básica que permite o isolamento e a cultura de células-tronco mesenquimais é sua facilidade de aderir a superfícies como vidro e plástico (CONRAD & HUSS, 2005).

A terapia celular visa à recuperação de tecidos e órgãos lesados por meio da introdução de novas células, capazes de colonizar as áreas afetadas e restabelecer a função previamente perdida. Esta terapia possibilita o tratamento de doenças degenerativas, congênitas, traumas e injúrias das mais variadas etiologia. Trabalhos recentes demonstram que o uso das células tronco diminui a fibrose hepática promovendo significativa melhora clínica de humanos acometidos por problemas

hepáticos (LYRA et al. 2007; FANG *et al.* 2004). Desta forma, o uso da terapia com células tronco apresenta-se como uma possível ferramenta no tratamento regenerativo do processo degenerativo crônico endometrial em éguas caracterizado pela presença de fibrose uterina.

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Endometrite na égua

A endometrite é uma doença uterina que envolve inflamação, fibrose e muitas vezes infecção do endométrio de éguas, sendo uma das causas mais importantes e frequentes de infertilidade e de baixa eficiência reprodutiva nos criatórios de cavalos (ALVARENGA, 1996; TROEDSSON, 1999).

A infecção do trato reprodutivo agrava-se em éguas mais velhas, principalmente após cobertura, parto e excessivas coletas de embriões mal manejadas (LOSINNO & ALVARENGA, 2006). No entanto, a mucosa do trato reprodutivo possui um sistema imune pelo qual bactérias, fungos, sêmen e contaminantes como fezes e urina são retirados do útero por uma combinação entre os fatores celulares e humorais (ALVARENGA, 2008). Além disso, mecanismos de drenagem linfática também atuam na limpeza do ambiente uterino. Quando existe falha ou incompetência em qualquer um desses mecanismos naturais de defesa, a endometrite pode se instalar levando à infertilidade (LEBLANC, 2003, ASBURY, 1986).

Baseado na etiologia e patogenia, a endometrite em éguas é dividida em: endometrite induzida pela cobertura, infecção uterina por microorganismos e endometrite crônica degenerativa (LEBLANC, 2003; TROEDSSON, 1997; RICKETTS, 1987).

Nas endometrites induzidas pela cobertura, o tratamento para as éguas susceptíveis é baseado na rápida remoção dos fluidos inflamatórios acumulados no útero. Isto pode ser feito com lavagem do útero para remover debris e pela administração de drogas que estimulem a contração da musculatura uterina. Alterações degenerativas do endométrio são resultantes de inflamação repetida do útero, porém, também podem ser observadas em fêmeas mais velhas relacionado à idade do animal. Éguas com degeneração fibrótica do endométrio são tipicamente mais idosas e pluríparas. Geralmente sua habilidade para se tornar gestante e levar a gestação a termo é altamente comprometida (TROEDSSON, 1997; ALVARENGA, 1996;). O diagnóstico para essa enfermidade é confirmado por citologia e biópsia endometrial (TROEDSSON, 1999; ALVARENGA & IWANA de MATTOS, 1990).

As alterações inflamatórias e fibróticas do útero foram classificadas por Kenney & Doig, (1986), dividindo-as em categorias I, II e III correspondendo como inflamação

e ou fibrose, mínima, discreta a moderada e severa respectivamente. As reações inflamatórias crônicas podem envolver tanto o estrato compacto como o estrato esponjoso, sendo frequentemente encontradas com distribuição difusa ou multifocal. No estroma, as reações podem compreender tanto regiões periglandulares como vasos sanguíneos, veias e capilares. A patogênese da fibrose periglandular é desconhecida apesar de a idade, partições e aplicações medicamentosas cáusticas serem fatores contribuintes para este problema. O infiltrado inflamatório presente nas endometrites crônicas é composto por linfócitos e menos comumente por plasmócitos, eosinófilos e mastócitos (KENNEY & DOIG, 1986).

Quando se inicia um processo inflamatório, ocorre liberação de mediadores químicos da inflamação que induzem alguns eventos como aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular ocasionado pela liberação de substâncias vasoativas como a histamina liberada pelos mastócitos, quimiotaxia que é um fenômeno pelo qual os tipos celulares são atraídos por algumas moléculas, além de ser responsável pela migração de grandes quantidade de tipos celulares específicos para as regiões de inflamação e ação dos leucócitos que cruzam as paredes de vênulas e capilares pelo processo de diapedese, invadindo a área inflamada ocorrendo a fagocitose (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

No útero de éguas que apresentam endometrite aguda, ocorre o predomínio de neutrófilos polimorfonucleares no estrato compacto e entre as células do epitélio luminal, migrando para o lúmen uterino (KENNEY & DOIG, 1986). Em casos mais severos, os neutrófilos podem ser encontrados em camadas mais profundas da lâmina própria, com a presença de glândulas dilatadas contendo neutrófilos degenerados (DOIG & WAELCHLI, 1992).

Nas endometrites crônicas, ocorre predomínio de células mononucleares, linfócitos e plasmócitos, não sendo tão frequente a presença de macrófagos, eosinófilos e mastócitos. As infiltrações celulares crônicas aparecem de forma difusa ou focal no estrato compacto e no estrato esponjoso (periglandular e perivascular), além da fibrose que é permanente e representa um fator limitante à performance reprodutiva da égua (KENNEY & DOIG, 1986).

2.2 Terapias Aplicadas à Endometrite Crônica Degenerativa na Égua

Após corrigir os defeitos anatômicos relacionados à instalação da endometrite. Alguns tratamentos são utilizados com o objetivo de reduzir a inflamação e

o número de bactérias no útero (LOSINNO & ALVARENGA, 2006; LANGONI et al, 1999; ASBURY, 1986).

Admitindo-se que a causa da doença uterina seja um microorganismo e que este seja identificado e determinada sua sensibilidade aos antimicrobianos, o tratamento pode ser iniciado (TROEDSSON, 1997). Infecções uterinas provocadas por fungos são difíceis de serem tratadas. O uso de clotrimazol e lavagem uterina utilizando iodo povidine diluído a 0,05% tem sido descrito como sendo tratamento eficaz para este tipo de infecção (LYLE, 2003), assim como mais recentemente o fluoconazol (ALVARENGA, 2008).

Muitos tratamentos já foram utilizados na tentativa de melhorar as condições uterinas em processos degenerativos caracterizados por fibrose, mas nenhum resultado consistente foi obtido. A irritação mecânica e química do endométrio foi o tratamento mais utilizado no passado, no entanto, a utilização desses métodos pode produzir ainda mais tecido cicatricial dificultando o reparo tecidual e conseqüentemente diminuindo a popularidade desses métodos (THRELFALL & IMMEGART, 2000). O prognóstico para a reprodução de um animal com fibrose degenerativa do útero é pobre e na grande maioria das vezes os animais devem ser descartados da reprodução (TROEDSSON, 1997).

O dimetilsulfóxido (DMSO) por via intra-uterina foi utilizado para tratar muitas afecções uterinas. Estudos sobre seu efeito no útero indicam que em altas concentrações é um grave irritante e que provoca ulcerações e inflamação após o uso em forma de infusão e, portanto, não deve ser utilizado (THRELFALL & IMMEGART, 2000).

A curetagem endometrial como tratamento da infertilidade em éguas foi descrito por Haraszti (1961) e foi eficaz em éguas endometrite crônica degenerativa conforme relatado por Ricketts (1985). Embora a existência de dobras endometriais limite severamente a área que pode ser curetada, certo efeito benéfico foi observado (HARASZTI, 1961). Alternativas químicas para o mecanismo de curetagem foram realizadas com o objetivo de remover uma camada de endométrio possibilitando uma renovação por um tecido funcional semelhante ao que ocorre na mulher, porem a infusão intra-uterina como de iodo povidine induziu inflamação intensa e aderências intra-uterinas, gerando severa fibrose persistente (ARRUDA et al., 2003).

Bracher et al., (1991), ao estudarem o efeito intra-uterino da infusão de querosene (50mL) no endométrio observaram níveis de moderada a severa inflamação inicialmente após a infusão, sendo que metade das amostras apresentaram suave a

severa necrose do epitélio luminal, sem ocorrer melhora do processo degenerativo. As glândulas endometriais apresentaram-se mais ativas em todas as éguas, e células mononucleares dominaram o infiltrado celular. Entre os dias 14 a 21 após a infusão, o infiltrado celular retornou-se ao nível do pré-tratamento, entretanto a atividade glandular chegou ao normal por volta do dia 14 e diminuiu superficialmente por volta do dia 21 pós tratamento com querosene, sem ocorrer melhora do processo degenerativo (MARTINS & PIMENTEL, 2006).

2.3- Células tronco

Apesar da grande diversidade de células que podem ser reconhecidas em tecidos de um adulto, todas derivam de uma única célula-ovo, após a fecundação de um oócito por um espermatozóide. Apesar do zigoto totipotente dividir-se formando células idênticas, muito precocemente, ocorre a diferenciação em dois tipos de tecido, o trofoblasto e o embrioblasto, restringindo a capacidade de diferenciação (ZAGO & COVAS, 2006).

Na maioria dos tecidos adultos existem reservas de células com capacidade de multiplicar-se, diferenciando-se naquele tecido a que pertencem e ao mesmo tempo mantendo uma própria reserva de células indiferenciadas. Essas células-tronco tecido-específicas são as responsáveis pela manutenção da integridade dos tecidos adultos, pelo reparo dos tecidos lesados e pela remodelação dos tecidos e órgãos. As células progenitoras capazes de diferenciar-se em tecidos adultos especializados são denominadas células-tronco (ZAGO & COVAS, 2006).

Células-tronco são um tipo de células indiferenciadas, sem função específica nos tecidos, capazes de multiplicar-se se mantendo indiferenciadas por longos períodos (tanto *in vitro* como *in vivo*), mas que diante de estímulos específicos podem diferenciar-se em células maduras e funcionais dos tecidos. As células-tronco têm a propriedade fundamental de divisão assimétrica, ou seja, ao mesmo tempo em que originam células precursoras com capacidade de diferenciação restrita a um determinado tecido, produzem células indiferenciadas que repõem a população de células-tronco (REYES, et al., 2001).

Estas células (células-tronco) se diferem de outras células do organismo por apresentarem três características: são células indiferenciadas e não especializadas; são

capazes de se multiplicar por longos períodos mantendo-se indiferenciadas, de forma que um pequeno número pode originar uma grande população de células semelhantes; são capazes de se diferenciar em células especializadas de um tecido particular. Em essência, as células-tronco são capazes de realizar “divisões assimétricas”, ou seja, podem originar células que permanecem indiferenciadas, repondo o pool de células-tronco, ou alternativamente podem se diferenciar em células especializadas (ZAGO & COVAS, 2006).

As células-tronco classificam-se em embrionárias, obtidas da massa celular interna de embriões no início de seu desenvolvimento e, em somáticas encontradas em tecidos já diferenciados de fetos, recém nascidos ou adultos (FRIEL et al., 2005). Células-tronco embrionárias podem ser classificadas em totipotentes, quando são obtidas de embriões no estágio de até 8 células ou pluripotentes derivadas da massa celular interna de blastocisto no período pré-implantação. As células totipotentes podem se diferenciar em qualquer tecido do organismo, incluindo a parte fetal da placenta. Por outro lado, as células pluripotentes apresentam capacidade de se diferenciar em qualquer tipo de tecido originado a partir de uma das três camadas germinativas (ectoderme, mesoderme e endoderme), mas não se diferenciam nos tecidos placentários (BENJAMIM et al., 2000).

As células-tronco somáticas ou de indivíduos adultos podem ser divididas, de acordo com sua capacidade regenerativa em células multipotentes, que podem originar vários outros tecidos originados da mesoderme. As principais fontes de células-tronco multipotentes são a medula óssea, o sangue periférico, o cordão umbilical, o tecido adiposo e o fígado (TAYLOR et al, 2007).

Mais recentemente observou-se que na medula óssea há outro tipo de células-tronco – denominada célula tronco mesenquimal (CTM) que possui alta capacidade de se renovar e diferenciar em várias linhagens de tecido conjuntivo. Em determinadas condições, as CTM poderiam dar origem a células de diversos tecidos incluindo tecido adiposo, cartilagem, osso e músculo (CONRAD & HUSS, 2005). Embora a medula óssea sirva como um reservatório primário de CTM, a presença destas tem sido reportada em uma variedade de outros tecidos. Isto inclui o perióstio e tecido adiposo, o conjuntivo muscular, medula óssea fetal, fígado e sangue. Há evidências de que a frequência destas células na medula óssea de seres humanos declina com a idade. Sua frequência em recém-nascidos é de 1/10, a qual diminui para $\frac{1}{2} \times 10^6$ em uma pessoa de 80 anos de idade (FIBBE, 2002).

Muitos pesquisadores têm descrito técnicas para o isolamento de CTM de animais e seres humanos adultos a partir da medula óssea. Estas células têm a capacidade de apresentar extensiva replicação sem apresentar diferenciação (capacidade de auto-renovação), e possuem um potencial de desenvolvimento de multilinhagens (BRUDER, 1998). É esta capacidade de auto-renovação que faz das células-tronco particularmente úteis na medicina, pois isto, em teoria, poderia proporcionar uma fonte ilimitada de material doado para transplantes (HENG et al., 2004).

A punção da medula óssea pode ser realizada do esterno, costelas, pélvis, crânio, úmero, fêmur e tíbia, pois nesses locais há constante função hematopoiética. Em eqüinos, o esterno é o sitio de escolha para a técnica, pois a atividade hematopoiética persiste na esternébra por toda a vida do animal. Essa região é coberta por massa muscular delgada, e a cavidade medular é coberta por uma fina camada de osso, facilitando o acesso. São recomendadas agulhas especiais para a coleta da medula óssea e dentre elas estão incluídas as agulhas modelo Rosenthal, Illinois sternal, Jamshidi e Komiyashiki. A aspiração é realizada com seringa descartável contendo heparina sódica. Como o material da seringa contém anticoagulantes, sua observação sobre uma placa de Petri revela a presença de partículas de medula, também chamadas de espículas. Sua presença confirma a origem medular da amostra obtida (KATHELEEN, 2000). O material obtido é bastante heterogêneo e contém grande diversidade de células, incluindo células maduras do sangue, linfócitos, fragmentos de estroma e gordura, além das células-tronco hematopoiéticas, responsáveis pela recuperação do tecido hematopoiético, além da CTM. A suspensão celular pode ser transfundida para o receptor sem processamento adicional, (apenas uma filtração para eliminar fragmentos maiores) ou pode-se proceder a vários tipos de fracionamento seguidos de *cultivo in vitro*.

O tecido adiposo também representa uma fonte, relativamente abundante, e de fácil acesso para a obtenção de células de alta capacidade proliferativa e grande potencial de diferenciação em multilinhagens celulares (HONG et al., 2006). Células estromais derivadas do tecido adiposo são uma população celular heterogênea, incluindo endotélio, epitélio, pré-adipócitos e alguns progenitores celulares como as CTMs. Esses progenitores têm mostrado possuir um múltiplo potencial de diferenciação similar as células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea (HONG et al., 2006; ZUK et al., 2001).

As células obtidas do lipoaspirado também exibem um potencial celular de multilinhagem *in vitro*, havendo sua diferenciação em células adipogênicas, osteogênicas, condrogênicas e miogênicas quando, em cultura, estão presentes certos fatores de diferenciação estabelecidos para linhagens específicas (HONG et al., 2006; ZUK et al., 2001).

O primeiro método *in vitro* de isolamento de células progenitoras foi realizado do tecido adiposo da cauda de um rato, após a fragmentação do tecido, seguido de digestão com colagenase tipo 1 a 37°C, e separando os diferentes componentes celulares por centrifugação. O sobrenadante continha adipócitos maduros, que flutuavam devido a sua alta concentração de lipídeos. Já a porção sedimentada continha os componentes do estroma vascular, que incluem os adipócitos, células progenitoras em adição a linhagem celular hematopoiética (GIMBLE & GUILAK, 2003).

Comparando as células-tronco mesenquimais (CTM) derivadas da medula óssea, com as CTM derivadas do tecido adiposo ambas possuem um potencial de diferenciação em tecidos de origem mesodermal. Porém, de acordo com alguns autores, há uma maior facilidade na obtenção do tecido adiposo e no isolamento de suas células (GUN-II et al. 2005, NATHAN, et al. 2003, ZUK, et al. 2002 e 2001).

Células-tronco mesenquimais podem ser cultivadas e expandidas *in vitro*, a partir de vários tecidos. O cultivo dessas células se baseia na habilidade das CTM de aderirem ao plástico do frasco e formar colônias. A capacidade de aderência da CTM é usada para separar essas células das células hematopoiética, as quais não aderem ao frasco. A separação ocorre quando há troca de meio de cultura (TAYLOR et al, 2007), mas não se pode afirmar que todas as células aderidas são CTM.

O cultivo da CTM para o uso na terapia celular é bem conhecido e realizado com frequência. Atualmente já existem estudos realizados em equinos contem informações sobre a caracterização dessas células antes do implante, ou sobre a sobrevivência e funcionalidade das células implantadas (FORTIER& SMITH, 2007). Estudos citomorfológicos e citoquímicos são métodos clássicos para caracterizar e classificar células hematopoiéticas, porém técnicas de imunocitoquímica e imunofenotipagem (anticorpos monoclonais) têm promovido um avanço na definição e classificação de células sanguíneas, particularmente aquelas de baixo grau de diferenciação (GRINDEM, 1996). Os anticorpos monoclonais conjugados com compostos fluorescentes, tais como o isotiocianato de fluoresceína ou ficoeritrina, podem ser

incubados com as células a serem analisados, permitindo sua identificação e quantificação citofluorométrica (GRINDEM, 1996).

Em um estudo pioneiro sobre células-tronco do sangue de cordão umbilical, NAKAGE (2005) quantificou as células-tronco hematopoéticas do sangue do cordão umbilical de cães neonatos pela expressão do anticorpo monoclonal canino CD34 pelo protocolo ISHAGE de citometria de fluxo (McSWEENEY et al., 1998), demonstrando ser este último um método simples, rápido, sensível e eficaz para avaliação de células-tronco de cães. A citometria de fluxo é um recurso emergente na Clínica Médica Veterinária, que permite uma análise rápida, objetiva e quantitativa de células em suspensão (FALDYNA, 2001).

Atualmente, nenhum fenótipo único foi identificado que permita o isolamento de precursores de CTM com um potencial previsível de desenvolvimento. O isolamento e caracterização destas células, entretanto, ainda dependem primariamente de sua habilidade em aderir ao plástico e sua potencial adesão. Pittenger et al. (1999) isolaram células em aspirados de medula óssea de doadores voluntários com características de células tronco mesenquimais humanas. Estas células apresentaram fenótipo estável e permaneceram como monocamada *in vitro*, podendo ser diferenciadas exclusivamente em linhagens adipocíticas, condrocíticas e osteocíticas.

O uso de marcadores de superfície tem sido utilizado como método de identificação da imunofenotipagem, um método aceito para a diferenciação de linhagens de células-tronco somáticas (FORTIER, 2005). CTM carregam proteínas de superfície que podem ser reconhecidas por anticorpos específicos e, portanto podem ser utilizados na caracterização dessas células. CTM de humanos e ratos expressam CD105, CD73, CD44, mas não expressam CD45 e CD31. Em adição a isso, é consenso que as CTM cultivadas e expandidas são negativas para CD34 (COPLAND et al, 2007). Infelizmente, a maioria desses marcadores ainda não foi validada como marcadores de superfície para equinos e há evidências que alguns anticorpos não possuem reação cruzada com o cavalo (TAYLOR et al, 2007).

2.4. Terapia com células tronco obtidas da medula óssea.

A exploração da diferenciação das células-tronco como terapêutica é feita sob forma de implante celular, ou na bioengenharia voltada para transplantes. Este novo campo de conhecimento é chamado de Medicina Regenerativa.

A medicina regenerativa tem sido utilizada em animais de laboratório e em humanos em doenças do miocárdio (BIRGT et al., 2006), doenças vasculares (BHATTACHARYA et al., 2000), doenças hepáticas (FANG *et al.* 2004) e doenças do tecido ósseo (ARINZEH et al., 2003), entre outros. Além disso, em eqüinos, a terapia celular tem apresentado resultados benéficos na recuperação de cartilagem (FORTIER & SMITH, 2007) e nas tendinites (FORTIER e SMITH, 2008).

Diversas oportunidades terapêuticas para o uso de *pool* de células tronco adultas podem ser reconhecidas. Uma melhor compreensão do *pool* de células tronco leva ao isolamento e expansão de células tronco multipotentes *ex vivo*, e sua utilização em reparação tecidual por modo relativamente simples, incluindo injeção local ou por métodos mais complexos como a geração de porções de tecido de substituição e subsequente implantação local (LUYTEN, 2004). A utilização de CTM adultas em terapias celulares humanas depende do estabelecimento de estudos pré-clínicos com outros mamíferos como o camundongo e animais domésticos (TROPEL et al., 2004).

Na medicina regenerativa, a melhora da cicatrização pode ser realizada pelo fornecimento dos elementos celulares requisitados durante o processo, garantindo a geração de novas células. Também é necessária a produção de estruturas supramoleculares, ou seja, matriz extracelular que providencie a organização espacial plenamente funcional dos novos tecidos gerados e sua integração sistêmica (LEVENBERG *et al.*, 2003).

Segundo Olivares *et al* (2004), a utilização de células tronco da medula óssea no tratamento de ratos que apresentavam infarto do miocárdio com a presença de fibrose na parede do ventrículo esquerdo, demonstrou-se satisfatório na regeneração do miocárdio e conseqüentemente melhora do funcionamento do coração. Exames histológicos constataram que após a utilização de células tronco mesenquimais autólogas no tecido de cicatrização no miocárdio, houve a melhora do funcionamento cardíaco através da formação de novos músculos e vasos sanguíneos após 4 semanas da infusão de $1-3 \times 10^5$ células. O mesmo foi observado por Orlic *et al.* (2001) na melhora da função ventricular e na formação de novas fibras musculares em camundongos infartados tratados com células tronco mesenquimais. Além disso, células tronco mesenquimais purificadas obtidas de medula óssea podem adquirir o fenótipo de células endoteliais vasculares ou células epidermais após cultura *in vitro* e indução com EGF e TGF (FU et al., 2006).

Estudos recente também demonstraram que a infusão de células tronco autólogas da medula óssea por infusão intracoronária ou intramiocárdia em pacientes que possuíam miocardiopatias chagásica reverteu a disfunção ventricular pós-parto, pois houve a regeneração dos miócitos cardíacos, estímulo da neovascularização na área infartada, melhora e perfusão isquêmica crônica e aumento da função sistólica do ventrículo esquerdo (BIRGT *et al.*, 2006). O mesmo já tinha sido observado por Vilas-Boas *et al.*, (2004) em pacientes humanos que possuíam a doenças de chagas e que foram submetidos ao mesmo procedimento, demonstrando melhora na função cardíaca e na qualidade de vida após a infusão das células tronco.

Da mesma forma foi relatado melhora na função cardíaca em camundongos que possuíam doença de Chagas crônica após a administração de células tronco mononucleares autólogas da medula óssea, apresentando redução no número de células inflamatórias e no grau de fibrose do coração quando comparados com o grupo que não recebeu o tratamento apresentando (SOARES *et al.*, 2004).

Nos camundongos com cirrose hepática após a administração das células tronco mesenquimais, foi observado aceleração no processo de regeneração do fígado, redução na fibrose hepática e melhora no funcionamento do órgão (LYRA *et al.* 2007). Já em outro estudo também utilizando o mesmo modelo experimental de animais, houve a indução de uma doença semelhante à cirrose hepática através da dieta à base de tetracloreto de carbono e álcool, e uma fibrose induzida pela infecção crônica do *Schistosoma mansoni*, observando assim a redução de 60% da fibrose hepática nos animais após o tratamento com células tronco (FANG *et al.* 2004).

Dados de pesquisas realizadas *in vivo* sugerem que as CTMs melhoram a cicatrização tendínea em modelos de tendinite induzida por colagenase (YAMADA *et al.*, 2011, SCHNABEL *et al.*, 2009; CARVALHO, 2009)

Em equinos, Barreira (2005) avaliou os efeitos do implante autólogo de CTM de medula óssea na cicatrização tendínea, comparando tendões tratados com tendões do grupo controle. Resultados como aumento do infiltrado inflamatório celular, abundância da matriz, diminuição da necrose, discreto aumento no índice de proliferação celular (Ki- 67, clone MIB1) e menor imunomarcação do TGF- β 1 caracterizam a aceleração do reparo tendíneo no grupo tratado, o que também foi observado por Crovace *et al.* (2012). O período ideal para o implante celular é após a fase inflamatória, mas antes da fase de formação de tecido fibroso (CARVALHO *et al.* 2011; FORTIER & SMITH, 2007).

Apesar da intensa capacidade regenerativa das CTM no reparo dos tecidos acima citados, a medicina regenerativa utilizando CTM ainda não foi aplicada no tratamento de lesões endometriais. É conhecido que as CTM participam do processo de crescimento, remodelação e cicatrização tecidual (YAMADA et al. 2011; RICHARDSON, 2005). As células-tronco são mantidas quiescentes até receberem estímulo do ambiente para iniciarem sua diferenciação. Este estímulo pode ocorrer durante o processo de cicatrização (PERIN *et al.*, 2003). De fato, o implante das CTM causa o aumento do número de células progenitoras que normalmente estão presentes no tecido afetado, aumentando assim, seu potencial da regeneração (FRONTIE & TRAVIS, 2011; CROVACE, 2010; FORTIER & SMITH, 2007). Desta forma este projeto levanta a hipótese de que o uso da terapia celular com CTM será benéfico na recuperação de lesões endometriais crônicas em equinos.

3 OBJETIVO

2.1 Avaliar a eficiência da terapia celular no tratamento do endométrio de éguas com processo degenerativo crônico caracterizado pela presença de fibrose uterina.

4. Pré-Experimento: CARACTERIZAÇÃO E VIABILIDADE DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS OBTIDAS DA MEDULA ÓSSEA E DO TECIDO ADIPOSEO

O pré-experimento tem como objetivo isolar e caracterizar, através de marcadores de superfície as células-tronco mesenquimais da medula óssea e do tecido adiposo de equinos e avaliar o potencial de crescimento *in vitro* de células tronco mesenquimais obtidas da medula óssea e do tecido adiposo.

4.1 Material e Métodos

O experimento com os animais foi realizado no Posto de Monta da Fazenda Lajeado – UNESP – localizado no município de Botucatu (LAT.22⁰ S e LONG. 48⁰ W), estado de São Paulo, sendo que o cultivo das células tronco mesenquimais foi realizado no laboratório de Reprodução Avançada e Terapia Celular (LANÇA) do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ – UNESP- Botucatu, SP.

4.1.2 Coleta e Cultivo das Células Tronco da Medula Óssea

a) Punção aspirativa da Medula Óssea

Foram aspiradas as medulas ósseas de 10 éguas de raça indefinida com idade entre 4 e 23 anos, em boas condições corporais, recebendo 4Kg/dia de ração divididos em dois tratos; 10Kg/dia feno cost-cross (*Cynodon dactylon*); suplementação mineral (70g/dia) e livre acesso a pasto e bebedouro.

Previamente a aspiração da medula óssea, os animais foram mantidos em estação, contidos em tronco e sedados com 0,5mg/kg de Xilazina¹. Após foram tricotomizados em uma área de 5 x 20 cm na região referente ao osso esterno de cada animal. Localizada a 5^a (Quinta) esternebra, realizou-se o bloqueio anestésico local com 10 ml de cloridrato de lidocaina, seguido de anti-sepsia local.

A punção aspirativa da medula óssea (MO) foi realizada conforme a metodologia modificada de Barreira et al (2008). Para isso, utilizamos uma agulha de punção de medula óssea em eqüinos, modelo *Jamshidid*, de calibre oito e 12 cm de comprimento (figura 01- A). Uma vez bem fixa a agulha dentro do esterno (figura 01 - B), removemos o mandril e realizamos a aspiração do sangue da medula óssea com auxílio de uma seringa de 20mL (figura 01- B) contendo DPBS² (5ml) e heparina³ (1ml) a 5000 UI/mL que foram destinadas para o cultivo celular.

¹ Xilestesin 2%. Cristália, Itapira, SP

² PBSR 1x, LGC Biotecnologia, BRA

³ HemofolR, Cristália, BRA

As amostras foram identificadas e encaminhadas ao Laboratório de Reprodução Avançada e Terapia Celular (LANÇA) do Departamento de Reprodução Animal (UNESP, Botucatu, SP) para a separação da fração mononuclear, realização do cultivo celular e identificação da viabilidade celular por meio da coloração de *tripan blue* contadas em câmara de Newbauer.



Figura 01: Agulha de punção de medula óssea da marca *Jamshid* (A) e coleta da Medula Óssea (MO) do esterno da égua com seringa contendo Heparina e DPBS (B)

b) Isolamento e cultivo das células tronco mesenquimal da medula óssea

Após a coleta da medula óssea e o encaminhamento até o laboratório, o sangue obtido da medula óssea foi filtrado em um equipo de transfusão¹ sanguínea humano para retirada dos coágulos (figura 2A) posteriormente centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos para retirada do soro e gordura (figura 2B).



Figura 02: Filtragem das amostras de sangue com Equipo para transfusão sanguínea (A) e centrifugação a 1500rpm (B).

O material obtido foi ressuspensionado na proporção 1/1 em DMEM alta glicose² com L-glutamina sem soro (Gibco), e transferido para outro tubo de 15 mL contendo 4 mL de

gradiente de densidade Ficoll-Paque® premiun 1073³ (densidade 1.077 g/mL-Amersham Biosciences) (diluição Ficoll: meio de 1:1), centrifugado a 1500 rpm durante 40 minutos à temperatura ambiente. Após a centrifugação, formou-se um “halo” transparente no meio do tubo como demonstrado na figura 03 “D” correspondente a células tronco mononucleares.



Figura 03: Amostra da medula óssea junto com o gradiente de densidade “Ficoll” antes da centrifugação (A) e após a centrifugação em 1500 rpm, presença de “halo” transparente constituído de células mononucleares (B)

Este “halo” foi coletado na interface Ficoll-células e ressuscitado em meio DMEM sem soro. O material foi novamente centrifugado a 1.500 rpm durante 10 minutos, repetindo este procedimento por 2 vezes para total retirada do Ficoll. Após a lavagem, o pellet foi ressuscitado em 1 mL de DMEM com 20% de soro fetal bovino, e as células foram contadas em câmara de Newbauer. As células foram então plaqueadas em frascos de 25 cm², com 5 mL de meio DMEM alta glicose com L-glutamina e 10% SFB e 10% soro Knockout contendo penicilina, estreptomina (1%) e anfotericina B (1,2%)¹ a 37,5°C, em atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% de CO₂. O meio de cultivo foi trocado a cada 4 a 5 dias. O repique que é a suspensão das células aderidas no fundo da placa de cultivo foi realizado quando se atingiu uma confluência de aproximadamente 80% (figura 04).

¹ BiosaniR, BRA

² Invitrogen GibcoR, USA

³ GE Healthcare Life SciencesR, SWE

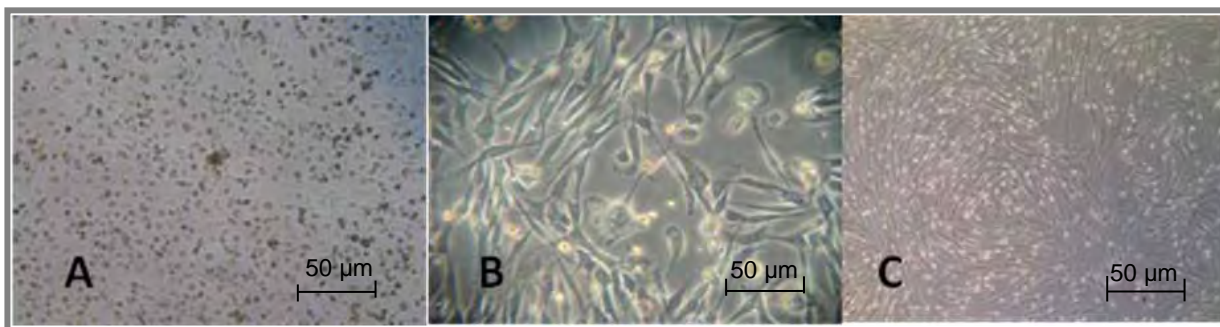


Figura 04: Aspecto das células mesenquimais eqüinas em cultivo *in vitro* (A) Início da aderência das células demonstrando aspecto arredondado. (B) Células aderidas com morfologia alongada semelhante a fibroblastos. (C) Confluência de 80% de linhagem celular indiferenciada.

4.1.3 - Coleta e Cultivo das Células Tronco do Tecido Adiposo

a) Obtenção do tecido adiposo

A coleta do tecido adiposo foi realizada em 10 éguas de raça indefinida com idade entre 4 e 23 anos, que apresentavam boa condição corporal, recebendo ração e tendo livre acesso a pasto e bebedouro

A base da cauda eqüina foi escolhida como local de coleta de tecido adiposo devido à maior disponibilidade de material, ausência de grandes vasos e fácil acesso. Para realização do procedimento foi necessário o preparo cirúrgico na base da cauda, realizando tricotomia e posterior anti-sepsia. Em seguida a égua foi tranquilizada sistemicamente com Xilazina e posteriormente foi realizada a infiltração local com cloridrato de lidocaína, seguida de anti-sepsia local.

Foi realizada uma incisão de aproximadamente 10 cm de comprimento ao lado da base da cauda (figura 05), permitindo a visualização de uma camada de tecido adiposo entre a pele e a musculatura, sendo então realizada a coleta de aproximadamente cinco gramas de tecido “gorduroso”. Este foi armazenado em tubo cônico de 50 mL, estéril, contendo meio DMEN-HEPES suplementado com estreptomicina e anfotericina B de modo que fique completamente submerso para evitar ressecamento do material. Após, foi levado diretamente para o processamento no laboratório e foi realizadas a sutura do tecido subcutâneo com fio absorvível e a pele com um fio inabsorvível sintético, em ambos locais foi utilizado padrão de sutura simples contínuo.

¹ Invitrogen GibcoR, USA

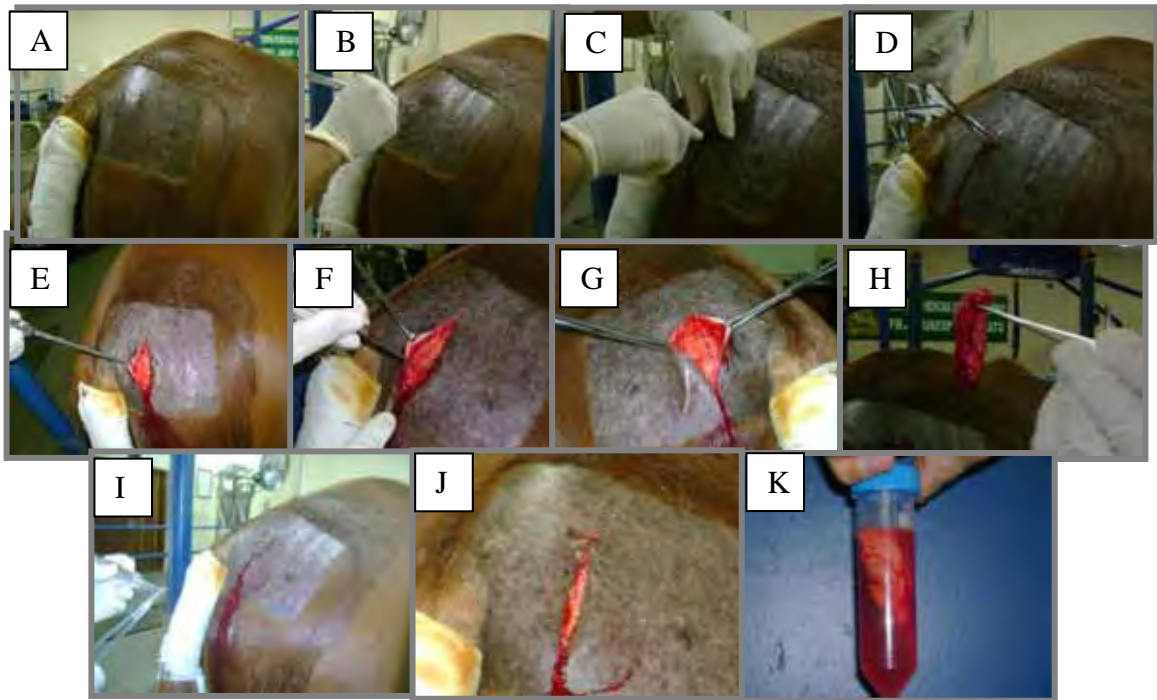


Figura 05: Processo de coleta do tecido adiposo de equino. Realização da assepsia e incisão na região paralela a base da cauda (A-G); Retirada do fragmento de gordura (H); Sutura e incisão (I-J); Tecido Adiposo coletado (K).

b) Isolamento e cultivo das células tronco mesenquimal do tecido adiposo

A extração da fração contendo as CTM foi baseada nas técnicas previamente descritas para a extração da fração vascular estromal em humanos (AUST et al. 2004) e para a extração da fração vascular estromal em eqüinos (VIDAL et al. 2007).

Após a obtenção das amostras do tecido adiposo, estas foram submetidas a sucessivas lavagens com meio DMEN-HEPES e posteriormente a uma separação mecânica por meio de uma lâmina de bisturi e à ação digestora da collagenase tipo I, (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA). A solução foi homogeneizada e levada à estufa a 37° C em atmosfera com 5,0% de CO₂ em ar. Após 24 horas de cultivo foi feita a filtragem do material por um filtro de Nylon (BD Falcon Cell Strainer, 70 µm) e a solução filtrada foi adicionada a um mesmo volume de meio DMEM sem soro. Este material foi centrifugado a 1900 rpm repetindo este passo por 2 vezes. Após a lavagem, o pellet foi ressuspensionado em 1 mL de DMEM com 20% de soro fetal bovino, e as células contadas. As células foram plaqueadas em frascos de 25 cm², com 5 mL de meio DMEM alta glicose com L-glutamina e 10% SFB e 10% soro Knockout contendo penicilina, estreptomicina e anfotericina B. O meio de cultura foi trocado a cada 4 dias e a visualização do crescimento celular *in vitro* foi realizado de dois em dois dias. O repique das células foi realizado quando atingiu uma confluência de aproximadamente 80% (Figura 06).

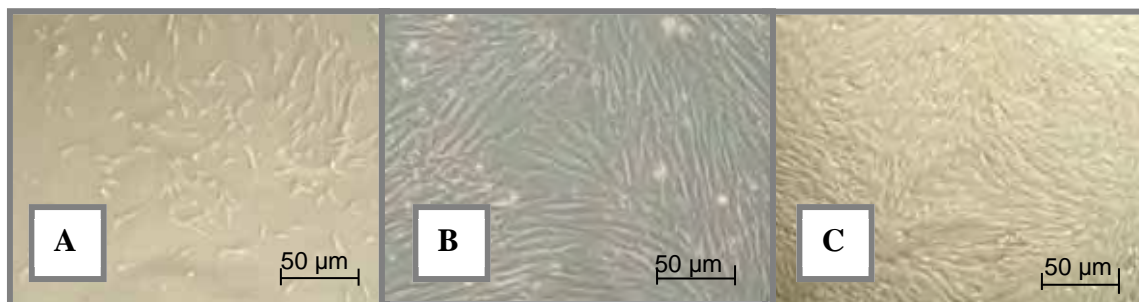


Figura 06: Célula Tronco Mesenquimal (CTMs) do tecido adiposo de equino cultivadas *in vitro*, (A) Células aderidas com morfologia arredondada e algumas com aspecto fibroblástico; (B) Crescimento *in vitro* das CTMs com morfologia alongada e aspecto semelhante a fibroblastos. (C) Confluência de 80% das CTMs formando uma linhagem celular.

4.2 Viabilidade das células tronco mesenquimais CTMs da medula óssea (MO) e tecido adiposo (TA)

Após a obtenção da confluência pós cultivo celular, adicionou 2 mL de tripsina pré aquecida a 37 graus celsius na garrafa de cultivo. Esta foi homogeneizada junto as células e então o conteúdo desprezado. Novamente adicionou 2 mL de Tripsina dentro da garrafa de cultivo que foi encaminhada para estufa com CO₂ e O₂ controlado em uma temperatura de 37 graus Celsius por 5 minutos.

Posteriormente o conteúdo foi desprezado em um tubo *Falcon* de 15 mL e foi adicionado 1 mL de soro fetal bovino (SFB) e encaminhado para centrifugação por 1500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi homogeneizado com um novo meio de cultivo celular.

A preparação do corante Azul de Tripán foi realizada diluindo 1:1 de meio com o corante. A leitura da viabilização das células foi feita na Câmara de Neubauer que foram contados os dois lados da câmara. As estruturas coradas de azul eram células lesionadas e as que não coravam eram células intactas.

4.3 Caracterização das células tronco mesenquimais (CTMs) da medula óssea (MO) e tecido adiposo (TA)

4.4. Diferenciação para os tecidos ósseo, cartilaginoso e gorduroso

Em ambos os grupos, logo após a separação, foram removidos 100 µL do meio e colocadas em um tubo de hemólise para contagem celular, onde o número de células foi quantificado por meio do hematocitômetro para avaliar a viabilidade celular por exclusão através da coloração do azul de trypan¹.

A caracterização das CTMs foi realizada logo após a separação, no momento da primeira passagem e após a terceira passagem, tanto nas amostras obtidas da medula óssea, como do tecido adiposo. Para tanto, foi realizada a caracterização celular pela reação cruzada de anticorpos caninos com os antígenos de superfície eqüinos (CD 44, CD 34) por citometria de fluxo. As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo FACS Calibur BD[®], no Laboratório de Citometria de Fluxo do Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

As células tronco mesenquimais isoladas e que obtiveram marcação positiva para CD44 foram cultivadas em uma placa de cultivo de 24 poços por aproximadamente 20 dias. Para cada três poços foi adicionado um promotor de diferenciação para tecidos ósseo, cartilaginoso e gorduroso. Foram reservados três poços para o grupo controle, ao qual não foram adicionados promotores de diferenciação. O protocolo de diferenciação foi realizado de acordo com o fabricante do Kit. Para diferenciação para tecido adiposo foi utilizado o Kit *StemPro® Adipogenesis Differentiation Kit*² para diferenciação de condrócito foi utilizado o Kit *StemPro® Chondrogenesis Differentiation Kit*³ e a diferenciação para tecido ósseo utilizou-se o *Mesenchymal Stem Cell Osteogenesis Kit*⁴.

¹ GIBCO® Invitrogen Corporation

² Adipogenesis Differentiation Kit (Cat. No A10070-01 – Invitrogen)

³ StemPro® Chondrogenesis Differentiation Kit (Cat. No A10071-01 – Invitrogen)

⁴ Mesenchymal Stem Cell Osteogenesis Kit (Cat. SCR028 – Chemicon).

4.5 Resultados do pré-experimento

As células obtidas da medula óssea (MO) apresentaram um tempo de aderência das CTMs na placa de cultivo *in vitro* entre 4-6 dias e as do tecido adiposo (TA) entre 6-8 dias. As CTMs obtidas da MO, obtiveram confluência na placa de cultivo *in vitro* entre 20-22 dias constatando 95% de viabilidade celular avaliadas pela coloração de Azul de Tripán. Já as células obtidas do TA obtiveram maior tempo de confluência entre 24-26 dias e menor porcentagem de viabilidade celular (88%) quando comparada com as da MO (Tabela 01).

Na avaliação da Imunofenotipagem, verificou-se alta marcação para o anticorpo monoclonal CD44 em ambos os grupos, sendo 75% para MO e 88% para o TA e baixa marcação para o anticorpo monoclonal CD34 com 25% e 12% respectivamente (Tabela 01).

Tabela 01: Caracterização das células tronco mesenquimais obtidas da medula óssea e do tecido adiposo

GRUPOS	MEDULA ÓSSEA (MO)	TECIDO ADIPOSO (TA)
Número de CTMs após atingir 70% de subconfluência	2,5 x 10 ⁷	1,5 x10 ⁷
Viabilidade de CTMs após atingir 70% de subconfluência (%)	95	88
Marcação de CD34 (%)	25	12
Marcação de CD44 (%)	75	88

As linhagens celulares obtidas da MO, demonstraram um potencial de diferenciação celular *in vitro* para osteoblastos, condrócitos e adipócitos em todas as 10 amostras submetidas à este procedimento; diferentemente das CTMs obtidas da TA que não conseguiram se diferenciar para nenhuma linhagem celular distinta.

Baseado nesta última avaliação, optamos em realizar o Experimento com CTMs obtidas da MO. A ausência da diferenciação das células tronco mesenquimais do TA pode ter

ocorrido em função destas amostras celulares serem heterogêneas, ou estarem com um linhagem celular mais diferenciada que pode ter influenciado nesta etapa.

5. EXPERIMENTO: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS OBTIDAS DA MEDULA ÓSSEA EM ÉGUAS COM FIBROSE UTERINA

Baseado nas informações obtidas do pré-experimento, optamos em conduzir o Experimento com Células Tronco Mesenquimais (CTMs) autólogas obtidas da medula óssea

5.1) MATERIAL E MÉTODOS

Foram tratadas 10 éguas de proprietários de diversas localidades que se dispuseram a encaminhar as éguas até o Departamento de Reprodução da Universidade Estadual Paulista (Unesp Botucatu). Estas éguas encontravam-se em bom estado geral de saúde, com idade variando entre 14 a 23 anos, da raça Quarto de Milha com massa corpórea entre 400 a 600 Kg, e bom escore corporal com históricos reprodutivos de subfertilidade e grau severo de fibrose uterina detectada previamente pelo exame de biópsia endometrial.

As éguas foram mantidas em piquete com livre acesso a bebedouro coletivo, suplementação mineral em um consumo médio diário de 70 gr., e ração fornecida duas vezes ao dia em um total de quatro Kg/égua, o feno de coast-cross (*Cynodon dactylon*) ofertado três vezes ao dia, em um total de doze quilos/égua.

A histologia uterina foi realizada através da coleta do fragmento endometrial obtido pela introdução intra-uterina, trans cervical, de um aparelho de biópsia (modelo “Krause”) devidamente esterilizado, sendo posteriormente fixado em Bowin por 18 horas e em seguida transferido para álcool 70% sendo então confeccionado os cortes histológicos. A classificação histológica foi interpretada segundo o modelo proposto por KENNEY & DOIG (1986) em grau de fibrose: Grau I - normal, Grau IIA – inflamação crônica leve, Grau IIB – inflamação crônica com infiltrado moderado, Grau III – inflamação crônica degenerativa grave.

5.1.1 Transferência das CTM para o útero das éguas

A avaliação da condição uterina por meio da avaliação das amostras de biópsias, foram realizadas antes do transplante de CTMs (D0), e após 15 dias (D15), 30 dias (D30), 60 dias (D60) , sendo:

Dia 0 (D0) – Grupo controle. Coleta do fragmento uterino por meio da biópsia endometrial e logo em seguida transplantamos as células tronco mesenquimais no endométrio

Dia 15 (D15) – Coleta do fragmento uterino 15 dias após a injeção endometrial de células tronco mesenquimais.

Dia 30 (D30) – Coleta do fragmento uterino 30 dias após a injeção endometrial de células tronco mesenquimais.

Dia 60 (D60) – Coleta do fragmento uterino 60 dias após a injeção endometrial de células tronco mesenquimais.

A administração intra-endometrial das células troncos foi realizada por meio da injeção de 2×10^7 mL de células em um volume de 0,5 ml em cada 20 diferentes pontos (sítio de administração), totalizando um volume injetável de 10mL, espaçados entre um centímetro, seguindo uma linha horizontal da extremidade de um corno uterino ao outro com o auxílio de endoscópio flexível (figuras 07 e 08).



Figura 07: Agulha de esclerose humana utilizada para a injeção das células tronco mesenquimais através da endoscopia

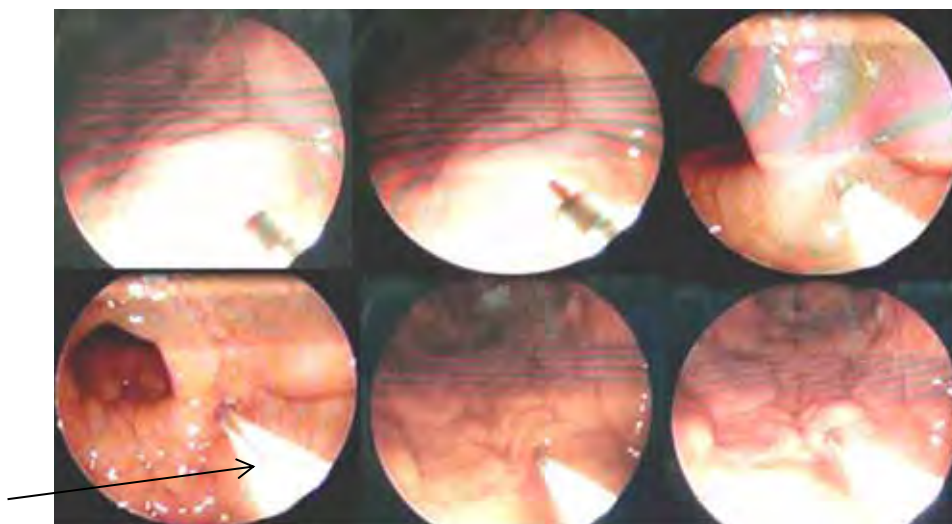


Figura 08: Administração de célula tronco mesenquimal no endométrio das éguas com agulha de esclerose (seta) associada ao endoscópio.

Os fragmentos foram retirados para confeccionar as lâminas de Hematoxilina e Eosina (HE), imunohistoquímica e de Coloração de Tricrômio de Masson.

5.1.2 Avaliação Histológica

A avaliação Histológica foi realizada de três maneiras. Através da Coloração de Hematoxilina e Eosina (HE), Imunohistoquímica e Coloração de Masson

5.1.2.1 Hematoxilina e Eosina (HE)

Os fragmentos endometriais coletados entre o início do tratamento (D0) e após 15 dias (D15), 30 dias (D30), 60 dias (D60) do início do tratamento, foram fixados em Bouin em um período de 18 horas e posteriormente, lavadas e mantidas em álcool 70% até o momento de inclusão em parafina. Após a inclusão, cortes de 4µm foram obtidos, montados em lâminas com extremidade fosca e corados inicialmente em HE para avaliar a qualidade do material. Posteriormente novos cortes de 4µm foram obtidos e colocados em lâminas com extremidade fosca previamente tratadas com organossilano. Tal procedimento foi realizado por técnico experiente e capacitado nos procedimentos de inclusão e corte do material.

A coloração de HE foi utilizada para verificar a presença do infiltrado inflamatório polimorfonuclear e mononuclear. No estudo histológico, o escore utilizado para classificação do infiltrado inflamatório agudo (polimorfonuclear) e crônico (Mononuclear) foi baseado na quantidade de células presentes nos cinco campos distintos contados, seguindo a descrição proposta por Kenney e Doig (1978) sendo 1- Ausente; 2- Ausente/Leve; 3- Leve; 4- Leve/Moderado; 5- Moderado; 6- Moderado/Severo; 7- Severo. A avaliação das lâminas foi realizada em todas as amostras coletadas em cinco campos distintos em todos os momentos do tratamento, e a leitura foi realizada em microscópio óptica em aumento de 200x.

5.1.2.2 Coloração de Tricrômio de Masson

A Histoquímica foi realizada através de 10 cortes de cada fragmento obtido para coloração de Tricrômio de Masson. A avaliação foi realizada em cinco campos distintos através do Software AVSOFT BIOVIEW SPECTRA 4.0.1 (2006), para verificação da quantificação dos ninhos glandulares, densidade glandular e área de fibrose marcada com a coloração azul.

5.1.2.3 Imunohistoquímica

A análise foi realizada através de imunomarcção com anticorpos policlonais no intuito de verificar o tipo de colágeno estabelecido e predominante (colágeno tipo I ou tipo III). Foram realizados 10 cortes de cada fragmento obtido para a realização da técnica de imunohistoquímica. Adicionalmente foram realizados cortes em outros fragmentos para a realização de testes e padronização da técnica de imunohistoquímica para a amostra de endométrio de égua. A leitura das amostras foram realizadas em cinco campos distintos através do Software AVSOFT BIOVIEW SPECTRA 4.0.1 (2006).

5.1.2.3.1 Quantificação de colágeno tipo III

Avaliação baseada em escore previamente adotada, onde determinamos o percentual de colágeno sendo 1- $\leq 24\%$; 2- 24 a 49%; 3- 50 a 75%; 4- $\geq 75\%$.

5.1.2.3.2 Intensidade de marcação do colágeno Tipo III

Classificação realizada baseada em escore previamente adotado, sendo 1- Fraco; 2- Moderado; 3- Intenso (Anexo I).

5.1.2.3.3 Distribuição da quantidade de colágeno tipo III

Distribuição avaliação através de escore previamente adotado sendo 1- Focal; 2- Multifocal e 3- Difuso (Anexo II).

5.1.2.3.4 Área de colágeno III

Avaliação da área de colágeno tipo III constatada em pixel^2 conforme o Software AVSOFT BIOVIEW SPECTRA 4.0.1 (2006).

5.2 Processamento dos fragmentos obtidos

Os fragmentos endometriais foram fixados em Bouin em um período 18 horas, posteriormente, lavados e mantidos em álcool 70% até o momento de inclusão em parafina. Após a inclusão, cortes de 4 μm foram obtidos, montados em lâminas com extremidade fosca e corados inicialmente em HE para avaliar a qualidade do material. Posteriormente novos cortes de 4 μm foram obtidos e colocados em lâminas com extremidade fosca, previamente tratadas com organossilano¹. Tal procedimento foi realizado por técnico experiente e capacitado nos procedimentos de inclusão e corte de material.

¹ 3-Aminopropyl Triethoxy-silane, Sigma – Aldrich, São Paulo – SP, Brasil. Cód A3648.

Foram realizados 10 cortes de cada fragmento da amostra de biópsia para a realização da técnica de imunohistoquímica e confecção da lâmina para a Coloração de Tricrômio de Masson. Adicionalmente foram realizados cortes em outros fragmentos para a realização de testes e padronização da técnica de imunohistoquímica.

5.3 Padronização da técnica de imunohistoquímica

Iniciou-se a padronização do material obtido para imunomarcção para colágeno I e III. Durante a padronização da técnica de imunohistoquímica foi testada a recuperação antigênica, bloqueio da peroxidase endógena, outras soluções de bloqueio a fim de diminuir a marcação de fundo na lâmina, diluição dos anticorpos primários e tempo de incubação, os anticorpos secundário e terciário e tempo de revelação com o cromógeno DAB².

Para a desparafinização do material emblocado, as lâminas foram mantidas em estufa a 55°C por 24 horas e, posteriormente, colocadas em cuba de vidro com xilol à temperatura ambiente por 30 minutos e, a seguir mantidas em uma nova solução de xilol por 20 minutos. As lâminas foram transferidas para outras cubas de vidro para a hidratação em banhos de álcool, na seguinte seqüência:

- ✓ Imersão em álcool absoluto I por três minutos
- ✓ Imersão em álcool absoluto II por três minutos
- ✓ Imersão em álcool absoluto III por três minutos
- ✓ Imersão em álcool 95% por três minutos
- ✓ Imersão em álcool 85% por três minutos

A etapa seguinte consistiu na recuperação antigênica, necessária para liberar os epítomos antigênicos do tecido, bloqueados anteriormente pela solução fixadora (formol tamponado 4%). Para os anticorpos policlonais anti-colágeno I e III (rabbit anti-bovine – Novotec) foram testadas a recuperação antigênica em solução de Pesina 1% - pH 1,8 durante 30 minutos e também em solução de citrato de sódio³ 10 mM (1000 mL de água destilada e 1,92 g de ácido cítrico monohidratado⁴, com o pH corrigido para 6,0 com ácido clorídrico) em panela de pressão (Pascal[®] - Dako).

Posteriormente foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com incubação em solução de água oxigenada 8% por 20 minutos, seguida de dez lavagens em água destilada e, a seguir, duas lavagens em solução tampão TRIS (1000 mL de água destilada, 6,0 g Trizma

² 3,3'-diaminobenzidina - Liquid DAB Cromogen[®] – DakoCytomation – USA

³ Solução de citrato de sódio 10 mM (1000 mL de água destilada e 2,1 g de ácido cítrico monohidratado, com o pH corrigido para 6,0 com ácido clorídrico)

⁴ Ácido Cítrico P.A. Anidro, Vetec, Rio de Janeiro – RJ, Brasil. Cód. 238.

Base, 8,5 g de cloreto de sódio⁵ e pH corrigido para 7,4 com ácido clorídrico) de 5 minutos cada.

Realizou-se então a incubação com o anticorpo primário; para a detecção de colágeno I e III foram utilizados anticorpos policlonais. Ambos os anticorpos foram diluídos com o diluente de anticorpo⁶ na concentração de 1:2000 e 1:1000, respectivamente. A solução contendo o anticorpo foi uniformemente distribuída por toda a superfície do corte e as lâminas foram incubadas em câmara úmida, durante 18 horas, à temperatura de 4°C.

Posteriormente, foi realizada a lavagem com solução tampão TRIS e incubação com o anticorpo secundário e complexo. Para tanto foi empregado o anticorpo secundário ligado à peroxidase (Advance^{®7}) por 60 minutos de acordo com as instruções do fabricante. Realizou-se nova lavagem com solução tampão TRIS e revelação com o cromógeno DAB⁸ durante 5 minutos ao abrigo da luz. A reação foi interrompida com a lavagem em solução tampão TRIS.

As lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Harris por 3 minutos, e a coloração interrompida com a lavagem em água corrente por 10 minutos.

Procedeu-se, então, a desidratação do material como descrito a seguir:

- ✓ Imersão em álcool 85 por três minutos
- ✓ Imersão em álcool 95 por três minutos
- ✓ Imersão em álcool absoluto I por cinco minutos
- ✓ Imersão em álcool absoluto II por cinco minutos
- ✓ Imersão em álcool absoluto III por cinco minutos
- ✓ Imersão em Xilol I por cinco minutos
- ✓ Imersão em Xilol II por cinco minutos

As lâminas foram montadas com lamínulas utilizando-se resina sintética - Permunt⁹ e avaliadas quanto à imunomarcagem em microscópio óptico¹⁰ em aumento de 400 X adaptado a uma câmera Leica DFC 500¹¹, e com o auxílio de um analisador de imagens¹², utilizando-se o programa Leica QWin Standard V2.5.

⁵ Sodium Chloride P.A., Merck, São Paulo – SP, Brasil. Cód. K31900304314.

⁶ Clone A-20, rabbit anti-human, Santa Cruz Biotechnology.

⁶ Antibody Diluent with Background Reducing Components - DakoCytomation – CA, USA. Cód S3022.

⁷ EnVision DualLink – DakoCytomation – CA, USA. Cód K4061.

⁸ 3,3'-diaminobenzidina - Liquid DAB Cromogen[®] – DakoCytomation – CA, USA. Cód K3468.

⁹ Fisher Scientific – Cód. UN1294.

¹⁰ Leica Microsystems – DMLB – Germany.

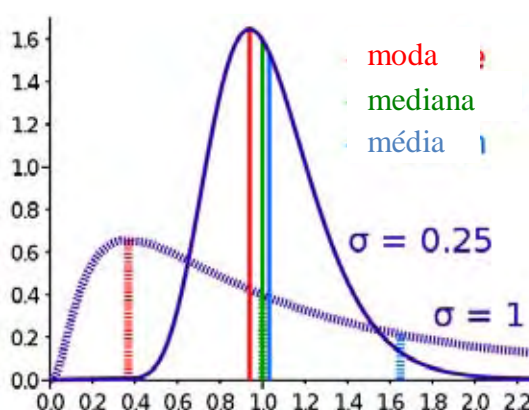
¹¹ Leica Microsystems – DMLB – Germany.

¹² Leica Q500IW.

Como controle negativo foi empregada a substituição do anticorpo primário pela imunoglobulina da mesma espécie deste, ou seja, foi empregada fração de imunoglobulinas séricas de coelho para os anticorpos policlonais mantendo-se idênticas as demais etapas da reação (controle do primário). Foi ainda realizado o controle negativo com a substituição do anticorpo primário por BSA 5% (controle do anticorpo secundário) mantendo-se, mais uma vez, o restante da reação. Por fim, foi realizada a incubação da lâmina apenas com DAB (controle do bloqueio da peroxidase endógena) ou apenas com o complexo terciário (avidina biotina peroxidase – AB) e DAB (controle do bloqueio da biotina endógena).

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Como os dados se tratam de uma graduação, classificação ou escore, esses valores foram comparados pelo teste de Análise de Variância (ANOVA) não paramétrico de Kruskal-Wallis a 5% de nível de significância. A mediana por definição indica o valor que divide em duas metades as amostras, ou seja, 50% dos valores classificados em cada amostra são maiores que a mediana e os outros 50% são menores. Portanto, não mostra para onde tende o pico da curva não-paramétrica.



A moda representa o valor de classificação que foi apresentado com maior frequência, demonstrando a característica mais comum de cada grupo nos diferentes momentos (ao longo do tempo).

Para comparar os valores de média e erro padrão da média dos ninhos glandulares contados nas amostras foi utilizado ANOVA, aplicando como pós teste Tukey quando necessário, a 5% de significância.

Para comparar os valores computadorizados médios de número de glândulas contabilizadas e área em pixel² utilizou-se ANOVA para medidas repetidas (RM) para o

mesmo grupo ao longo do tempo e Kruskal-Wallis para as comparações entre grupos no mesmo momento, seguidos do teste Tukey, (a 5% de significância) se necessário.

7. RESULTADOS

7.1 Resultados da avaliação histológica

Os resultados obtidos em relação as médias \pm erro padrão da média do número de ninhos glandulares avaliados nas amostras, demonstraram uma melhora significativa entre os momentos ($p=0,005$) (Tabela 02).

Tabela 02: Média e erro padrão da média do número de ninhos glandulares ao longo do tempo.

	D0	D15	D30	D60	P
CT	$15 \pm 2,04^b$	$10,44 \pm 2,13^{ab}$	$8,09 \pm 1,54^a$	$6,45 \pm 1,04^a$	0,005

Letras minúsculas distintas indicam diferença estatística entre os tempos ($p<0,05$).

A representação do número médio de ninhos glandulares avaliados ao longo do tempo, demonstrou através do histograma decréscimo significativo de ninhos glandulares ao longo do tratamento com célula tronco (Gráfico 01, Gráfico 02, Figura 09 e Figura 10).

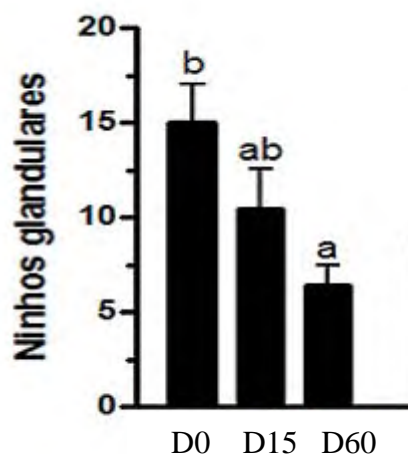


Gráfico 01: Representação do número médio de decréscimo da quantidade de ninho glandular entre os tempos D0, D15 e D60.

Na análise percentual do decréscimo no número médio de ninhos glandulares em dois intervalos de tempo, foi observado um decréscimo de 30,40% em um período de D0 ao D15 e de 57% entre o D0 ao D60 (Gráfico 02).

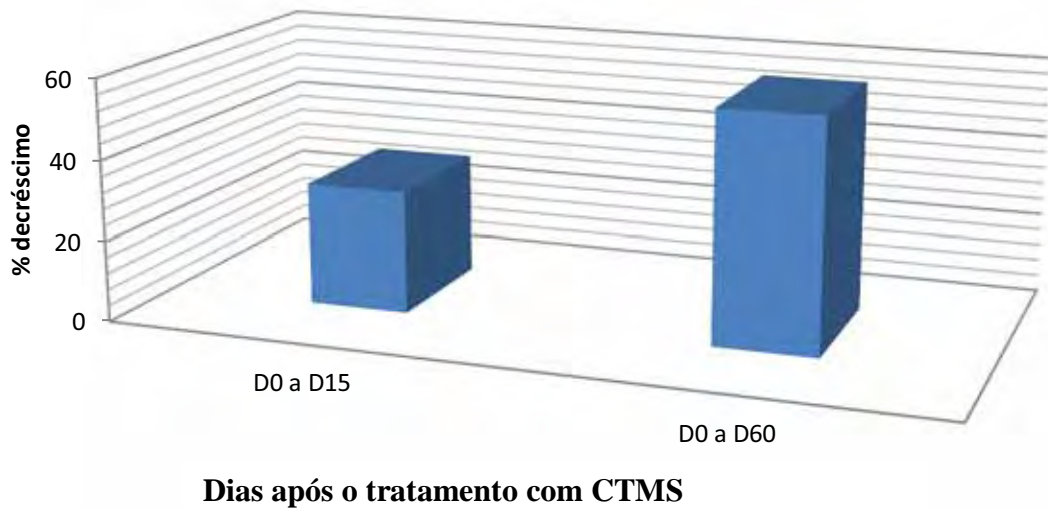


Gráfico 02: Representação do percentual de decréscimo da quantidade de ninhos glandulares do D0 até o D15 e do D0 ao D60.

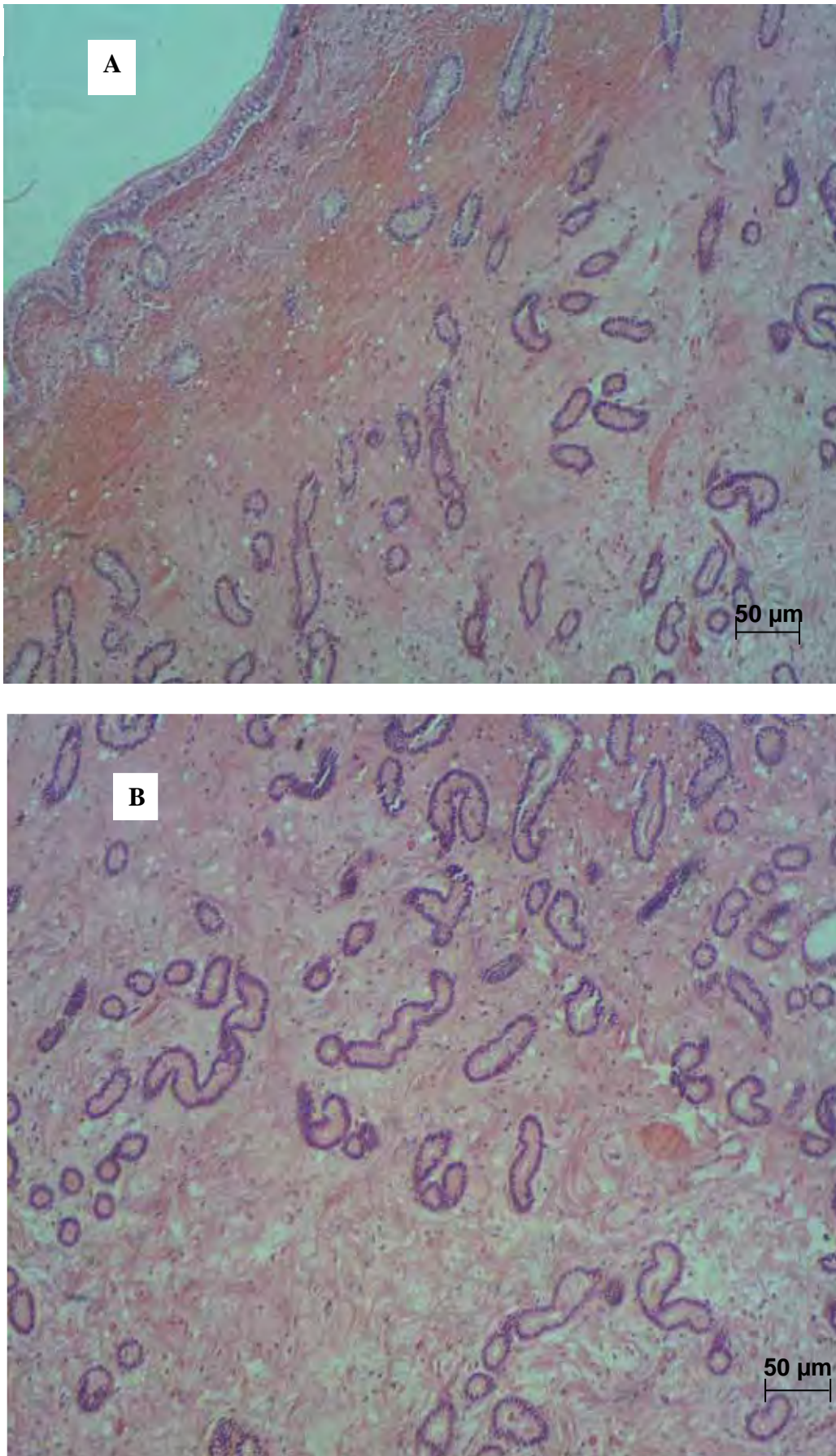


Figura 09: Foto da avaliação histológica de égua (nº08) previamente ao tratamento (D0) com célula tronco do estrato compacto (A) e do estrato esponjoso (B), observa-se baixa densidade glandular. Aumento de 200x.

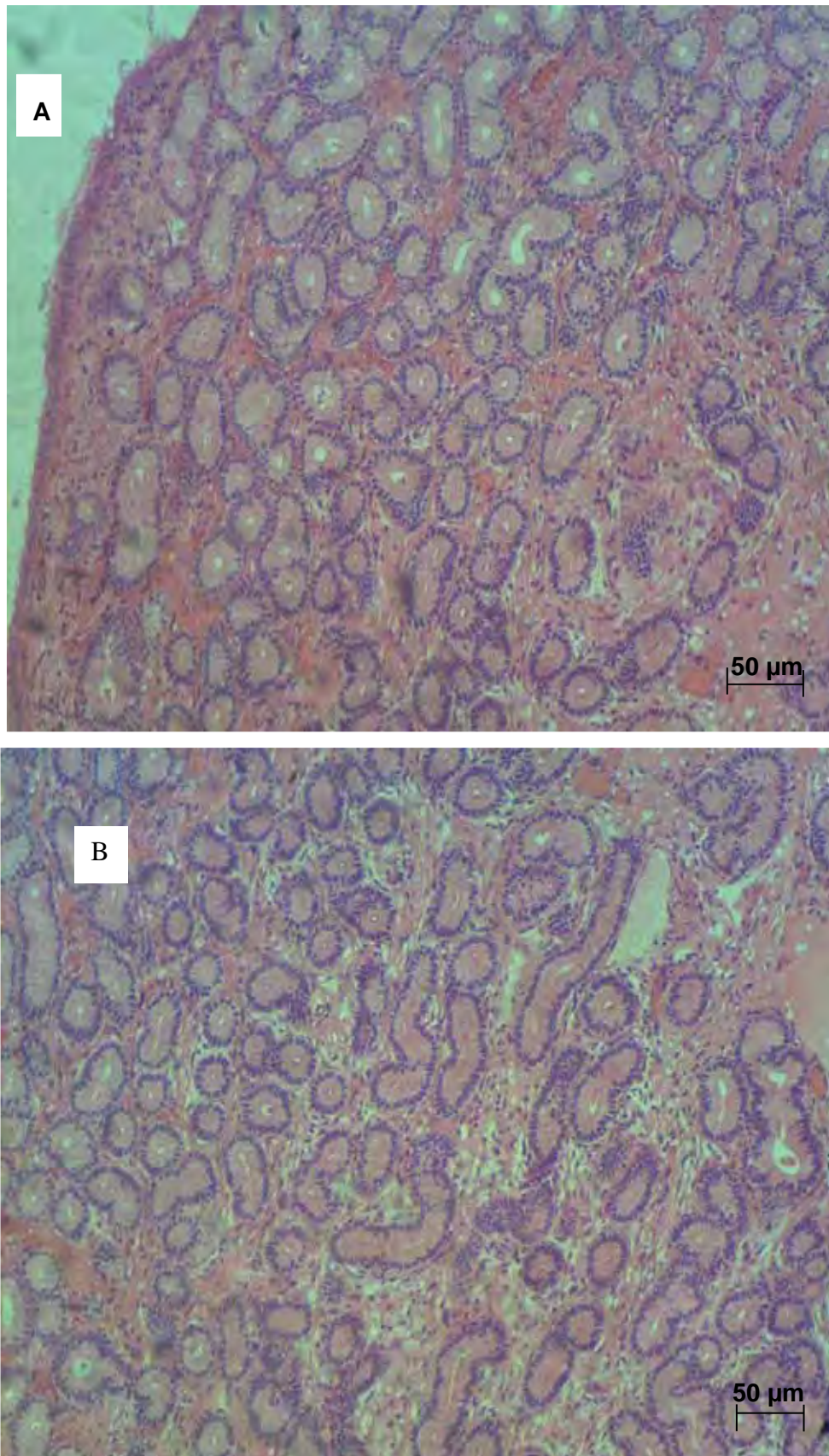


Figura 10: Foto da avaliação histológica de égua (n^o08) após o tratamento com célula tronco (D60) no estrato compacto (A) e no estrato esponjoso (B), observa-se uma evidente melhora na densidade e na distribuição glandular. Aumento de 200x.

Na comparação das medianas da classificação da presença de infiltrado inflamatório pela presença de neutrófilos no estrato compacto das biópsias endometriais dos grupos tratados, observou-se uma mudança significativa ($p < 0,001$) nas amostras entre os momentos de tratamento, indo de ausente (D0) a moderado (D30 e D60). Ainda se observou no D30 a presença de infiltrado moderado no CT descritos na tabela 03.

Tabela 03: Mediana da classificação do infiltrado inflamatório agudo caracterizado pela presença de neutrófilos no estrato compacto do endométrio entre os momentos.

	D0	D15	D30	D60	P
CT	1 ^a	4 ^a	5 ^b	5 ^b	<0,001

Letras minúsculas distintas indicam diferença estatística entre as colunas ($p < 0,05$).

1- Ausente; 2- Ausente/Leve; 3- Leve; 4- Leve/Moderado; 5- Moderado; 6- Moderado/Severo; 7- Severo

Estes valores da classificação das modas da presença de infiltrado inflamatório no estrato compacto nas biópsias de cada tratamento nos diferentes momentos analisados demonstram a característica geral do infiltrado inflamatório de células polimorfonucleares no estrato compacto dentro de cada momento representados no Gráfico 03.

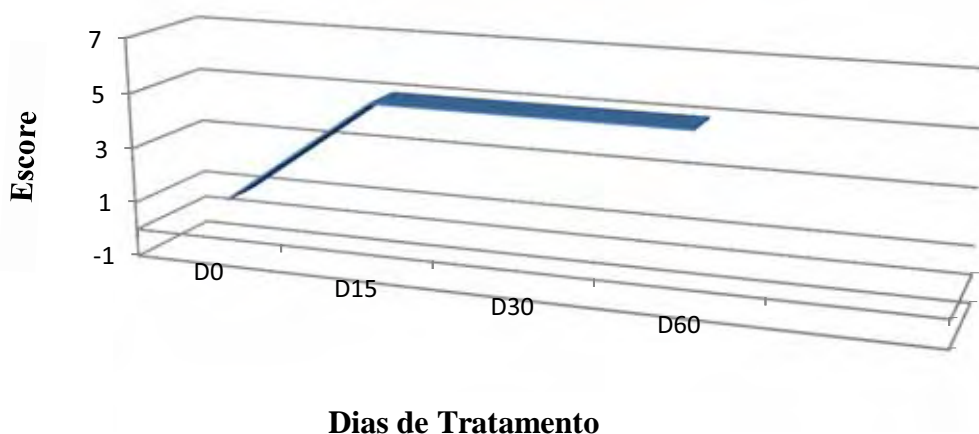


Gráfico 03: Gráfico representando as modas da classificação do infiltrado inflamatório no estrato compacto do endométrio entre o início do tratamento D0 e após o tratamento D15, D30 e D60 seguindo classificação por escore 1- Ausente; 2- Ausente/Leve; 3- Leve; 4- Leve/Moderado; 5- Moderado; 6- Moderado/Severo; 7- Severo

Na avaliação da presença de infiltrado inflamatório mononuclear difuso no estrato esponjoso nos momentos, verificou-se variações estatisticamente significantes ($p=0,036$) na caracterização das amostras, obtendo classificação 3 no momento D0 predominando infiltrado inflamatório mononuclear leve e classificação 5 de infiltrado inflamatório moderado nos demais momentos (tabela 04).

Tabela 04: Mediana da classificação da presença de infiltrado inflamatório difuso de células mononucleares no estrato esponjoso entre os momentos.

	D0	D15	D30	D60	P
CT	3 ^a	5 ^{ab}	5 ^b	5 ^{ab}	0,036

Letras minúsculas distintas indicam diferença estatística entre as colunas ($p<0,05$).

1- Ausente; 2- Ausente/Leve; 3- Leve; 4- Leve/Moderado; 5- Moderado; 6- Moderado/Severo; 7- Severo

Os valores das modas da classificação da presença de infiltrado inflamatório crônico; difuso das amostras nos diferentes momentos analisados demonstram a característica geral do infiltrado inflamatório difuso dentro de cada momento (Gráfico 04).

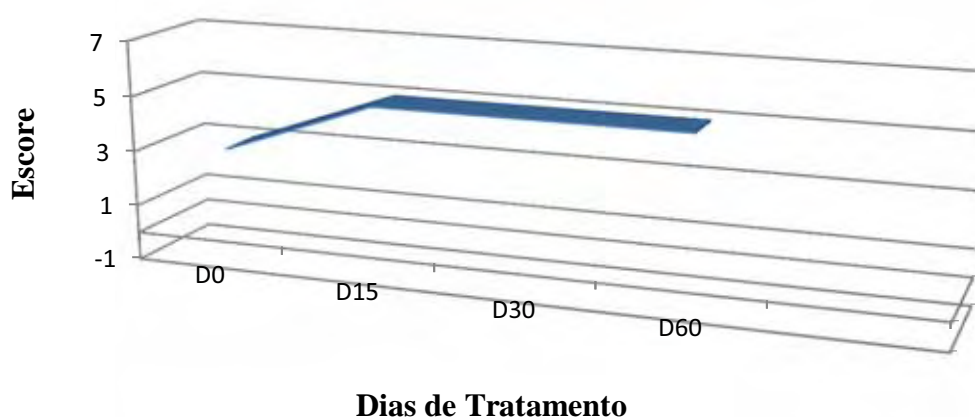


Gráfico 04: Gráfico representando as modas da classificação do infiltrado inflamatório difuso no início do tratamento (D0) e após o tratamento (D15 até D60) seguindo o escore sendo - Ausente; 2- Ausente/Leve; 3- Leve; 4- Leve/Moderado; 5- Moderado; 6- Moderado/Severo; 7- Severo

Na avaliação computadorizada relacionada à presença de glândulas endometriais contadas em cinco campos aleatórios, constatou-se aumento significativo no número de glândulas entre os tempos de tratamento descritos na tabela 05.

Tabela 05: Análise computadorizada do número médio (\pm erro padrão) de glândulas endometriais contadas em cinco campos histológicos aleatórios nos diferentes tempos.

	D0	D15	D30	D60	P
CT	163,12 \pm 19,93 ^d	240 \pm 17,36 ^c	354,75 \pm 19,24 ^b	431,75 \pm 18,93 ^a	<0,05

Nas linhas letras minúsculas distintas indicam diferença estatística (Tukey 5%)

Quanto à avaliação morfométrica da área de fibrose endometrial, verificou-se uma diminuição significativa entre os momentos D0 à D60 ($p < 0,023$) avaliados pela coloração de Tricrômio de Masson em cinco campos aleatórios pela análise computadorizada (Tabela 06, Figura 11 e Figura 12).

Tabela 06: Área (pixel^2) média (\pm erro padrão) de fibrose contadas em dez campos histológicos aleatórios de cada biópsia nos diferentes grupos.

	D0	D15	D30	D60	P
CT	1541198,73 \pm 750341,39 ^a	1067635,74 \pm 590901,58 ^{ab}	602204,69 \pm 320578,83 ^b	448714,44 \pm 241518,58 ^b	0,023

Nas linhas letras minúsculas distintas indicam diferença estatística (SNK 5%)

Na avaliação da área de fibrose endometrial, verificou-se diminuição de 70,98% entre os momentos de tratamento (D0 e D60) (Gráfico 05, Figura 11, Figura 12).

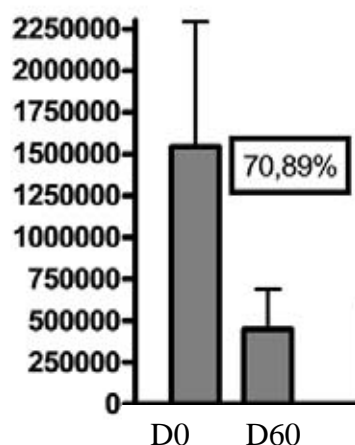


Gráfico 5: Representação gráfica da evolução ao longo do tempo (D0 e D60) da área de fibrose por meio da Coloração de Tricrômio de Masson, demonstrando diminuição do percentual de área com fibrose

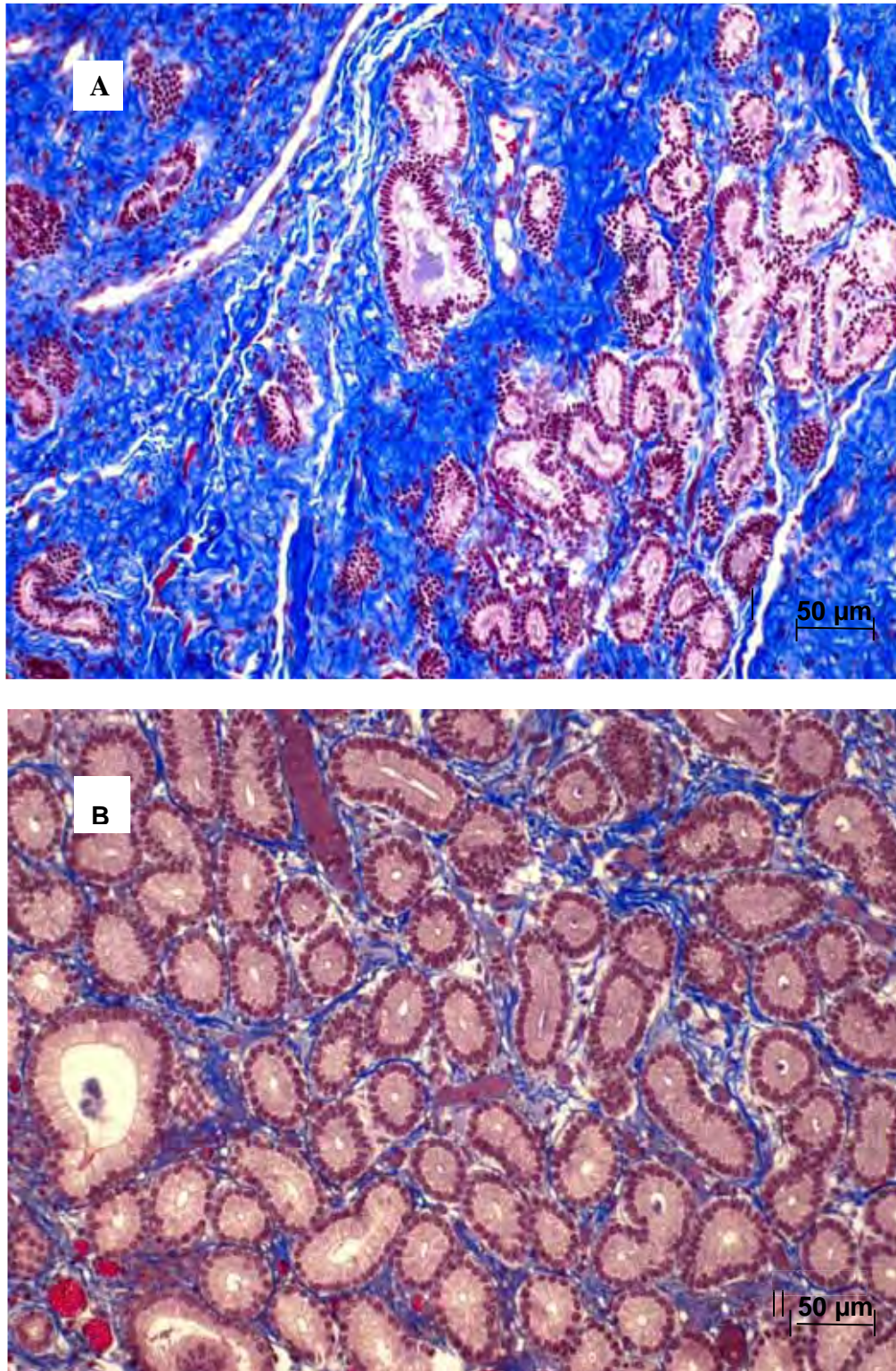


Figura 11: Avaliação histológica uterina através da coloração de Masson em égua (égua 02) previamente ao tratamento com célula tronco (A), observa-se uma grande área de fibrose (marcado em azul) no corte histológica representando o estrato esponjoso. Após 60 dias do tratamento (B), observa-se uma diminuição no grau de fibrose (coloração azul) e aumento da distribuição glandular. Aumento de 200x.

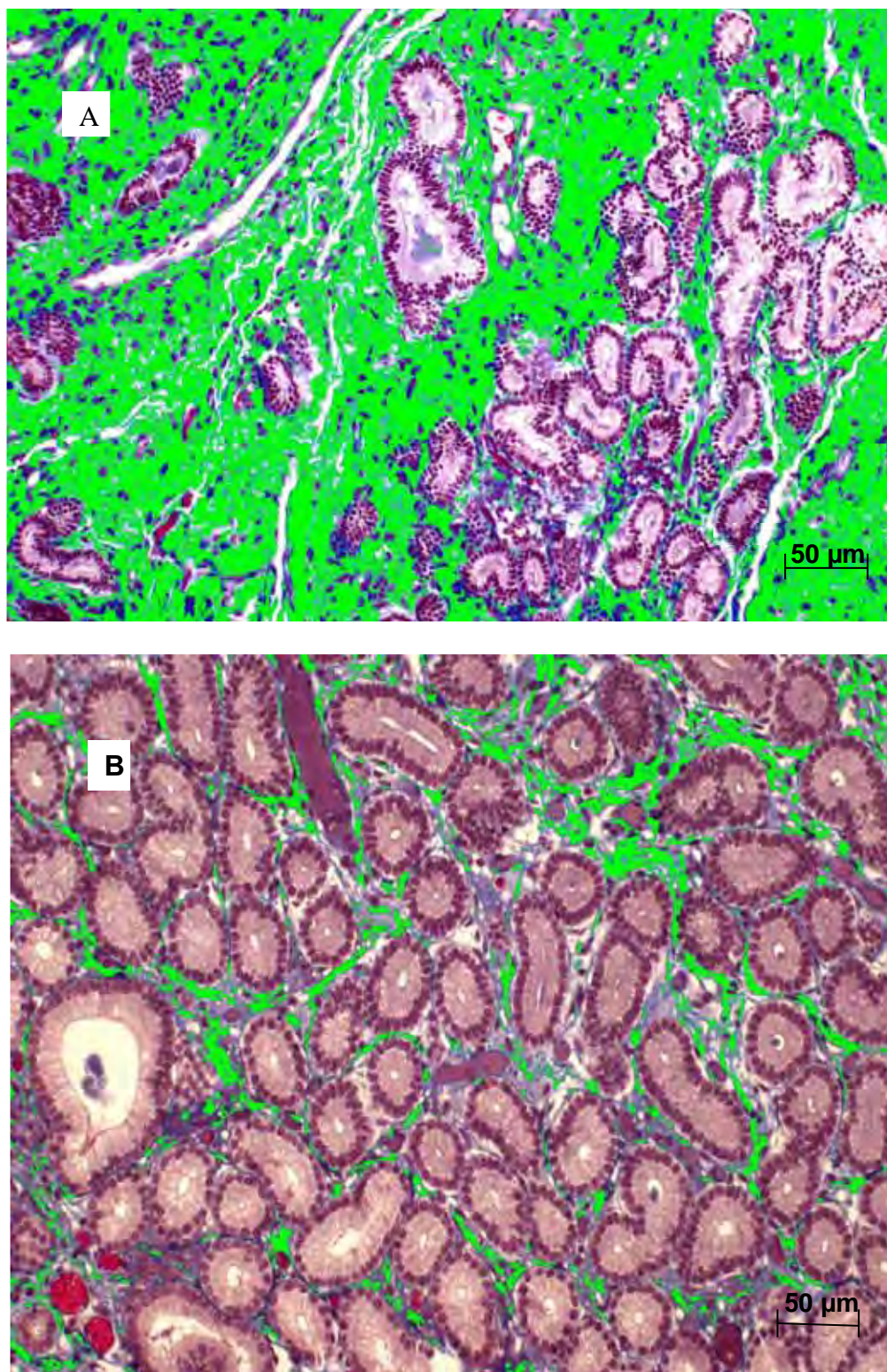


Figura 12: Avaliação histológica em égua (égua 02) previamente ao tratamento com célula tronco, (A) observando-se uma grande área de fibrose (marcado em verde por meio da aplicação do Software AVSOFT BIOVIEW, 2006) no corte histológico representando a o estrato esponjoso. A avaliação histológica de fibrose uterina na mesma égua após 60 dias de tratamento demonstra uma diminuição no grau de fibrose no corte histológico bem como aumento na distribuição glândular (B). Aumento de 200x

7.2 Resultados da avaliação por imunoistoquímica

Não houve alteração na quantidade de colágeno tipo I entre as avaliações das biópsias das éguas. Quanto colágeno tipo III observou-se uma diminuição significativa ($p=0,007$) de sua marcação por ao longo do tempo (D0 a D60) (Tabela 07).

Tabela 07: Mediana do escore para presença de colágeno tipo III marcado através de imunohistoquímica ao longo do tempo.

	D0	D15	D30	D60	P
CT	4 ^a	3,5 ^a	2 ^b	1,5 ^b	0,007

Letras minúsculas distintas indicam diferença estatística entre as colunas pelo teste Kruskal-Wallis ($p<0,05$).
1- ≤24% ;**2-** 24 a 49% ; **3-** 50 a 75% ; **4-** ≥75%;

Quanto à classificação da intensidade de marcação da coloração das lâminas de imunoistoquímica de colágeno tipo III (fibrose) por meio do software ABVIEW. Verificou-se diminuição significativa ($p<0,012$) entre os momentos do D0 à D60 representados na tabela 08.

Tabela 08: Mediana da classificação da Intensidade de marcação da coloração das lâminas de imunoistoquímica de colágeno tipo III (fibrose) entre (D0-D60)

	D0	D15	D30	D60	P
CT	3 ^a	2 ^{ab}	2 ^{ab}	1 ^b	0,012

Letras minúsculas distintas indicam diferença estatística entre as colunas pelo teste Kruskal-Wallis ($p<0,05$).
1- Fraco; 2- Moderado; 3- Intenso;

Quanto à distribuição de colágeno tipo III, não houve alteração significativa ($p=0,141$) entre os momentos D0 até D60 (Tabela 09).

Tabela 09: Mediana da classificação da distribuição da imunoistoquímica de colágeno tipo III (fibrose) entre os momentos D0 até D60.

	D0	D15	D30	D60	P
CT	2,5	2,5	2	1	0,141

Letras minúsculas distintas indicam diferença estatística entre as colunas pelo teste Kruskal-Wallis ($p<0,05$).
1- Focal; 2- Multifocal; 3- Difuso;

Quanto à área média de colágeno tipo III, não houve diminuição significativa ao longo do tempo (D0 – D60), apesar de ter existido uma tendência ($p=0,076$) em relação à área de colágeno tipo III verificada ao longo do tempo (Tabela 10, Figura 13, Figura 14).

Tabela 10: Área (pixel^2) média (\pm erro padrão) de colágeno III (Imunohistoquímica) contadas em dez campos histológicos aleatórios de cada biópsia.

	D0	D15	D30	D60	P
CT	726869,39 \pm 63200,81	1376998,31 \pm 632568,77	325529,40 \pm 54039,75	130685,80 \pm 7555,52	0,076

Nas linhas letras minúsculas distintas indicam diferença estatística (SNK 5%)

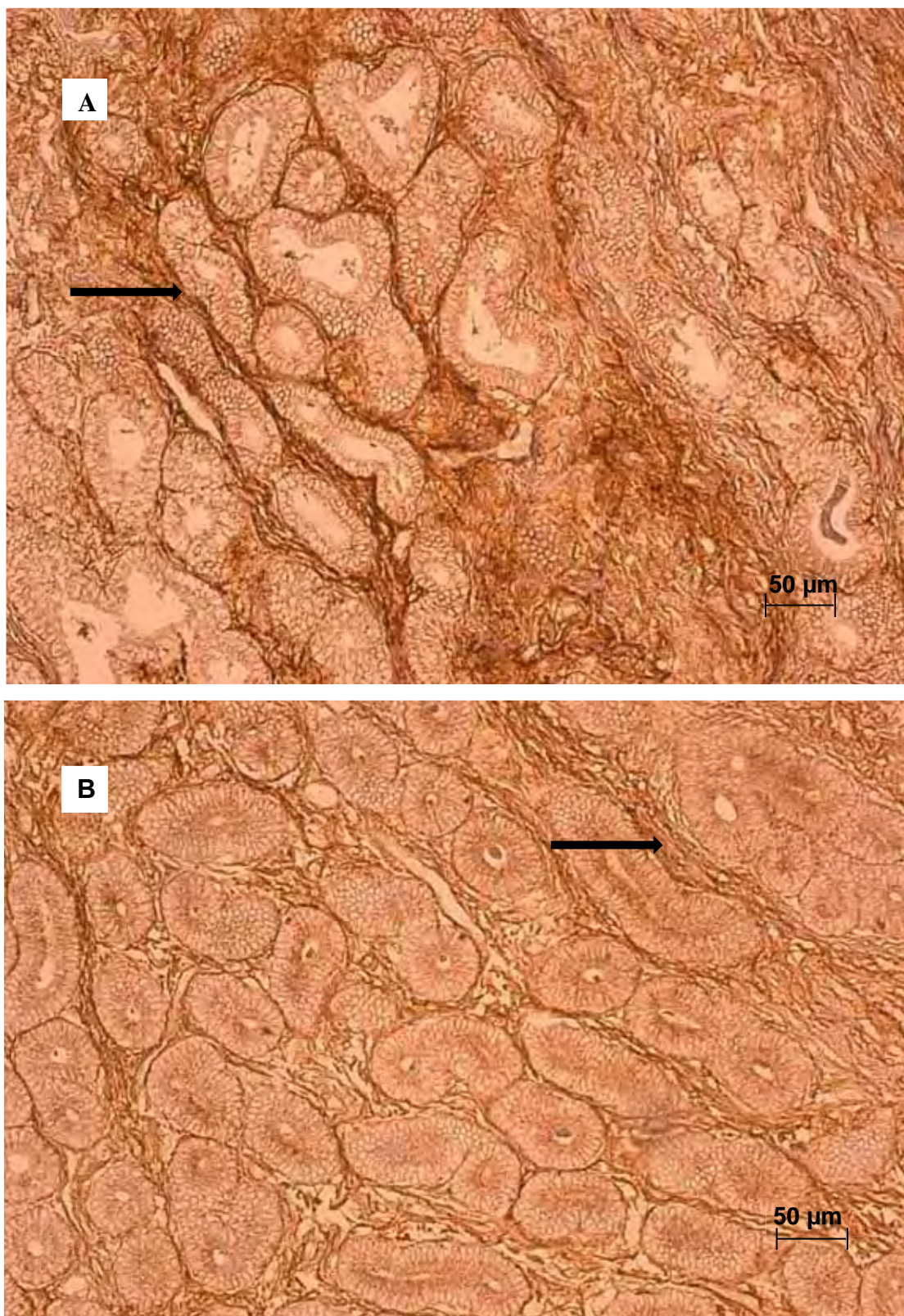


Figura 13: Avaliação Imunoistoquímica do colágeno tipo III em égua (égua 01) tratada com célula tronco. (A) No D0 observa uma grande área marrom escura entre as glândulas (setas), indicando a presença de colágeno tipo III. Além disso, foi observada uma menor densidade glandular aumento de 200x. (B) Avaliação Imunoistoquímica do colágeno tipo III em égua tratada com célula tronco no D60 (B). Observa uma diminuição no tom de marrom, indicando uma diminuição no colágeno tipo III, associada a uma maior densidade glandular. Aumento de 200x.

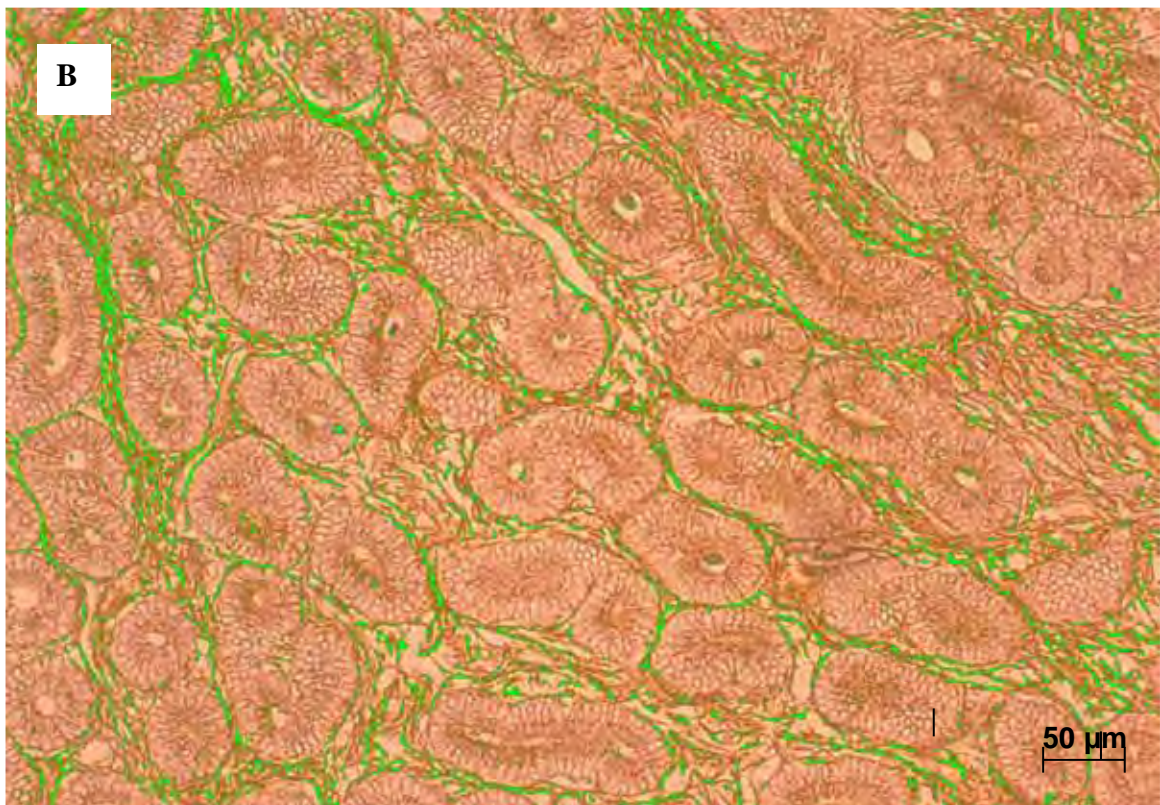
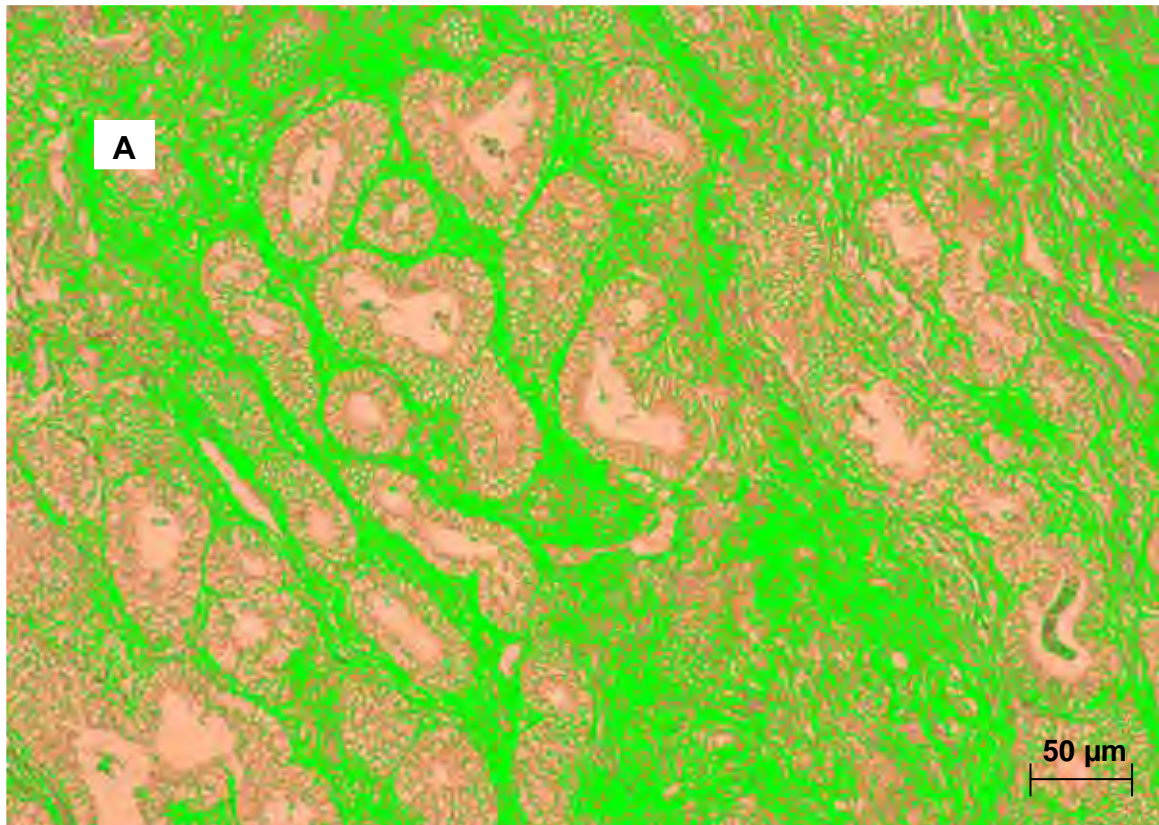


Figura 14: Avaliação Imunoistoquímica do colágeno tipo III em égua (égua 01) tratada com célula tronco. No D0 (A) a marcação verde, através do programa computadorizado demonstra a presença de colágeno tipo III entre as glândulas endometriais, aumento de 200x. Após 60 dias do tratamento com células tronco (B) a coloração verde, demonstra uma diminuição no colágeno tipo III entre as glândulas endometriais. Aumento de 200x.

8. DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho demonstraram de forma inédita ter ocorrido uma melhora no endométrio de éguas com processo degenerativo crônico quando tratadas com células tronco mesenquimais. Não foram observados efeitos deletérios ao animal bem como ao endométrio durante o tratamento. Vale ressaltar que nenhum estudo similar foi encontrado na literatura pesquisada, publicado em artigo completo, fato este que nos impediu de realizar comparações diretas com experimentos similares.

Diversos procedimentos terapêuticos foram estudados no passado na tentativa de melhorar as condições uterinas de éguas com processos degenerativos endometriais, caracterizados por fibrose, sem, contudo apresentar resultados favoráveis. Dentre as substâncias as mais utilizadas aparecem o DMSO (THRELFALL & IMMEGART, 2000), que demonstrou ser um grave irritante, provocando ulcerações e inflamação após o uso em forma de infusão, o querosene (BRACHER et al., 1991) que apresentou níveis de moderada a severa inflamação inicialmente após a infusão, sendo que metade das amostras apresentaram suave a severa necrose do epitélio luminal, sem ocorrer melhora do processo degenerativo e o iodo povidine (ARRUDA et al., 2003) induziu à inflamação intensa e aderências intra-uterinas, gerando um severa fibrose persistente.

Vários autores (SNIDER et. al 2011; WALLCHILI, 1990) têm descrito a associação do aumento da idade com a infertilidade e com aumento da fibrose uterina. Snider et. al (2011), relataram um elevado percentual de perdas de gestação em éguas velhas com fibrose uterina. Já Wallchili, (1990), observou alta incidência de fibrose uterina em éguas com idade superior à 11 anos. Estes trabalhos corroboram com nossos achados, pois a totalidade das éguas utilizadas no presente experimento apresentava idade avançada, entre 16 a 23 anos de idade, com elevado grau de fibrose endometrial diagnosticados por meio da análise histopatológica.

O processo degenerativo uterino em éguas é caracterizado por proliferação de tecido conjuntivo, presença de ninhos glandulares e glândulas endometriais atrofiadas. Os ninhos glandulares são estruturas que refletem a proliferação de tecido conjuntivo com presença das glândulas concentradas em grupos (KENNEY & DOIG, 1986). O excesso de tecido conjuntivo organizado ao redor das glândulas faz com que estas atrofiem e se tornem inábeis para desempenharem sua função. No presente experimento, observamos melhorias na estrutura do endométrio de éguas tratadas com células tronco

mesenquimais (CTMs). Dentre os achados, verificou-se ao longo do tempo diminuição do número de ninhos glandulares, aumento da densidade glandular e melhora da atividade glandular.

As CTMs utilizadas como tratamento no presente estudo, ao sofrerem o processo inicial de isolamento durante o cultivo celular, apresentaram-se com morfologia fibroblastóides (alongadas), características de células de origem mesenquimal, característica também encontrada por outros autores (OSHIMA et al. 2005) em CTMs provenientes de medula óssea dos fêmures e tíbias de ratos.

O protocolo adotado neste estudo para isolamento das células tronco mesenquimais obtidas tanto da medula óssea quanto do tecido adiposo foi eficaz, resultando na recuperação de células com morfologia de aspecto fibroblastóides, alta marcação na imunofenotipagem através da utilização de anticorpos monoclonais para o CD 44 (células mesenquimais) e baixa para o CD 34 (hematopoiéticas) corroborando com outros autores (KERN et al., 2004; ZHU et al., 2008). O método da avaliação das CTMs através da citometria de fluxo é um recurso utilizado para análise de forma rápida, objetiva e quantitativa as células em suspensão (FALDY et al., 2001). A marcação das CTMs para CD34 e CD44 pela citometria de fluxo nos animais domésticos é possível devido a produção de anticorpos monoclonais específicos (MCSWEENEY et al., 1998; HARTNTT et al., 2002). Entretanto, devido à baixa disponibilidade de anticorpos específicos para a espécie equina, no presente projeto foram utilizados anticorpos caninos, com os quais foi constatada previamente a reação cruzada. Desta forma, as CTMs tanto do nosso estudo como dos demais autores (PHINNEY & PROCKOP 2007; ZHU et al., 2008), foram caracterizadas pelo poder adesivo na placa de cultivo, bem como pela marcação negativa para o CD 34, e pela marcação positiva para CD44.

No teste de diferenciação celular, as CTMs obtidas da medula óssea (MO), foram capazes de se diferenciarem para células da linhagem condrogênica, adipogênica e osteogênica, dados que corroboram os resultados obtidos por Lima-Neto (2010); porém não foi observado o mesmo efeito benéfico na diferenciação das CTMS obtidos do TA. Consequentemente optou-se pela utilização de CTMs obtidas da MO para realizarmos o cultivo celular e o tratamento intra-endometrial.

Ao contrário do observado no presente experimento, a diferenciação das CTMs obtidas do tecido adiposo já foi descrita na literatura por outros autores (YARAK et al., 2010). A resposta negativa aos protocolos de diferenciação pode ter ocorrido devido a grande heterogenicidade da população de células estromais encontradas no tecido adiposo. O tecido adiposo (TA) é rico em tecido conjuntivo, composto por fibroblastos, os quais embora compartilhem diversos marcadores imunofenotípicos com as CTMs, são células que podem ter grande quantidade de células já diferenciadas e sem potencial multipotente. Smith (2011) ao utilizar CTMs obtidas da MO, verificou resultado satisfatório na recuperação de lesões tendíneas de equinos, embora, ressaltando a importância da utilização das CTMs obtidas da MO por ser um local de fácil obtenção celular, apresentando mínima morbidade ao doador, apresentar linhagem celular enriquecida de células indiferenciadas, além de apresentarem melhor multipontencialidade celular quando comparada com as obtidas do tecido adiposo (TA).

De fato, as CTMs podem expressar inúmeros marcadores imunofenotípicos que não são apenas específicos deste tipo celular, comprovando que o fenótipo antigênico das células tronco progenitoras hematopoiéticas e mesenquimais não é único (CHEN et al 2008). Devido ao fato da diferenciação de CTMs ser regulada por uma rede complexa de interações moleculares, que envolve moduladores de transcrição gênica, fatores de transcrição, proteínas quinases, fatores de crescimento e receptores celulares, diversos autores relatam a necessidade de estudos relacionados com os mecanismos que regulam a biologia das CTMs obtidas dos diversos tecidos como pré-requisito para a cultura e diferenciação, bem como utilização em terapias celulares. (CHEN et al., 2008; YARAK et al., 2010).

Ao utilizarmos CTMs obtidas da MO de éguas para o tratamento de Endometrite Crônica Degenerativa, verificou-se após tratamento aumento gradativo do infiltrado inflamatório. Este aumento significativo do infiltrado inflamatório, corroboram com os achados de Fortier & Smith (2008), em que afirmam que a terapia celular realizada com células tronco derivadas da medula óssea, atua modulando o processo inflamatório, promovendo aumento deste infiltrado após a administração de célula tronco mesenquimais autólogas na tentativa de recuperação de lesões.

Gutierrez et al., (2009) observaram em pacientes com fibrose pulmonar que foram submetidos ao tratamento com CTMs, um prévio aumento do processo

inflamatório, seguido do reparo tecidual alveolar, em função da minimização da fibrose no local. O mesmo foi observado por Yamada et al (2004), ao estudarem a reparação tecidual em fibrose pulmonar utilizando CTMs. Os autores verificaram que após o tratamento a presença de processo inflamatório acarretou no maior recrutamento de células progenitoras da MO para a circulação sistêmica, com posterior diferenciação em células epiteliais e endoteliais, reparando a lesão pulmonar.

Weiss et al., (2008) demonstrou ser necessária a presença de um processo inflamatório de leve a moderado para ocorrência do evento de quimiotaxia e consequentemente reparação da arquitetura histológica. Acredita-se que as CT adultas sejam recrutadas para o local da lesão através da liberação de sinais quimiotáticos como a produção de citocinas (IL6, IL7, IL8, IL 11, IL 12, IL 14, IL16) (KIN et al., 2005); quimiocinas e receptores de quimiocinas como CXCR5 e CCR10 (SELIGER et al., 2005), fatores de crescimento (BFGF-R, PDGF-R), fator estimulante de colônias de granulócitos (G-CSF); expressão de antígenos de adesão (Integrinas e moléculas de adesão intercelular (ICAM-1) liberados durante o processo inflamatório (KIN et al., 2005). Além disso, as CTMs conseguiriam atravessar a membrana basal do tecido lesionado e alcançar as áreas afetadas. Este processo só é possível porque o tecido possui a capacidade de produzir estas proteínas (citocinas e quimiocinas) que são capazes de regular a permeabilidade da membrana controlando assim o influxo de células no local da lesão e promovendo um aumento da expressão de moléculas de adesão específicas (KRAUSE et al., 2008).

Outra característica avaliada e observada neste trabalho foi o aumento significativo do número e da densidade das glândulas endometriais após o tratamento com CTMs ao longo do tempo. Este aumento foi constatado tanto pelos padrões subjetivos quanto computadorizados, tendo esta melhora já sido evidenciada após 15 dias de tratamento. Além disso, verificou-se melhora significativa da atividade glandular as quais inicialmente em sua grande maioria apresentavam-se inativas e evoluíram para atividade ao longo do tempo após o tratamento. Supõe-se que esta melhora tenha ocorrido em função da ação de fatores quimiotáticos que modulam do processo inflamatório (WEISS et al., 2008), como também pelo aumento da vascularização local do tecido (CAPLAN et al., 2007), pois as lesões fibróticas localizam-se principalmente ao redor de estruturas glandulares (PORTO et al., 2004;

EVANS et al., 1998) com conseqüente comprometimento de sua função levando redução do crescimento fetal e alterações das secreções endometriais que vão influenciar a performance reprodutiva da égua (EVANS et al, 1998).

Apesar de não ter sido verificado o aumento da angiogênese neste estudo, podemos supor que houve aumento da irrigação sanguínea no tecido, por ter ocorrido reparo da lesão e portanto substituição do tecido fibrótico mais denso (Colágeno III) pelo mais flexível (Colágeno I) característica descrita pelos autores BOCHSLER & SLAUSON, (2002). Além disso, houve reparação da fibrose do endométrio e conseqüentemente de todo endotélio, existindo a possibilidade de ter ocorrido à substituição da fibrose perivascular por um tecido conjuntivo mais flexível, melhorando a irrigação tecidual e provavelmente ter melhorado a atividade glandular. Assim, estas glândulas que anteriormente se encontravam atrofiadas, melhoraram sua atividade, com conseqüente melhora na distribuição destas no estrato esponjoso. Pode-se também ressaltar que esta melhora da reparação do endométrio das éguas tenha ocorrido em função do aumento da angiogênese como observados em outros estudos ao utilizarem o tratamento com CTMs. (BLISS et al., 2007; CAPLAN et al., 2007), bem como em estudos clínicos realizados em humanos (CHOPP et al., 2002), que observaram efeito benéfico na recuperação funcional de animais isquêmicos quando as CTMs foram injetadas via intravenosa, intra-arterial ou intracerebral. Estes mesmos autores, verificaram melhora em função de um possível mecanismo de ação que envolva ações tróficas das células injetadas, resultando em um aumento da angiogênese, neurogênese e sinaptogênese com conseqüente aumento no remodelamento do sistema nervoso e funcionalidade do tecido.

Alguns autores (NUNES et al., 2003; NUNES et al., 2008; PORTO et al., 2009) ao estudarem o endométrio de éguas com endometrite crônica degenerativa, verificaram a deposição do colágeno na região periglandular como sendo a principal característica encontrada neste tecido, o que leva a atrofia glandular e ao comprometimento do suprimento sanguíneo para estas estruturas, comprometendo tanto a produção de substâncias histotróficas como favorecendo à morte embrionária precoce (FERREIRA-DIAS et al., 1994). Estas observações vão ao encontro com os achados do presente estudo, onde foi observado nas amostras estudadas que em DO havia a presença de focos

fibróticos e de ninhos glandulares em toda extensão da lâmina estudada, em diferentes graus de severidade.

Nos processos fibróticos, há a substituição dos depósitos de ácido hialurônico e fibronectina, que ocorrem desde o início do processo inflamatório, por colágeno tipo I e III principalmente. Outros tipos de colágeno também são encontrados nesses processos, porém em menor quantidade. É a deposição desses dois tipos de colágenos estruturalmente rígidos que gradualmente promovem o desenvolvimento do tecido cicatricial com maior força tensora (BOCHSLER & SLAUSON, 2002).

Para identificação, distribuição e tipificação do colágeno presente nas amostras de éguas que continham processos degenerativo crônicos previamente selecionados, foi empregado o método de avaliação Tricrômio de Masson indicado para quantificar o colágeno pelo método morfométrico, e pela Imunohistoquímica que identifica os tipos de colágenos presentes na fibrose com anticorpos monoclonais conforme já descrito por Carvalho et al., (2007). Estes métodos empregados permitiram a identificação de focos de fibrose, bem como sua distribuição e quantificação, além da identificação dos tipos de colágenos presentes.

Na análise computadorizada realizada, verificou-se diminuição significativa da área de fibrose ao longo do tempo, melhora da densidade e distribuição glandular, conseqüente aumento do número de glândulas contadas objetivamente. Observou-se assim remodelação tecidual entre os momentos com melhora da funcionalidade da atividade glandular. A diminuição da área de fibrose no tecido pode ter sido favorecida pelo melhora da distribuição glandular, melhora da atividade glandular evidenciado nos tecidos endometriais de éguas tratadas com CTMs.

Oliveira et al (2011) estudando tendinite induzida em equinos observou a presença do colágeno I no tecido sadio e colágeno III na presença de fibrose concordando com os achados de Walter et al (2000) que ao realizarem imunohistoquímica do útero das éguas para os colágenos I e III, observaram ausência do colágeno I na fibrose endometrial severa das éguas; divergindo de Porto et al (2008), que ao utilizarem a técnica e Picrosirius – Polarização Red verificaram nos casos de endometrites crônicas fibróticas substituição das fibras de colágeno I por colágeno tipo III considerando-o relacionado com o tecido sadio. Outros autores (LOVEIRA et al., 2011; WALTER et al., 2000), encontraram fibras de colágeno I em éguas classificadas

como normais (categoria I), e colágeno tipo III em éguas com processo degenerativo crônico grave (categoria III), concordando com os achados do presente estudo, pois, ao realizarmos a imunohistoquímica verificamos fibras de colágeno III presentes nos processos de fibrose.

A caracterização das fibras de colágeno I, não foi possível, pois todas as lâminas em todos os momentos demonstraram aumento da imunomarcagem para este anticorpo. Este problema também detectado por Galvão et al., (2007) e Carvalho et al (2008) sugere-se ter ocorrido por algum tipo de reação cruzada com outro tipo de colágeno e /ou produção de artefatos, imunomarcando o fundo da lâmina, ou até mesmo por esta fibra estar presente em todos os tecidos em grande quantidade tanto em processos fibróticos quanto normais. Desta forma, optamos apenas por avaliar a imunomarcagem com a fibra de colágeno III seguindo a mesma metodologia de outros autores (CARVALHO et al., 2008; GALVÃO et al., 2007).

Ao avaliarmos a imunomarcagem de colágeno III pelo método de Imunohistoquímica, verificamos que houve uma diminuição significativa ao longo do tempo (D0 a D60) no grupo tratado com CTMs em relação aos demais tempos de tratamento. Apesar de haver poucos estudos relacionados com este tipo de análise, Oliveira et al (2011) recentemente verificou, em tratamento de tendinite em equinos com CTMs, a presença de fibras de colágenos remodeladas e alinhadas resultante da substituição de uma fibra mais densa de fibrose por outra menos densa (colágeno III) (MATSUMOTO et al., 2002). Estes autores também verificaram que na avaliação imunohistoquímica houve predominância do colágeno tipo I no tecido sadio e maior predominância do colágeno tipo III no tecido cicatricial.

Ao classificarmos a intensidade de coloração das lâminas pelo método de imunohistoquímica para marcação de colágeno tipo III, observamos uma diminuição significativa ao longo do tempo (D0 – D60) no grupo tratado. Esta intensidade estava relacionada com a quantidade de fibrose presente no tecido que demonstrou ser maior significativamente no D0 quando comparado com o D60. Outros autores concordando com nossos achados, ao avaliarem a intensidade de colágeno por imunofluorescência também verificaram que houve marcação difusa para a amostra de tendão de colágeno I e prevalência de colágeno III nos processos de fibrose, demonstrando a continuidade do

processo de cicatrização tanto em cavalos (OLIVEIRA et al., 2011); como em humanos (HANKEMEIER et al., 2009).

Estudos recentemente realizados em animais que foram submetidos à indução de cirrose hepática e tratados com CTMs verificou-se redução significativa da fibrose, tanto quando as células foram administradas no lóbulo hepático, quanto pela administração por via endovenosa (SCHETTERT et al, 2008). Da mesma forma, ratos foram induzidos com paracetamol à falência hepática fulminante (HEUBI et al., 1998), e posteriormente tratados com CTMs heterólogas, constatando aumento significativo da sobrevivência dos animais testados, aspecto histológico e morfológico do fígado considerados normais com ausência de fibrose e necrose, e tendência de retorno aos valores normais da enzima Alanina Transferase (ALT) após 72 da indução da lesão (BELARDINELLI et al., 2008). Observações similares foram feitas por Orlic et al., (2001), que notaram em camundongos infartados, melhora da função ventricular e da formação de novas fibras musculares no coração quando receberam CTM autóloga de origem medular.

Em camundongos que constavam da doenças de chagas crônica, ao receberem injeção de CTM autóloga da medula óssea, houve redução no grau de fibrose do miocárdio quando comparado com o grupo que não recebeu o tratamento com CTMs (SOARES et al., 2004). Seguindo este mesmo modelo experimental previamente citado, outros autores (VILAS BOAS et al, 2004) testaram a utilização de CTMS em pacientes humanos que apresentavam a doença de chagas, e constataram redução no grau de fibrose e melhora na função cardíaca após o tratamento com CTM autólogas da medula óssea. Efeitos benéficos também foram descritos em ratas que foram previamente tratadas com ciclofosfamida e após em um período de avaliação que oscilou de 2-8 semanas da injeção de CTMs, demonstraram melhora da função e estrutura dos ovários, além de diminuição dos níveis de apoptose das células granulosas do ovário (LIU et al., 2008).

Apesar da reconhecida capacidade regenerativa das células tronco mesenquimais já citados na literatura no reparo dos tecidos, esta terapia não havia sido aplicada no tratamento de lesões endometriais. É bem conhecido que as células tronco mesenquimais participam do processo de crescimento, remodelação e cicatrização tecidual (RICHARDSON, 2005), onde o implante das células tronco mesenquimais causa o aumento do número de células progenitoras que normalmente estão presentes no

tecido afetado, aumentando assim, seu potencial de regeneração (FORTIER & SMITH, 2007). Estes achados vem de encontro com os observados no presente trabalho em que o uso da terapia com células tronco mesenquimais autóloga de origem medular foi benéfica na recuperação de lesões endometriais crônicas em eqüinos. Contudo, estudos futuros se fazem necessários para determinar o impacto desta terapia na fertilidade de éguas.

9- CONCLUSÕES

Baseado nos resultados obtidos e nas condições nas quais foi realizado o presente experimento podemos concluir que:

- O tratamento de éguas com processo crônico degenerativo com células tronco mesenquimais oriundas da medula óssea foi eficiente em melhorar a arquitetura histológica no que diz respeito a atividade e distribuição glandular e bem como levou a diminuição do tecido fibrótico.

10. REFERÊNCIAS

ALVARENGA, M.A. Como tratar e diagnosticar endometrite fungica em éguas. IX Conferência anual da ABRAVEQ e IV Congresso Internacional de Medicina Veterinária FEI/CBH, CD divulgação, 2008.

ALVARENGA, M.A. Comparação entre o exame citológico e histológico na detecção de alterações fisiológicas e patológicas do endométrio equino. **Tese de Doutorado**, Faculdade de Medicina. UNESP, Campus de Botucatu-SP, 1996.

ARMANDO DE MATTOS CARVALHO, ANA LIZ GARCIA ALVES, PATRÍCIA GALVÃO GOMES DE OLIVEIRA, LUIS EMILIANO CISNEROS ÁLVAREZ, RENÉE LAUFER AMORIM, CARLOS ALBERTO HUSSNI, ELENICE DEFFUNE. Use of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells for Experimental Tendinitis Therapy in Equines. **Jour. of Equi. Veter. Scienc.** v. 31, p. 26-34, 2011

ARRUDA, R.P.; SOUZA, L.W.O.; CELEGHINI, E.C.C.; SOUZA, F.A.C. Tratamento das endometrites em éguas. **Anais do I SIMEQ**, Curitiba-PR, p. 03-13, 2003.

ASBURY, A.C. Endometritis in the mare. In: MORROW, D.A. **Current therapy in theriogenology**. 2.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, p. 718-722, 1986.

AUST, L.; DEVLIN, B.; FOSTER, S. J. Yield of human adipose derived adult stem cells from liposuction aspirates. **Cytotherapy**, vol. 6, p 7–14, 2004.

BARREIRA, A.; ALVES, A. L. G. **Implante Autólogo de Células Mesenquimais no Tratamento da Tendinite Induzida em Equinos; Avaliação Clínica, ultrasonografia e Imunohistoquímica**. 2005, p. 98. Tese (Doutorado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

BELARDINELLI, M.C. R. **Efeito da administração da fração mononuclear de celular de medula óssea heteróloga em ratos submetidos à lesão hepática aguda provocada por paracetamol.** Rio Grande do Sul, 2008, 81p Tese (Doutorado), Universidade Federal do Rio Grande do Sul

BENJAMIN E. R., MARTIN F. P., CHUI-YEE FONG, A. T., BONGSO, A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro, **Nature Biotechnology**, v. 18,p.398-404, 2000.

BHATTACHARYA, V. et al. Enhanced endothelization and microvessel formation in polyester grafts seeded with CD34+ bone marrow cells. **Blood**, v.95, n.2, p.581-585, 2000.

BIRGT, A.B.; HONOLD, J.; VOLKER, S.; MARTINNA, B.B.; ULRICH, F.; RASOKAT, R.L. Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction. **N. Engl. Med.**, v. 355, p. 1222-1232, 2006.

BLISS, T.; GUZMAN,R.; DAADI, M.; STEINBERG, G.K. Cell transplantation therapy for stroke. *Stroke*. v.38 (2 Suppl), p.817-826, 2007.

BOCHSLER, P. N.; SLAUSON, D. O. Inflammation and repair of tissue. In: SLAUSON, D.O; COOPER, B. J. **Mechan. of disease**. St. Louis: Mosby, Cap. 4, p. 140-245, 2002.

BRACHER, V; NEUSCHA, A; ALLEN, W.R. The effect of intra-uterine infusion of kerosene on the endometrium of mares. **J. Reprod. Fert.**, Suppl. 44, , p. 706-707,1991.

CAPLAN I.A. Adult Mesenchymal Stem Cells for Tissue Engineering Versus Regenerative Medicine. *Jour. of Cell Physiol.* v.213, Issue 2, p. 341–347, November 2007.

CARVALHO, A. M. **Implante autólogo de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo no tratamento de tendinites experimentais em equinos: avaliação clínica, ultrassonográfica, histopatológica e imunoistoquímica.** 2009.

134f. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP

CHEN, J.C.J., GOLDHAMER, D.J. Skeletal muscle stem cell. **Reprod. Biol. Endocrinol.** V. 1, p.1-7, 2008

CHOPP, M.; LI, Y. Treatment of neural injury with marrow stromal cells. *Lancet Neurol.* v.2; p. 92-100, 2002.

CONRAD C., HUSS R. Adult Stem cell lines in regenerative medicine and reconstructive surgery. **Journal of Surgical Research**, v.124, 201-208, 2005.

COPLAND, I.; SHARMA, K.; LEJEUNE, L.; ELIOPOULOS, N.; STEWART, D.; LIU, P.; LACHAPELLE, K.; GALIPEAU, J. CD34 expression on murine marrow-derived mesenchymal stromal cells: impact on neovascularization. **Experimental Hematology**, v. 36, p. 93-103, 2007.

CROVACE, A.; LACITIGNOLA, L.; ROSSI, G. *et al.* Histological and immunohistochemical evaluation of autologous cultured bone marrow mesenchymal stem cells and bone marrow mononucleated cells in collagenase-induced tendinitis of equine superficial digital flexor tendon. **Vet. Med. Int.**, v.2010, 2010.

DOIG, P. A.; WAELCHLI, R.O. Endometrial biopsy. In: McKINNON, A. O.; VOSS J.L. **Equine Reprod.**, Filadélfia: Lea & Febiger, p. 225-233, 1993

EVANS T.J.; MILLER M.A.; GANJAM V.K.; NISWENDER, K.D.; ELLERSIECK, M.R.; KRUSER, W.J.; YOUNGQUIST, R.S. Morphometric analysis of endometrial periglandular fibrosis in mares. **Am. J. Vet. Res.** v. 59 (10), p. 1209-2014, 1998.

FALDYNA, M. Lymphocyte subsets in peripheral blood of dogs – a flow cytometric study. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.82, n.1-2, p.23-37, 2001.

FANG, B.; SHI, M.; LIAO, L.; YANG, S.; LIU, Y.; ZHAO, R.C. Systemic infusion of FLK1 (+) mesenchymal stem cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice. **Transplantation**, v.78, p. 83-88, 2004.

FERREIRA-DIAS, G., NEQUIN, L.G. Morphologic characteristics of equine endometrium classified as Kenney categories I, II and III, using light and scanning electron microscopy. **Am. J. Vet. Res.** v.55, p.1060-1065, 1994.

FIBBE W. E. Mesenchymal stem cells. A potential source for skeletal repair. **Ann Rheum Dis**; 61(Suppl II):ii29–ii31, 2002.

FORTIER, L. A.; SMITH, R. K. Evidence for Stem Cells in Cartilage Regeneration. **AAEP Proceedings**, v. 53, 2007.

FORTIER, L. A.; SMITH, R. K. Regenerative Medicine for Tendinous and Ligamentous Injuries of Sport Horses. **Veterinary Clinics. Equine Practice**, v. 24, p. 191-2041, 2008.

FORTIER, L. Stem Cells: Classifications, controversies, and Clinical Applications. **Veterinary Surgery**, v.24, p. 415-423, 2005.

FRIEL E., SAR S., MEE J. P. Embryonic stem cells: understanding their history, cell biology and signalling. **Advanced Drug Delivered Reviews**, v. 57, 1894-1903, 2005.

FRISBIE DD, SMITH R KW. Clinical update on the use of mesenchymal stem cells in equine orthopaedics. **Equine Vet J**, v..42, P.86-89. 2010

FRONTIE, L.A, TRAVIS, A.J. Stem cells in veterinary medicine. **Stem Cell Res Ther**, v.2, p.9, 2011

FU X., QU Z., SHENG Z. Potentiality of Mesenchymal Stem Cells in Regeneration of Sweat Glands. **Journal of Surgical Research**, v. 136 (2), p. 204-208, 2006

GIMBLE, J.; GUILAK, F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. **Cytotherapy**, v.5, No5, p. 362-369, 2003.

GRINDEM, C.B. Blood cell markers. *Veterinary Clinics of North America: Small Anim. Practi*, Philadelphia, v.26, n.5, p.1043-1065, 1996.

GUN-II, I.; YONG-WOON, S.; KEE-BYUNG, L. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? **Osteo Arthritis and Cartil.**, v. 13, 2005.

GUTIERREZ-MARON, T.; ARAUJO I.; MORALES, M. M.; GARCIA, C.S.N.B.; ROCCO, R.M. Terapia com Células Tronco na síndrome do desconforto respiratório agudo. **Rev. Bras. Ter. Intensive**. v.21, p.51-57, 2009.

HANKEMEIER, S. Tissue engineering of ligaments by human bone marrow stromal cells in liquid fibrin matrix: histological, biomechanical and molecular biological results of a study with immunodeficient rats. In: **ORTHOPAEDIC RESEARCH SOCIETY MEETING**, 51, Washington, 2008, p.157

HARASZTI, J. New method for the treatment of sterility in cattle and horses. **Proc. IVth Int. Cong. Anim. Reprod.**, 3, p 690-692. 1961

HENG, B.C.; HAIDER, H.K.; SIM, E. K-W.; CAO, T.; NG, S.C. Strategies for directing the differentiation of stem cells into the cardiomyogenic lineage in vitro. **Card. Res.**, v.62, p. 34-42, 2004.

HERZOG, E.L., et al. Plasticity of marrow-derived stem cells. **Blood**, v.102, n.10, p.3483-3493, 2003.

HEUBI, J. BARBACCI, M.; ZIMMERMAN, H. Therapeutic misadventures with acetaminophen: Hepatotoxicity after multiple doses in children. **J. Pediatr**, v.132, p.22-27, 1998.

HONG, L.; PEPTAN, I.; COLPAN, A.; DAW, J. Adipose Tissue Engineering by Human Adipose-Derived Stromal Cells. **Cells Tissues Organs**, 183, p. 133-140, 2006.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KATHELEEN, P.F. Bone marrow evaluation.. In. FELDMAN, B. F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Shalm's Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lippencott Williams and Wilkins, cap. 5, p. 29-32, 2000.

KENNEY, R. M.; DOIG, P.A. Equine endometrial biopsy, In: MORROW, D. A. **Current therapy in theriogenology II**. Philadelphia: W.S. Saunders, p.1143, 1986

KENNEY, R.M. Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detect by biopsy, with a note on early embryonic death. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* v. 1, p.241-261, 1978.

KERN S.; EICHLER H.; STOEVE J.; KLUTER H.; BIEBACK K. Comparative analysis of mesenchymal stem cell from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cell*, v.24, p. 1294-1301, 2004

KIN, C.F.B.; JACKSON, E.L., WOOLFENDEN, A.E.; LAWRENCE, S.;BABAR, I.; VOGEL, S.; CROWLEY, D.; BRONSON, R. T.; JACKS, T. Identification of Bronchioalveolar Stem Cells in Normal Lung and Lung Cancer. *Cell*, v.121, p.823-835, 2005.

KRAUSE, D.S. Bone marrow-derived cells and stem cells in lung repair. *Proc. Am. Thorac. Soc.* v.3, p.323-327, 2008.

LANGONI, H, ALVARENGA, MA , PAPA, FO, LISTONI, F. Participação das bactérias aeróbicas e anaeróbicas na Endometrite em éguas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v 23, p. 44-51,1999.

LEBLANC, M.M. Persistent mating-induced endometritis. In: ROBINSON, N.E. **Current therapy in equine medicine**. 5.ed. St. Louis: Elsevier Science, p. 234-237, 2003.

LIMA-NETO, J.F. **Isolamento, caracterização e diferenciação de células tronco embrionárias e mesenquimais de equinos**. Tese de doutorado, 108p, 2010.

Liu W,X, He Y, Xie C,. Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation improves ovarian function and structure in rats with chemotherapy-induced ovarian damage. **Cytotherapy**, v.10, p.353-63, 2008.

LOSINNO, L.; ALVARENGA, M.A. Fatores que afetam a taxa de recuperação embrionária em eqüinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, suppl. 34, p.22-32, 2006.

LUYTEN F. P. Mesenchymal stem cells in osteoarthritis. **Curr Opin Rheumatol**, v.16; p.599–603, 2004

LYRA AC, SOARES MBP, DA SILVA LFM, FORTES M, GOYANNA A, MOTA ACA, OLIVEIRA SA, BRAGA EL, CARVALHO W, GENSER B, SANTOS RR, LYRA LGC. Feasibility and safety of autologous bone marrow mononuclear cell transplantation in patients with advanced chronic liver disease. **World J Gastroenterol**.v.13(7); p.1067-1073, 2007

MARTINS, F.C.; PIMENTEL, A.C. resposta endometrial de éguas submetidas à infusão uterina com querosene e iodo povidine. **ARS Veterinária**, v.22, nº 1, p. 70 - 79, 2006.

MATSUMOTO, F.; TRUDEL, G. UHTHOFF, H. High collagen type I and low collagen type III levels in knee joint contracture. **Acta Orthop. Scand**. V. 73, n.3, p.335-343, 2002.

McSWEENEY, P. A. Characterization of Monoclonal Antibodies That Recognize Canine CD34. **Blood**, v.91, p. 1977-1986, 1998.

NAKAGE, A. P. M. Influência do tipo de parto na hematologia do cordão umbilical de cães. **Ciência rural**, v.35, p.377-380, 2005.

NATHAN, S.; DAS DE S.; THAMBYAH A.; FEN C.; GOH J.; LEE E. H. Cell-based therapy in the repair of osteochondral defects: a novel use for adipose tissue. **Tissue Eng**, vol. 9, 2003

NUNES, L. C. Avaliação Histopatológica, Histoquímica, Imunohistoquímica e Morfométrica das Endometrites Crônicas em Éguas. 2003. 107f. Dissertação (Mestrado)-Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu

NUNES, L. C. **Expressão de metaloproteinases, TIMP-1 e da esclerose vascular nas endometrites crônicas das éguas.** Botucatu, 2008, 84p, Tese (Doutorado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho

CARDOSO, G. B. C.; ARRUDA, A.C.F. The use of stem cells in tissue engineering. **Ciências & Cognição**, v. 14 (3), p. 214-219, 2009.

OLIVARES, E.L.; RIBEIRO, V.P.; CASTRO, J.P.S.W.; RIBEIRO, K.C.; MATTOS, E. C.; GOLDENBERG, C.S.; MILL, J.G.; DOHMANN, H.F.; SANTOS, R.R.; CARVALHO, A. C. C.; MASUDA, M.O. Bone marrow stromal cells improve cardiac performance in healed infarcted rat hearts. **Am. J. Physiol Heart Circ Physiol**, v. 287, 2004.

OLIVEIRA, P.G.G. **Implante autólogo de células mononucleares provenientes de medula óssea no tratamento de tendinites induzidas experimentalmente em equinos: avaliação a longo prazo – 120 dias.** Botucatu, 2011, 164p., Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho.

ORLIC D., KAJSTURA J., CHIMENTI S. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. **Nature**, v. 410, p.701, 2001.

OSHIMA, Y; WATANABE, N; MATSUDA, K; TAKAI, S; KAWATA, M; KUBO, T. Behavior of transplanted bone marrow-derived GFP mesenchymal cells in osteochondral defect as a simulation of autologous transplantations. **J of Histochemistry & Cytochemistry**, v.53, p.. 207-216, 2005.

PERIN E.C., DOHMANN H.F., BOROJEVIC R., SILVA S.A., SOUSA A.L., MESQUITA C.T., ROSSI M.I., CARVALHO A.C., DUTRA H.S., DOHMANN H.J., SILVA G.V., BELEM L., VIVAQUA R., RANGEL F.O., ESPORCATTE R., GENG Y.J., VAUGHN W.K., ASSAD J.A., MESQUITA E.T., WILLERSON J.T. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. **Circulation**, vol.107; p. 2294, 2003

PHINNEY, D. G.; PROCKOP, D.J. Concise Review: Mesenchymal Stem/Multipotent Stromal Cells: The State of Transdifferentiation and Modes of Tissue Repair—Current Views. **Stem Cell**, v.23, Issue 11; p. 2896-2902, 2007.

PITTENGER M.F., MACKAY A.M., BECK S.C., JAISWAL R.K., DOUGLAS R., MOSCA J.D., MOORMAN M.A., SIMONETTI D.W., CRAIG S., MARSHAK D.R. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells . **Science 2:** v. 284. no. 5411, p. 143 – 147. 1999.

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

PORTO , C. D. **Expressão de TGF- B1, metaloproteinasese avaliação dos índices de proliferação celular e apoptótico nas endometrites crônicas das éguas.** Botucatu, 2009, 174p, Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho.

PORTO, C. D.; NUNES, L.C.; SEQUEIRA, J.L.; OLIVEIRA, D.E.; ALVARENGA, M.A. Expressão de MMP-2 e MMP-9 no processo fibrótico endometrial das éguas. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** , v.57, Supl. 1, p.105-106, 2004.

REYES M., LUND T., LENVIK T., AGUIAR D., KOODIE L., VERFAILLIE C.M. Purification and ex-vivo expansion of post-natal human marrow mesodermal progenitor cells. **Blood**, v.12; p. 2615-2625. 2001

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

RICHARDSON, L. The use of mesenchymal stem cells in the treatment of equine tendon injuries. Department of Veterinary Clinical Sciences, The Royal Veterinary College, 2005. (apostila)

RICKETTS, S.W. Uterine abnormalities. In: ROBINSON, N.E. **Current therapy in the equine medicine**. 2.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, p. 503-508, 1987

RICKETTS, S.W. Endometrial curettage in the mare. **Equine Vet. J.** suppl 17, p. 324-328, 1985

SMITH, R. K.W. Uso da Terapia com Células Tronco e PRP na tendinite experimental e resultados clínicos obtidos em casos de tendonopatia em equinos. In: **XII CONFERÊNCIA ANUAL DA ABRAVEQ**, 35, 2011, Campinas Anais, 2011. P. 17-20.

SNIDER, T.A.; SEPOY, C.; HOLYOAK, G.R. Equine endometrial biopsy reviewed: Observation, interpretation, and application of histopathologic data. **Theriogenology**; v.75, p.1567-1581, 2011

SOARES, MBP.; LIMA, R.S.; ROCHA, L.L. Transplanted bone marrow cells repair heart tissue and reduce myocarditis in chronic chagasic mice. **Am. J. Pathol.**, v.164, p. 44-447, 2004.

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

THRELFALL, W.R.; IMMEGART, H.M. Doença uterina e tratamento. In: REED, S.M.; BAYLY, W.M. **Medicina interna equina**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2000. p. 666-670.

TROEDSSON, M.H.T. Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. **Theriogenology**, v.52. p.461-471,1999.

TROEDSSON, M.H.T. therapeutic considerations for mating-induced endometritis. **Pferdeheilkunde**. v.13, n.15, p. 516-520, 1997.

TROPEL P., NOEL D., PLATET N., LEGRAND P., BENABID A.L., BERGER F. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. **Experimental Cell Research** v.295; p. 395–406. 2004.

VIDAL, M. A.; KILROY, G. E.; LOPEZ, M. J.; JOHNSON, J. R.; MOORE, R. M.; GIMBLE, J. M. Characterization of Equine Adipose Tissue-Derived Stromal Cells: Adipogenic and Osteogenic Capacity and Comparison with Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells. **Veterinary Surgery**, v. 36, p. 613-622, 2007.

VILAS-BOAS, F. FEITOSA, G.; SOARES M. Transplante autólogo de células de medula óssea por via coronária é seguro e potencialmente eficaz em pacientes com forma avançada de insuficiência por doença de Chagas. **Rev. Chil. Cardiol.** v. 23 (abstract), 2004.

WALLCHILI, R.O. Endometrial biopsy in mares under nonuniform breeding management conditions: Prognostic value and relationship with age. **Can Vet. J.**;v.31; p. 379-384, 1990.

WEISS, D.J.; KOLLS, J.K.; ORTIZ, L.A.; PANOSKALTSIS-MORTARI, A.; PROCKOP, D.J. Stem cells and therapies in lung biology and lung diseases. *Proc. Am. Thorac. Soc.*, v. 5, p. 637-667, 2008.

YAMADA, A.L.M.; OLIVEIRA, P.G.G.; CARVALHO, A.M.; WATANABE, M.J.; HUSSNI, C.A.; ALVES, A.L.G.. Bone marrow mononuclear cells in the treatment of complete tear of flexor tendons and suspensory ligament in the horse. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v.63 n.6, 2011

YAMADAA, M. KUBO, H. KOBAYASHI,S., ISHIZAWA, K., NUMASAKI, M. UEDA, S., SUZUKI, T., SASAKI, H. Bone Marrow-derived progenitor cells are important for lung repair after lipopolysaccharide-induced lung injury. **J. Immunol.** v. 172, p. 1266-1272, 2004.

ZAGO, M. A.; COVAS, D. T.; Células-tronco. A nova fronteira da medicina. **Atheneu**, 2006.

ZHU, Y.; LIU, T.; SONG, K.; FAN, X.; MA, X.; CUI, Z. Adipose derived stem cell: a better stem cell than BMSC. *Cell Biochem Func*, v. 26, p. 664-675, 2008.

ZUK P.; ZHU, M.; ASHJIAN P.; DE UGARTE D.A.; HUANG J.I.; MIZUNO H. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Moll Biol Cell.** v. 13, 2002.

ZUK, P.; ZHU, M.; MIZUNO, H.; HUANG, J.; FUTRELL, J.; KATZ, A.; BENHAIM, P.; LORENZ, H.; HEDRICK, M. Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies. **Tissue Engineering**, v. 7, n. 2, 2001.

1
2 **Caracterização e viabilidade das células tronco mesenquimais obtidas da medula**
3 **óssea e do tecido adiposo de éguas**

4
5
6 **Characterization and viability of mesenchymal stem cells obtained from bone**
7 **marrow and adipose tissue of mares**

8
9
10 **Caracterización y viabilidad de las células madre mesenquimatosas obtenidas de la**
11 **médula ósea y el tejido adiposo de yeguas**

1
2 PAVÃO, G.D.; CARMO, M.T.; MAIA, L.; LIMA-NETO, J.; LANDIN, F.;
3 ALVARENGA, M.A. **Caracterização e viabilidade das células tronco mesenquimais**
4 **obtidas da medula óssea e do tecido adiposo de éguas.** – Faculdade de Medicina
5 Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

6 7 **RESUMO**

8 O trabalho teve por objetivos Isolar e caracterizar, através de marcadores de
9 superfície, células-tronco mesenquimais obtidas da medula óssea e do tecido adiposo de
10 equinos e avaliar o potencial de crescimento “in vitro” caracterizando a morfologia
11 desta linhagem celular. Foram utilizadas 10 éguas, de raça indefinida com idade entre 4
12 e 23 anos, em boas condições corporais. Para punção aspirativa da medula óssea (MO)
13 utilizou-se agulha de punção de medula óssea na 5 esternnebra da égua. A obtenção do
14 tecido adiposo (TA) foi realizada através de incisão na base da cauda, retirando a
15 gordura presente entre o tecido e a musculatura. Ambas as amostras foram identificadas
16 e encaminhadas ao Laboratório e cultivadas em meio DMEM alta glicose em estufa
17 com 37,5°C, em atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% de CO₂. Verificou-se após
18 o início do cultivo, que ambas as amostras apresentaram morfologia alongadas e
19 estimaram para MO e TA um tempo de aderência pós cultivo de 4-6 dias e 6-8 dias
20 respectivamente. As CTMs obtidas da MO atingiram confluência com 20-22 dias,
21 enquanto que as do TA, com 24-26 dias. A viabilidade celular analisada pós-
22 confluência foi realizada através da coloração de Azul de Tripán, apresentando para as
23 células obtidas da MO, viabilidade de 95% e concentração de $2,5 \times 10^7$ células e 88%
24 com concentração de $1,5 \times 10^7$ células obtidas do TA. A imunofenotipagem foi realizada
25 pela reação cruzada de anticorpos caninos com os antígenos de superfície eqüinos
26 (CD44, CD34) no citômetro de fluxo Laboratório de Citometria. Verificou-se marcação
27 negativa para CD 34 nas amostras de MO e de TA, de 25% e 12% e marcação positiva
28 para CD 44 com 77% e 88% para ambas as amostras respectivamente. As células tronco
29 mesenquimais oriundas da medula óssea e do tecido adiposo, se mostraram similares em
30 relação à capacidade de desenvolvimento quando cultivado “in vitro”, podendo ambas
31 serem utilizadas para terapia celular.

32
33
34
35
36
37
38
39
40 .
41 **Palavras-chave:** Célula Tronco Mesenquimal, Imunofenotipagem, Viabilidade Celular
42
43
44
45
46
47
48
49
50

1 PAVÃO, G.D.; CARMO, M.T.; MAIA, L.; LIMA-NETO, J.; LANDIN, F.;
2 ALVARENGA, M.A. **Characterization and viability of mesenchymal stem cells**
3 **obtained from bone marrow and adipose tissue of mares.** Botucatu, 2013. School of
4 Veterinary Medicine, Campus of Botucatu, São Paulo -State-University.
5

6 **ABSTRACT**

7 The study aimed to isolate and characterize, by surface markers, mesenchymal stem
8 cells obtained from bone marrow and adipose tissue of horses and evaluate the growth
9 potential "in vitro" characterizing the morphology of this cell line. A total of 10 mares
10 are used, aging between 4 to 23 years old, in good body condition. For aspiration of
11 bone marrow (BM) apuncture needle in the middle of stern of mare. The adipose tissue
12 was obtaining through a incision that was made at the base of the tail, removing the fat
13 present between the tissue and musculature. Both samples were identified and sent to
14 the Laboratory and cultured in DMEM high glucose in oven with 37.5 ° C in humidified
15 atmosphere containing 95% air and 5% CO₂. Both samples showed elongated
16 morphology for MO and TA and the time of adhesion was observed with 4-6 and 6-8
17 days of cultivation, respectively. The MSCs obtained from the MO reached confluence
18 at 20-22 days, while those of the TA, with 24-26 days. Cell viability assessed after
19 confluence was performed by staining with trypan blue, for presenting cells obtained for
20 MO, a viability of 95% and a concentration of 2.5×10^7 cells and 88% of viability with a
21 concentration of 1.5×10^7 cells obtained from TA. Immunophenotyping was performed
22 by antibodies cross-reactivity with canine equine surface antigens (CD44, CD34) using
23 flow cytometry, 25% and 12% of samples were negative for CD34 marking and 77%
24 and 88% samples stained positive for CD44, for MO and TA respectively. In
25 conclusion, the stem cell obtained of bone marrow and adipose tissue were similar for
26 the development capacity and in vitro culture adherence.
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36

37 **Keywords:** Mesenchymal Stem Cell, Immunophenotyping, Cell Viability
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50

1
2
3 PAVÃO, G.D.; CARMO, M.T.; MAIA, L.; LIMA-NETO, J.; LANDIN, F.;
4 ALVARENGA, M.A. **Caracterización y viabilidad de las células madre**
5 **mesenquimatosas obtenidas de la médula ósea y el tejido adiposo de yeguas.**
6 Botucatu, 2013.- Facultad de Medicina Veterinaria, Campus de Botucatu, São Paulo
7 State University

8 9 **RESUMEN**

10 El objetivo del estudio fue aislar y caracterizar, por marcadores de superficie, células
11 madre mesenquimáticas obtenidas de la médula ósea y el tejido adiposo de los caballos
12 y evaluar el potencial de crecimiento "in vitro" la caracterización de la morfología de
13 esta línea celular. Utilizamos 10 yeguas, de mestizo con edades entre 4 y 23 años de
14 edad, en buena condición corporal. Para la aspiración de médula ósea (BM) se utiliza
15 aguja de punción de médula ósea en los caballos. La obtención de tejido adiposo (AT)
16 incisión se hizo a través de la base de la cola, la eliminación de la grasa presente entre el
17 tejido y la musculatura. Ambas muestras fueron identificadas y enviadas al Laboratorio
18 de Reproducción y Terapia Celular Avanzada (SPEAR), Departamento de
19 Reproducción Animal (UNESP, Botucatu, SP) y se cultivaron en DMEM alto en
20 glucosa horno con 37,5 ° C en ambiente humidificado contiene 95% de aire y 5% de
21 CO₂. Se encontró después del inicio del cultivo, las dos muestras mostraron morfología
22 alargada para MO y MT calcula el tiempo de adherencia después de 4-6 a 6-8 días de
23 cultivo, respectivamente. El MSC obtenido a partir de la MO alcanzaron la confluencia
24 en 20- 22 días, mientras que los de la TA, con 24-26 días. Evaluó la viabilidad celular
25 después de la confluencia se realizó por tinción con azul de tripano, para células
26 presentadoras obtenidos de OM, viabilidad de 95% y una concentración de $2,5 \times 10^7$
27 células y el 88% con una concentración de $1,5 \times 10^7$ células obtenidas de TA.
28 Inmunofenotipo fue realizada por la reactividad cruzada de los anticuerpos con los
29 antígenos de superficie canina equina (CD44, CD34) en el Laboratorio de Citometría de
30 flujo Citometría de Flujo del Centro de Sangre de la Facultad de Medicina de Botucatu,
31 UNESP. Se encontró negativo para CD 34 marcando las muestras de MO y MT, 25% y
32 12% y se tiñeron positivas para CD 44 77% y 88% respectivamente para las dos
33 muestras.

34
35 Palabras clave: células madre mesenquimales, inmunofenotipo, la viabilidad celular
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50

1. Introdução

As células-tronco possuem a capacidade de se auto-regenerar e se diferenciar em diversos tipos celulares. Estas células têm um papel importante no desenvolvimento dos seres vivos e um enorme potencial de utilização em medicina regenerativa. As células-tronco classificam-se em embrionárias, obtidas da massa celular interna de embriões no início de seu desenvolvimento e, somáticas, ou adultas, encontradas em tecidos já diferenciados de fetos, recém nascidos ou adultos (FRIEL et al., 2005). As células-tronco somáticas podem ser obtidas da medula óssea, do sangue periférico, do cordão umbilical e do fígado (HERZOG et al., 2003).

Células-tronco obtidas de medula óssea têm sido usadas na prática médica como fonte de células hematopoiéticas e os transplantes de medula fazem parte do tratamento de doenças hematológicas há várias décadas. As células-tronco hematopoiéticas promovem a reconstituição hematopoiética e de outros tecidos, estando presentes no embrião, sangue periférico, medula óssea e sangue do cordão umbilical (HERZOG et al., 2003).

Recentemente observou-se que na medula óssea há outro tipo de células-tronco denominada célula tronco mesenquimal (CTM) que têm alta capacidade de se renovar e diferenciar em várias linhagens de tecido conjuntivo. Em determinadas condições, as CTM podem dar origem a células de diversos tecidos incluindo cartilagem, osso, músculo e gordura (REYES, et al., 2001). Além da medula óssea, CTMs podem ser isoladas também do tecido adiposo, de vários tecidos fetais e numerosos outros tecidos de adultos. A propriedade básica que permite o isolamento e a cultura de células-tronco mesenquimais é sua facilidade de aderir a superfícies como vidro e plástico (CONRAD & HUSS, 2005).

O uso de marcadores de superfície tem sido utilizado como método de identificação da imunofenotipagem um método aceito para a diferenciação de linhagens de células-tronco somáticas (FORTIER, 2005). CTM carregam proteínas de superfície que podem ser reconhecidas por anticorpos específicos e, portanto podem ser utilizados na caracterização dessas células. CTM de humanos e ratos expressam CD105, CD73, CD44, mas não expressam CD45 e CD31. Em adição a isso, é consenso que as CTM cultivadas e expandidas são negativas para CD34 (COPLAND et al, 2007).

1 Infelizmente, a maioria desses marcadores ainda não foi validada como marcadores de
2 superfície para equinos e há evidências que alguns anticorpos não possuem reação
3 cruzada com o cavalo (TAYLOR et al, 2007).

4 Em função do exposto o presente trabalho teve por objetivo isolar e caracterizar,
5 através de marcadores de superfície, células-tronco mesenquimais da medula óssea e do
6 tecido adiposo de equinos e avaliar o potencial de crescimento “in vitro” de células
7 tronco mesenquimais obtidas da medula óssea e do tecido adiposo.

10 **2. Material e Métodos**

12 O experimento com os animais foi realizado no Posto de Monta da Fazenda
13 Lajeado – UNESP – localizado no município de Botucatu (LAT.22⁰ S e LONG. 48⁰ W),
14 estado de São Paulo, sendo que o cultivo das células tronco mesenquimais foi realizado
15 no laboratório de Reprodução Avançada e Terapia Celular (LANÇA) do Departamento
16 de Reprodução Animal da FMVZ – UNESP- Botucatu, SP.

18 **2.1. Coleta e Cultivo das Células Tronco da Medula Óssea**

19 **a) Punção aspirativa da Medula Óssea**

20 Foram aspiradas a medula óssea na região referente ao osso esterno de cada
21 animal. Localizada a 5^a (Quinta) esternebra, de 10 éguas de raça indefinida com idade
22 entre 4 e 23 anos, em boas condições corporais, recebendo 4Kg/dia de ração divididos
23 em dois tratos; 10Kg/dia feno cost-cross (*Cynodon dactylon*); suplementação mineral
24 (70g/dia) e livre acesso a pasto e bebedouro.

25 Previamente a aspiração da medula óssea, os animais foram mantidos em
26 estação, contidos em tronco e sedados com 0,5mg/kg de Xilazina. Após foram
27 tricotomizados em uma área de 5 x 20 cm na região referente ao osso esterno de cada
28 animal. Localizada a 5^a (Quinta) esternebra, realizou-se o bloqueio anestésico local com
29 10 ml de cloridrato de lidocaina¹, seguido de anti-sepsia local. A punção aspirativa da
30 medula óssea (MO) foi realizada conforme a metodologia modificada de Barreira et al
31 (2008). Para isso, utilizamos uma agulha de punção de medula óssea em equinos,
32 modelo *Jamshidid*, de calibre oito e 12 cm de comprimento. Uma vez bem fixa a agulha
33 dentro do esterno), removemos o mandril e realizamos a aspiração do sangue da medula
34 óssea com auxílio de uma seringa de 20mL (Figura 1) contendo DPBS (5ml) e heparina

1 (1ml) a 5000 UI/mL. Foram coletadas 2 (duas) seringas e destinadas para o cultivo
2 celular.

3 As amostras foram identificadas e encaminhadas ao Laboratório de Reprodução
4 Avançada e Terapia Celular (LANÇA) do Departamento de Reprodução Animal
5 (UNESP, Botucatu, SP) para a separação da fração mononuclear, realização do cultivo
6 celular e identificação da viabilidade celular através da coloração de *tripan blue*
7 contadas em câmara de Newbauer.

8
9



10

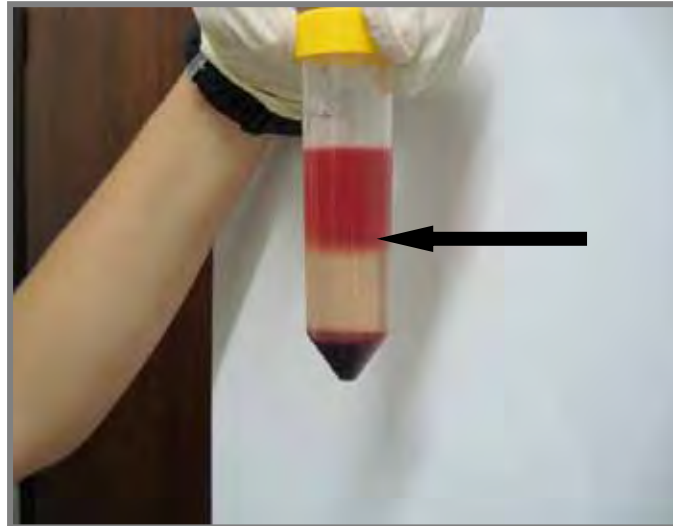
11 **Figura 1:** Agulha de punção *Jamshid* (A) e coleta da Medula Óssea (MO) do
12 esterno da égua (B)

13

14 **b) Isolamento e cultivo das células tronco mesenquimal da medula óssea**

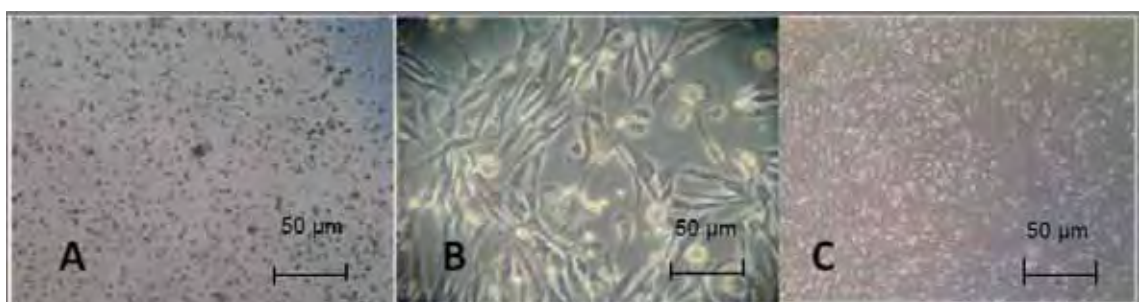
15 Após a coleta da medula óssea e o encaminhamento até o laboratório, o sangue
16 foi filtrado em um equipo de transfusão¹ sanguínea humano para retirada dos coágulos
17 posteriormente centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos para retirada do soro e gordura.

18 O material obtido foi ressuspenso na proporção 1/1 em DMEM alta glicose²
19 com L-glutamina sem soro (Gibco), e transferido para um outro tubo de 15 mL
20 contendo 4 mL de gradiente de densidade Ficoll-Paque® premium 1073³ (densidade
21 1.077 g/mL-Amersham Biosciences) (diluição Ficoll: meio de 1:1), centrifugado a 1500
22 rpm durante 40 minutos à temperatura ambiente. Após a centrifugação, formou-se um
23 “halo” transparente no meio do tubo como demonstrado na figura 5 correspondente a
24 células tronco mononucleares (Figura 2).



1
2 **Figura 2:** Presença de “halo” transparente constituído de células mononucleares

3
4 Este “halo” foi coletado na interface Ficoll-células e ressuspenso em meio
5 DMEM sem soro. O material foi novamente centrifugado a 1.500 rpm durante 10
6 minutos, repetindo este procedimento por 2 vezes para total retirada do Ficoll. Após a
7 lavagem, o pellet foi ressuspenso em 1 mL de DMEM com 20% de soro fetal bovino,
8 e as células foram contadas em câmara de Neubauer. As células foram então
9 plaqueadas em frascos de 25 cm², com 5 mL de meio DMEM alta glicose com L-
10 glutamina e 10% SFB e 10% soro Knockout contendo penicilina, estreptomicina (1%) e
11 anfotericina B (1,2%)¹ a 37,5°C, em atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% de
12 CO₂. O meio de cultivo foi trocado a cada 4 a 5 dias. O repique que é a retirada das
13 células aderidas no fundo da placa de cultivo foi realizado quando se atingiu uma
14 confluência de aproximadamente 80% (figura 3).



15
16
17
18 **Figura 3:** Aspecto das células mesenquimais eqüinas em cultivo *in vitro* (A)
19 Início da aderência das células demonstrando aspecto arredondado. (B) Células aderidas

1 com morfologia alongada semelhante a fibroblastos. (C) Confluência de 80% de
2 linhagem celular indiferenciada.

3

4 **2.2 - Coleta e Cultivo das Células Tronco do Tecido Adiposo**

5 **a) Obtenção do tecido adiposo**

6 A coleta do tecido adiposo foi realizada em 10 éguas de raça indefinida com
7 idade entre 4 e 23 anos, que apresentavam boa condição corporal, recebendo ração e
8 tendo livre acesso a pasto e bebedouro.

9 A base da cauda equina foi escolhida como local de coleta de tecido adiposo
10 devido à maior disponibilidade de material, ausência de grandes vasos e fácil acesso.
11 Para realização do procedimento foi necessário o preparo cirúrgico na base da cauda,
12 realizando tricotomia e posterior anti-sepsia. Em seguida a égua foi tranquilizada
13 sistemicamente com Xilazina e posteriormente foi realizada a infiltração local com
14 cloridrato de lidocaína, seguida de anti-sepsia local.

15 Foi realizada uma incisão de aproximadamente 10 cm de comprimento ao lado
16 da base da cauda, permitindo a visualização de uma camada de tecido adiposo entre a
17 pele e a musculatura, sendo então realizada a coleta de aproximadamente cinco gramas
18 de tecido “gorduroso”. Este foi armazenado em tubo cônico de 50 mL, estéril, contendo
19 meio DMEN-HEPES suplementado com estreptomicina e anfotericina B de modo que
20 fique completamente submerso para evitar ressecamento do material. Após, foi levado
21 diretamente para o processamento no laboratório e foi realizadas a sutura do tecido
22 subcutâneo com fio absorvível e a pele com um fio inabsorvível sintético, em ambos
23 locais foi utilizado padrão de sutura simples contínuo.

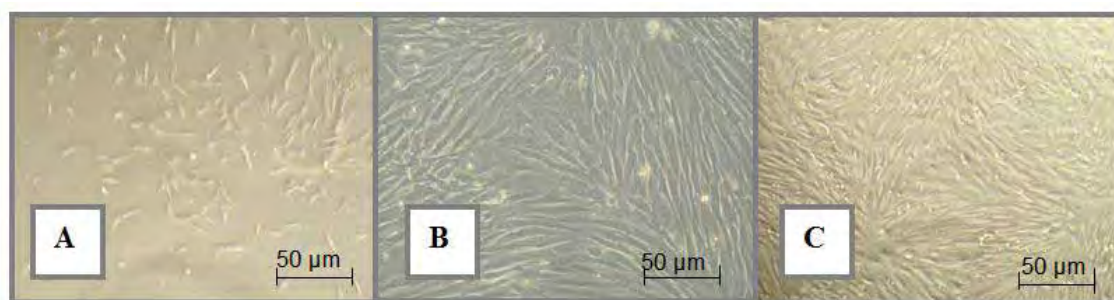
24 **b) Isolamento e cultivo das células tronco mesenquimal do tecido adiposo**

25 A extração da fração contendo as CTM foi baseada nas técnicas previamente
26 descritas para a extração da fração vascular estromal em humanos (AUST et al. 2004) e
27 para a extração da fração vascular estromal em equinos (VIDAL et al. 2007).

28 Após a obtenção das amostras do tecido adiposo, estas foram submetidas a
29 sucessivas lavagens com meio DMEN-HEPES e posteriormente a uma separação
30 mecânica por meio de uma lâmina de bisturi e à ação digestora da colagenase tipo I,
31 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA). A solução foi homogeneizada e levada à estufa a
32 37° C em atmosfera com 5,0% de CO₂ em ar. Após 24 horas de cultivo foi feita a
33 filtragem do material por um filtro de Nylon (BD Falcon Cell Strainer, 70 µm) e a
34 solução filtrada foi adicionada a um mesmo volume de meio DMEM sem soro. Este

1 material foi centrifugado a 1900 rpm repetindo este passo por 2 vezes. Após a lavagem,
2 o pellet foi ressuspendido em 1 mL de DMEM com 20% de soro fetal bovino, e as
3 células contadas. As células foram plaqueadas em frascos de 25 cm², com 5 mL de meio
4 DMEM alta glicose com L-glutamina e 10% SFB e 10% soro Knockout contendo
5 penicilina, estreptomicina e anfotericina B. O meio de cultura foi trocado a cada 4 a 5
6 dias. O repique das células foi realizado quando atingiu uma confluência de
7 aproximadamente 80% (Figura 4).

8



9

10

11 **Figura 4:** Célula Tronco Mesenquimal (CTMs) do tecido adiposo de equino
12 cultivadas *in vitro*, (A) Células aderidas com morfologia arredondada e algumas com
13 aspecto fibroblastóide; (B) Crescimento *in vitro* das CTMs com morfologia alongada e
14 aspecto semelhante a fibroblastos. (C) Confluência de 80% das CTMs formando uma
15 linhagem celular.

16

17

18 **2.3 Viabilidade das células tronco mesenquimais CTMs para medula óssea** 19 **(MO) e tecido adiposo (TA)**

20 Após a obtenção da confluência pós cultivo celular, adicionou 2 mL de tripsina
21 pré aquecida as 37 graus celsius na garrafa de cultivo. Esta foi homogeneizada junto as
22 células e então o conteúdo desprezado. Novamente adicionou 2 mL de Tripsina dentro
23 da garrafa de cultivo que foi encaminhada para estufa com CO₂ e O₂ controlado em uma
24 temperatura de 37 graus Celsius por 5 minutos.

25 Posteriormente o conteúdo foi desprezado em um tubo *Falcon* de 15 mL e foi
26 adicionado 1 mL de soro fetal bovino (SFB) e encaminhado para centrifugação por
27 1500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi
28 homogeneizado com um novo meio de cultivo celular.

1 A preparação do corante Azul de Tripán foi realizada diluindo 1:1 de meio com
2 o corante. A leitura da viabilização das células foi feita na Câmara de Neubauer que
3 foram contados os dois lados da câmara. As estruturas coradas de azul eram células
4 lesionadas e as que não coravam eram células intactas.

6 **2.4 Caracterização das células tronco mesenquimais (CTMs) para medula** 7 **óssea (MO) e tecido adiposo (TA)**

8 Em ambos os grupos, logo após a separação, foram removidos 100 µL do meio e
9 colocadas em um tubo de hemólise para contagem celular, onde o número de células
10 foi quantificado por meio do hematocitômetro para avaliar a viabilidade celular por
11 exclusão através da coloração do azul de trypan.

12 A caracterização das CTMs foi realizada logo após a separação, no momento da
13 primeira passagem e após a terceira passagem, tanto nas amostras obtidas da medula
14 óssea, como do tecido adiposo. Para tanto, foi realizada a caracterização celular pela
15 reação cruzada de anticorpos caninos com os antígenos de superfície eqüinos (CD 44,
16 CD 34) por citometria de fluxo. As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo
17 FACS Calibur BD[®], no Laboratório de Citometria de Fluxo do Hemocentro da
18 Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

21 **3. Análise Estatística**

22 A moda representa o valor de classificação que foi apresentado com maior
23 frequência, demonstrando a característica mais comum de cada grupo.

24 Para comparar os valores de média e erro padrão da média dos tempos de cultivo
25 foi utilizado ANOVA.

27 **4. Resultados**

28 Os resultados obtidos em relação às médias \pm erro padrão da média de variação
29 do tempo de aderência, tempo de confluência e número de (Tabela01). As células
30 obtidas da medula óssea (MO) apresentaram um tempo de aderência das CTMs na placa
31 de cultivo *in vitro* entre 4-6 dias e as do tecido adiposo (TA) entre 6-8 dias. As CTMs
32 obtidas da MO, obtiveram confluência na placa de cultivo *in vitro* entre 20-22 dias
33 constatando 95% de viabilidade celular avaliadas pela coloração de Azul de Tripán. Já
34 as células obtidas do TA obtiveram maior tempo de confluência entre 24-26 dias e

1 menor porcentagem de viabilidade celular (88%) quando comparada com as da MO
2 (Tabela 01).

3 Na avaliação da Imunofenotipagem, verificou-se alta marcação para o anticorpo
4 monoclonal CD44 em ambos os grupos, sendo 75% para MO e 88% para o TA e baixa
5 marcação para o anticorpo monoclonal CD34 com 25% e 12% respectivamente (Tabela
6 01).

7

8 **Tabela 01:** Caracterização das células tronco mesenquimais obtidas da medula
9 óssea e do tecido adiposo
10

GRUPOS	MEDULA ÓSSEA (MO)	TECIDO ADIPOSEO (TA)
Número de CTMs após atingir 70% de subconfluência	2,5 x 10⁷	1,5 x10⁷
Viabilidade de CTMs após atingir 70% de subconfluência (%)	95	88
Marcação de CD34 (%)	25	12
Marcação de CD44 (%)	75	88

11

12

13 **5. Discussão**

14 As CTMs utilizadas como tratamento no presente estudo, ao sofrerem o processo
15 inicial de isolamento durante o cultivo celular, apresentaram-se com morfologia
16 fibroblastóides (alongadas), características de células de origem mesenquimal,
17 característica também encontrada por outros autores (OSHIMA et al. 2005) em CTMs
18 provenientes de medula óssea dos fêmures e tíbias de ratos.

1 O protocolo adotado neste estudo para isolamento das células tronco
2 mesenquimais obtidas tanto da medula óssea quanto do tecido adiposo foi eficaz,
3 resultando na recuperação de células com morfologia de aspecto fibroblastóides, alta
4 marcação na imunofenotipagem através da utilização de anticorpos monoclonais para o
5 CD 44 (células mesenquimais) e baixa para o CD 34 (hematopoiéticas) corroborando
6 com outros autores (KERN et al., 2004; ZHU et al., 2008). O método da avaliação das
7 CTMs através da citometria de fluxo é um recurso utilizado para análise de forma
8 rápida, objetiva e quantitativa as células em suspensão (FALDY et al., 2001). A
9 marcação das CTMs para CD34 e CD44 pela citometria de fluxo nos animais
10 domésticos é possível devido a produção de anticorpos monoclonais específicos
11 (MCSWEENEY et al., 1998; HARTNTT et al., 2002). Entretanto, devido à baixa
12 disponibilidade de anticorpos específicos para a espécie equina, no presente projeto
13 foram utilizados anticorpos caninos, com os quais foi constatada previamente a reação
14 cruzada. Desta forma, as CTMs tanto do nosso estudo como dos demais autores
15 (PHINNEY & PROCKOP 2007; ZHU et al., 2008), foram caracterizadas pelo poder
16 adesivo na placa de cultivo, bem como pela marcação negativa para o CD 34, e pela
17 marcação positiva para CD44.

18 6. Conclusões

▪

19 As células tronco mesenquimais oriundas da medula óssea e do tecido adiposo,
20 se mostraram similares em relação à capacidade de desenvolvimento quando cultivado
21 “in vitro”, podendo ambas serem utilizadas para terapia celular.

22

23 7. Referências

24 PHINNEY, D. G.; PROCKOP, D.J. Concise Review: Mesenchymal Stem/Multipotent
25 Stromal Cells: The State of Transdifferentiation and Modes of Tissue Repair—Current
26 Views. **Stem Cell**, v.23, Issue 11; p. 2896-2902, 2007.

27 ZHU, Y.; LIU, T.; SONG, K.; FAN, X.; MA, X.; CUI, Z. Adipose derived stem cell: a
28 better stem cell than BMSC. *Cell Biochem Func*, v. 26, p. 664-675, 2008.

29 McSWEENEY, P. A. Characterization of Monoclonal Antibodies That Recognize
30 Canine CD34. **Blood**, v.91, p. 1977-1986, 1998.

31

- 1 KERN S.; EICHLER H.; STOEVE J.; KLUTER H.; BIEBACK K. Comparative
2 analysis of mesenchymal stem cell from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose
3 tissue. *Stem Cell*, v.24, p. 1294-1301, 2004
4
- 5 FALDY NA, M. Lymphocyte subsets in peripheral blood of dogs – a flow
6 cytometric study. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.82, n.1-2, p.23-
7 37, 2001.
8
- 9 OSHIMA, Y; WATANABE, N; MATSUDA, K; TAKAI, S; KAWATA, M; KUBO, T.
10 Behavior of transplanted bone marrow-derived GFP mesenchymal cells in
11 osteochondral defect as a simulation of autologous transplantations. *J of Histochemistry*
12 *& Cytochemistry*, v.53, p.. 207-216, 2005.
- 13 AUST, L.; DEVLIN, B.; FOSTER, S. J. Yield of human adipose derived adult stem
14 cells from liposuction aspirates. *Cytotherapy*, vol. 6, p 7–14, 2004.
- 15 VIDAL, M. A.; KILROY, G. E.; LOPEZ, M. J.; JOHNSON, J. R.; MOORE, R. M.;
16 GIMBLE, J. M. Characterization of Equine Adipose Tissue-Derived Stromal Cells:
17 Adipogenic and Osteogenic Capacity and Comparison with Bone Marrow-Derived
18 Mesenchymal Stromal Cells. *Veterinary Surgery*, v. 36, p. 613-622, 2007.
19
- 20 TAYLOR, S.E.; SMITH, R.K.W.; CLEGG, P.D. Mesenchymal stem cell therapy in
21 equine musculoskeletal disease: scientific fact or clinical fiction?. *Equine vet. J.*, v. 39
22 (2), p. 172-180, 2007.
- 23 FORTIER, L. Stem Cells: Classifications, controversies, and Clinical Applications.
24 *Veterinary Surgery*, v.24, p. 415-423, 2005.
- 25 COPLAND, I.; SHARMA, K.; LEJEUNE, L.; ELIOPOULOS, N.; STEWART, D.;
26 LIU, P.; LACHAPPELLE, K.; GALIPEAU, J. CD34 expression on murine marrow-
27 derived mesenchymal stromal cells: impact on neovascularization. *Experimental*
28 *Hematology*, v. 36, p. 93-103, 2007.
- 29 CONRAD C., HUSS R. Adult Stem cell lines in regenerative medicine and
30 reconstructive surgery. *Journal of Surgical Research*, v.124, 201-208, 2005.
- 31 HERZOG, E.L., et al. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood*, v.102, n.10,
32 p.3483-3493, 2003.
- 33 FRIEL E., SAR S., MEE J. P. Embryonic stem cells: understanding their history, cell
34 biology and signalling. *Advanced Drug Delivered Reviews*, v. 57, 1894-1903, 2005.
35
- 36
- 37
- 38
- 39
- 40

1

2

3

4

5

6

7

8

9

Já possui um login/senha de acesso à revista Veterinária e Zootecnia?

[ACESSO](#)

Não tem login/senha?

[ACESSE A PÁGINA DE CADASTRO](#)

O cadastro no sistema e posterior acesso, por meio de login e senha, são obrigatórios para a submissão de trabalhos, bem como para acompanhar o processo editorial em curso.

Diretrizes para Autores

- **Artigos Científicos**

Devem ser estruturados de acordo com os seguintes itens:

1. Página de rosto, com:

Título do trabalho em português, em inglês e em espanhol, fonte Times New Roman, tamanho 12, com espaçamento simples, em negrito e centralizado, em letra maiúscula. Quando necessário, indicar a entidade financiadora da pesquisa, como primeira chamada de rodapé; Em caso de envolvimento de seres humanos ou animais de experimentação, encaminhar o parecer da Comissão de Ética ou equivalente, assinalando, no trabalho, antes das referências, a data de aprovação.

2. Página com resumo, abstract e resumen

- Tanto o resumo, como o abstract e o resumen devem ser seguidos do título do trabalho, no respectivo idioma, e conter no máximo 400 palavras cada um, com informações referentes à introdução, metodologia, resultados e conclusões. O texto deve ser justificado e digitado em parágrafo único e espaço simples, começando por RESUMO. O abstract, e o resumen devem ser tradução fiel do resumo. Independente da língua em que o artigo for apresentado, deverá conter o resumo em português, inglês e espanhol.

Devem conter, no máximo, cinco palavras-chave, keywords, e palabras clave que identifiquem o conteúdo do texto.

3. A estrutura do artigo deverá conter:

Introdução: Deve ser clara, objetiva e relacionada ao problema investigado e à literatura pertinente, bem como aos objetivos da pesquisa. A introdução estabelece os objetivos do trabalho.

Material e Métodos: Deve oferecer informações de

reprodutibilidade da pesquisa, de forma clara e concisa, como variáveis, população, amostra, equipamentos e métodos utilizados, inclusive os estatísticos.

Resultados: Apresentação dos resultados obtidos, que devem ser descritos sem interpretações e comparações. Poderá ser sob a **forma de tabelas**, no máximo de cinco, ordenadas em algarismos arábicos e encabeçadas pelo título, de acordo com as normas de apresentação tabular da ABNT/WBR 6023/2000 da Associação Brasileira de Normas Técnicas, identificadas no texto como Tabela; sob a **forma de figuras**, nos casos de gráficos, fotografias, desenhos, mapas, etc., ordenadas em algarismos arábicos, até no máximo de seis, e citadas no texto como Figura.

Discussão: Deve ser entendida como a interpretação dos resultados, confrontando com a literatura pertinente, apresentada na introdução. Se julgar conveniente, os resultados e a discussão poderão ser apresentados conjuntamente.

Conclusões: É a síntese final, fundamentada nos resultados e na discussão.

Referências: Devem ser apresentadas de acordo com as normas Vancouver (<http://www.icmje.org/>).

Deverão ser editorados em Microsoft Word for Windows, para edição de textos, Excel (qualquer versão) para gráficos, formato JPEG ou GIF (imagem) para fotografias, desenhos e mapas, formato A4 (21,0 x 29,7 cm), em espaço simples, mantendo margens de 2,5 cm, nas laterais, no topo e pé de cada página, fonte Times New Roman, tamanho 12 e numeração consecutiva das páginas em algarismos arábicos, a partir da folha de identificação. Deverão também apresentar numeração nas linhas, reiniciando a contagem a cada nova página. Ilustrações e legendas devem ser apresentadas no decorrer do texto. Não serão fornecidas separatas. Os artigos estarão disponíveis no formato PDF no endereço eletrônico da revista. Para as demais seções da revista são válidas as normas anteriores. Não devem exceder a 15 páginas. Abreviaturas não usuais devem ser empregadas após escritas por extenso na primeira utilização.