

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

EFICÁCIA DO ULTRASSOM NA IDENTIFICAÇÃO DE
TRANSPLANTES DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS EM
TECIDO MUSCULAR EQUINO

DENIS JERONIMO SVICERO

Botucatu, SP
Novembro - 2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

EFICÁCIA DO ULTRASSOM NA IDENTIFICAÇÃO DE
TRANSPLANTES DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS EM
TECIDO MUSCULAR EQUINO

DENIS JERONIMO SVICERO

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

Orientador: Prof. Ass. Dr. Rogério Martins Amorim
Coorientadora: Profa. Ass. Dra. Vânia Maria de Vasconcelos Machado

Botucatu, SP
Novembro - 2014

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

Svicero, Denis Jeronimo.

Eficácia do ultrassom na identificação de transplantes
de células tronco mesenquimais em tecido muscular equino /
Denis Jeronimo Svicero. - Botucatu, 2014

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia

Orientador: Rogério Martins Amorim

Coorientador: Vânia Maria de Vasconcelos Machado

Capes: 50501003

1. Equino - Doenças. 2. Células-Tronco. 3. Ultrassom.
4. Transplante de Células-Tronco. 5. Músculos - Doenças.
6. Nanocristais. 7. Transtornos musculares.

Palavras-chave: Células tronco mesenquimais; Equinos;
Miopatias; Nanocristal; Ultrassom.

Nome do Autor: Denis Jeronimo Svicero

Título: EFICÁCIA DO ULTRASSOM NA IDENTIFICAÇÃO DE TRANSPLANTES
DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS EM TECIDO MUSCULAR EQUINO

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Ass. Dr. Rogério Martins Amorim

Presidente e Orientador

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ-UNESP-Botucatu

Profa. Adj. Ana Liz Garcia Alves

Membro

Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária

FMVZ-UNESP-Botucatu

Profa. Maria Cristina Ferrarini Nunes Soares Hage

Membro

Departamento de Medicina Veterinária

FZEA-USP-Pirassununga

Data da Defesa: 11 de Novembro de 2014.

DEDICATÓRIA

“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos” (Marcel Proust)

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Prof. Rogério Martins Amorim, que se portou como só o fazem os mestres. Acreditando no meu trabalho, deu-me a liberdade necessária dividindo comigo as expectativas, conduziu-me a maiores reflexões. Minha especial admiração e gratidão.

À Profa. Vânia Maria de Vasconcelos Machado pela sua contribuição, estabelecendo comigo uma aliança que se traduziu numa coorientação amigável.

À Profa. Fernanda da Cruz Landim-Alvarenga, por permitir o uso do Laboratório de cultivo celular possibilitando a realização do experimento.

À doutoranda e amiga Danielle Jaqueta Barberini, uma amizade incondicional, num exercício pleno de cooperação e disponibilidade. Pelas críticas, sugestões e apoio que ajudaram a transformar ideias em palavras.

À Dra. Marta Cristina Thomas Heckler pelas sugestões e contribuições que enriqueceram este trabalho.

Ao mestrando Gustavo Viana que me ajudou pacientemente na rotina dos exames ultrassonográficos em horários pouco usuais.

Aos funcionários e médicos veterinários residentes do Departamento de Clínica Veterinária de Grandes Animais - FMVZ, pela atenção e auxílio.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo apoio financeiro com o auxílio pesquisa ao meu trabalho.

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

Aos meus pais e a minha irmã, meu eterno agradecimento, porque souberam tolerar e compreender o meu estranho mau humor em determinados momentos desta pesquisa, com sabedoria.

E, finalmente, a todos que, de uma forma ou de outra, me ajudaram a chegar até aqui. Muito obrigado.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Dados descritivos das variáveis NMOST/NALL, LMEAN e SD e suas associações resultantes da análise pela técnica do histograma das imagens de ultrassom do músculo *brachiocephalicus* de 12 equinos.....40
- Tabela 2** - Valores P resultantes de comparações mistas pareadas para LMEAN entre os momentos resultantes da análise pela técnica do histograma.....54
- Tabela 3** - Valores P resultantes de comparações múltiplas pareadas para NMOST/NALL (%) entre os momentos resultantes da análise pela técnica do histograma.....54
- Tabela 4** - Valores P resultantes de comparações mistas pareadas para SD entre os momentos resultantes da análise pela técnica do histograma.....55

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Características ultrassonográficas do tecido muscular do músculo *brachiocephalicus* equino na região do transplante de CTM-MO não marcadas com o nanocristal Qtracker® 655 (A, C, E, F, G, I) e marcadas (B, D, F, H, J) em M0 (A, B), M24 (C, D), M48 (E, F), M72 (G, H) e M96 (I, J).....35
- Figura 2** - Imagem de imunofluorescência pela microscopia confocal (100x) do corte do tecido muscular do músculo *brachiocephalicus* de um equino biopsiado na região do transplante de CTM-MO marcadas com o nanocristal Qtracker® 655 após 24 horas o transplante (M24).....36
- Figura 3** - Imagem de imunofluorescência pela microscopia confocal (100x) do corte do tecido muscular do músculo *brachiocephalicus* de um equino biopsiado na região do transplante de CTM-MO marcadas com o nanocristal Qtracker® 655 após 48 horas o transplante (M48).....37
- Figura 4** - Imagem de imunofluorescência pela microscopia confocal (100x) do corte do tecido muscular do músculo *brachiocephalicus* de um equino biopsiado na região do transplante de CTM-MO marcadas com o nanocristal Qtracker® 655 após 72 horas o transplante (M72).....38
- Figura 5** - Imagem de imunofluorescência pela microscopia confocal (100x) do corte do tecido muscular do músculo *brachiocephalicus* de um equino biopsiado na região do transplante de CTM-MO marcadas com o nanocristal Qtracker® 655 após 96 horas o transplante (M96).....39
- Figura 6** - Local preparado para o transplante de CTM-MO não marcadas no músculo *brachiocephalicus* de um equino.....50
- Figura 7** - Transplante de CTM-MO marcadas no músculo *brachiocephalicus* de um equino guiado pela ultrassonografia.....51
- Figura 8** - Exame ultrassonográfico no músculo *brachiocephalicus* de um equino após transplante de CTM-MO marcadas com o nanocristal Qtracker®.51

- Figura 9** - Análise da imagem ultrassonográfica realizada no músculo *brachiocephalicus* de um equino após transplante de CTM-MO não marcadas com o nanocristal Qtracker® 655 pela técnica do histograma no software Photoshop CS4®.....52
- Figura 10** - Biópsia muscular no local do transplante das CTM-MO marcadas com o nanocristal Qtracker® 655no músculo *brachiocephalicus* direto de um equino.....52
- Figura 11** - Diferenciações osteogênica (A), adipogênica (B) e condrogênica (C e D) das CTM-MO provenientes de um equino eleito doador.....53

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	3
CAPÍTULO 1	
INTRODUÇÃO.....	5
REVISÃO DE LITERATURA.....	8
1 Células tronco (CT).....	8
2 Células tronco mesenquimais (CTMs).....	8
2.1 Fontes para a aquisição das CTMs.....	10
2.2 Utilização de CTMs.....	11
2.3 Uso de CTMs em medicina equina.....	12
3 Rastreabilidade das CTMs.....	13
CAPÍTULO 2 – Trabalho Científico.....	15
CAPÍTULO 3	
CONCLUSÕES GERAIS	41
BIBLIOGRAFIA	42
Anexos.....	50

SVICERO, D.J. **Eficácia do ultrassom na identificação de transplantes de células tronco mesenquimais em tecido muscular equino**. Botucatu, 2014. 70 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Diversas características biológicas das células tronco mesenquimais (CTMs) e seus efeitos nos tecidos ainda permanecem desconhecidos. Desta forma, estudos que visem compreender aspectos da biologia das CTMs, como mecanismo de ação, potencial de migração para o foco da lesão e tempo de permanência das células no local do transplante, podem contribuir para o uso terapêutico seguro e eficaz. Neste contexto, a rastreabilidade celular é fundamental. Este estudo avaliou a eficácia da ultrassonografia na identificação de transplantes de CTMs marcadas com o nanocrystal Qtracker 655[®] no músculo *brachiocephalicus* de equinos. CTMs de medula óssea (MO) de um equino eleito doador foram cultivadas e avaliadas *in vitro* quanto ao potencial de diferenciação osteogênico, adipogênico e condrogênico. Adicionalmente avaliou-se a caracterização imunofenotípica pela expressão dos marcadores CD34, CD44, CD90, CD105 e MHCII através da citometria de fluxo. Um banco de CTMs provenientes de medula óssea (CTM-MO) foi criado visando transplantes com a terapia alogênica. Foram transplantadas no músculo *brachiocephalicus* direito CTM-MO alogênicas marcadas com nanocrystal Qtracker 655[®] e no esquerdo CTM-MO não marcadas. Foram realizados exames de ultrassonografia (US) no momento da aplicação (M0), 24, 48, 72 e 96 horas após (M24, M48, M72 e M96, respectivamente). No M96 foi realizada a biópsia muscular do local do transplante. A análise imunofenotípica das CTM-MO revelou elevada expressão dos marcadores CD44, CD90 e do CD105 e baixa expressão do marcador CD34 e MHC II comprovando as características esperadas das CTMs. A técnica de imunofluorescência utilizada nos fragmentos dos tecidos musculares permitiu identificar a presença do nanocrystal em todos os fragmentos biopsiados. Os transplantes de CTM-MO marcadas com o nanocrystal exibiram imagens com ecogenicidade e ecotextura diferentes em comparação com as não marcadas. O lado dos transplantes marcados mostrou imagens regulares, definidas e hiperecóticas, cercadas por uma leve reverberação na área de formação em 0, 24 e 48 horas. Às 72 e 96 horas, mostrou maior dispersão e aumento da ecotextura heterogênea ao longo da região muscular. O lado

com transplantes de CTM-MO não marcadas a 0 horas mostrou imagens dispersas e hiperecóticas, formando efeito de reverberação e sombra acústica moderada. Ao fim de 24, 48 e 72 horas não houve alteração na ecotextura muscular. Em 96 horas, a ecotextura muscular foi discretamente heterogênea, sugestivo de processo de reparação instalado após a inoculação. O uso do US se mostrou capaz de contribuir no acompanhamento de transplantes CTM-MO marcadas com nanocristal durante M0, M24 e M48 qualitativamente, conforme a metodologia empregada.

Palavras-chave: Equino, miopatias, células tronco mesenquimais, ultrassom, nanocristal.

SVICERO, D.J. **Efficacy of ultrasound to identify mesenchymal stem cell transplantation in equine muscle.** Botucatu, 2014. 70 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista

ABSTRACT

Several biological characteristics of mesenchymal stem cells (MSCs) and their effects on tissues remain unknown. Thus, studies aiming to understand aspects of the biology of MSCs, mechanism of action, migration potential for the focus of the lesion and length of time that cells stay at the site of transplantation, may contribute to the safe and effective therapeutic use. In this context, the cell traceability is critical. This study evaluated the effectiveness of ultrasound in identifying transplanted MSCs marked with the nanocrystal Qtracker 655® in *brachiocephalicus* muscle of horse. MSCs from bone marrow (BM) of an elected equine donor were cultured and evaluated *in vitro* for potential of differentiation into osteogenic, adipogenic and chondrogenic. Additionally we evaluated the immunophenotypic characterization by expression of the markers CD34, CD44, CD90, CD105 and MHCII by flow cytometry. A bank of MSCs from bone marrow (MSC-MO) was created aiming transplants with allogeneic therapy. Allogeneic MSC-MO labeled with nanocrystal Qtracker 655® were transplanted to the right *brachiocephalicus* muscle and MSC-MO unmarked were transplanted to the left muscle. Ultrasound (US) were performed at the time of application (M0), 24, 48, 72 and 96 hours after (M24, M48, M72 and M96, respectively). In M96 a muscle biopsy of the site of transplantation was performed. Immunophenotypic analysis of MSC-MO showed high expression of CD44, CD90 and CD105 markers and low expression of CD34 and MHC II markers confirming the expected characteristics of MSCs. The immunofluorescence technique used in muscle tissue fragments identified the presence of the nanocrystal in all biopsied fragments. Transplants with MSC-MO labeled with nanocrystal exhibited images with different echotexture and echogenicity compared to unlabeled MSC-MO. The side of transplants with labeled MSCs showed regular, defined and hyperechoic images surrounded by a light reverberation in the training area at 0, 24 and 48 hours. At 72 and 96 hours showed greater dispersion and increased heterogeneous echotexture along the muscle region. The side with transplanted MSC-MO unlabeled at 0 hours showed scattered hyperechoic images, forming reverb effect

and moderate acoustic shadow. At 24, 48 and 72 hours there was no change in muscle echotexture. In 96 hours, the muscular echotexture was mildly heterogeneous, suggestive of repair process installed after inoculation. The use of the US was able to contribute to the qualitatively monitoring of transplanted MSC-MO labeled with nanocrystal during M0, M24 and M48, according to the methodology used.

Key words: Equine, myopathies, mesenchymal stem cells, ultrasound, nanocrystal.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Pesquisas com células tronco mesenquimais (CTMs) e engenharia tecidual têm mostrado perspectivas que provavelmente irão beneficiar a saúde tanto dos humanos como dos animais domésticos, dentre eles, os equinos atletas (KOCH et al., 2009). Para estes, na última década, estão em crescente avanço novas modalidades de terapia com CTMs e estudos atentando-se a sua caracterização e potencial de diferenciação (SMITH et al., 2003; KOERNER et al., 2006; ALVES et al., 2009; DE SCHAUWER et al., 2010; BURK et al., 2013a), e sua possível aplicação terapêutica em enfermidades neurológicas (MAIA et al., 2012), musculoesqueléticas (GUTIERREZ-NIBEYRO, 2011), dentre outras.

CTMs são células progenitoras encontradas em tecidos adultos, caracterizadas pela extensa capacidade proliferativa e pelo potencial de se diferenciar em várias linhagens de origem mesodermal; além de serem facilmente isoladas e expandidas *in vitro*. Apesar de ainda controverso, diversos estudos demonstraram a capacidade das CTMs de se transdifericiarem em tipos celulares das linhagens ectodermal e endodermal (CHEN Y et al., 2008; WU; TAO, 2012). Essas propriedades tornam as CTMs alvos promissores para aplicação em ensaios clínicos, particularmente em medicina regenerativa, terapia celular e engenharia de tecidos (MEIRELES et al., 2006, CHEN et al., 2008). Adicionalmente, a multipotencialidade, os efeitos parácrinos, a propriedade imunomoduladora e o comportamento migratório também corroboram para o grande interesse científico acerca dessas células (BROOKE et al., 2007).

Também, em medicina equina os estudos com CTMs apresentam resultados promissores, particularmente no tratamento de lesões musculoesqueléticas e osteoarticulares, (GODWIN et al., 2012). Os equinos apresentam alta prevalência de enfermidades musculares, associadas ou não ao exercício físico intenso. Muitas delas, como a Distrofia Muscular Nutricional e as Miopatias Inflamatórias que podem acarretar severa atrofia muscular. Neste contexto a terapia celular com CTMs constitui-se em uma alternativa para recuperação tecidual.

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

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

Apesar disso, muitas características biológicas das CTMs e seus efeitos nos tecidos ainda permanecem desconhecidos. Desta forma, estudos que visem compreender aspectos da biologia das CTMs, como mecanismo de ação, potencial de migração para o foco da lesão e tempo de permanência das células no local do transplante, podem contribuir para o uso terapêutico seguro e eficaz. Neste contexto, a rastreabilidade celular é fundamental, sendo que diversos marcadores têm sido utilizados (BYDLOWSKI et al., 2009).

Quantum dots (pontos quânticos) são nanocristais semicondutores (~2-100 nm) com propriedades óticas e elétricas únicas (DABBOUSI et al., 1997; BRUCHEZ et al., 1998) comumente aplicados em imagens biomédicas e em indústrias eletrônicas (HARDMAN, 2006). Uma das propriedades mais valiosas dos *Quantum dots* (QDs) é seu espectro de fluorescência, o que confere aos QDs luminescência ótica para imagens biomédicas (CHAN et al., 2002; ALIVASATOS, 2004). Os QDs fluorescentes podem ser conjugados com moléculas bioativas (anticorpos, receptores celulares) para marcar eventos biológicos específicos e estruturas celulares, como peroxissomos, DNA e receptores de membrana celular (HARDMAN, 2006), adequados para marcação de CTMs e passíveis de rastreabilidade por alguns equipamentos de diagnóstico por imagens capazes de estimular e/ou captar a luminescência.

Os QDs estão emergindo como uma nova classe de nanopartículas excitáveis com diversificadas aplicações biomédicas, incluindo métodos de formação de imagens de tumores *in vivo* de modo não invasivo, linfonodos, leitos vasculares e tráfego celular (MICHALET et al., 2005; LIN et al. 2007).

Tais eventos estimularam-nos em se valer da ultrassonografia e a escolha do nanomarcador *Quantum Dot* Qtracker 655[®] com o intuito de se avaliar a eficácia de detectar diferenças de ecogenicidade e ecotextura em transplantes de CTMs marcadas com este nanocristal e não marcadas em tecido muscular equino.

A hipótese a ser testada neste estudo é a de que transplantes de CTMs marcadas com nanocristal podem ser identificados pelo ultrassom (US). Caso esta hipótese seja confirmada, novos estudos sobre o comportamento migratório e tempo de permanência

no tecido muscular transplantado poderão ser realizados, contribuindo para o uso terapêutico seguro e eficaz das CTMs em enfermidades musculares de equinos.

REVISÃO DE LITERATURA

1 Células Tronco (CT)

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

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

Também podem ser classificadas de acordo com sua origem em embrionárias (encontradas nos embriões) e adultas (extraídas dos diversos tecidos, tais como medula óssea, tecido adiposo e cordão umbilical) (SCHWINDT et al., 2005; DAHLGREN, 2009).

2 Células Tronco Mesenquimais (CTMs)

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

linhagens germinativas como neurônios, células da glia e hepatócitos (CHEN Y et al., 2008; WU; TAO, 2012).

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

Para a caracterização das CTMs, alguns marcadores de superfície (*Clusters Designation – CD*) têm sido utilizados e avaliados segundo sua expressão ou não (Le BLANC et al., 2003; RYAN et al., 2005; KERN et al., 2006; CHEN F et al., 2007; De SCHAUWER et al., 2010). Ainda não há um único marcador ou uma combinação de marcadores que se mostram específicos e exclusivos das CTMs, sendo que estes são encontrados também em outros tipos celulares (CHEN F et al., 2007; BYDLOWSKI et al., 2009; MONTEIRO et al., 2010).

Em humanos há critérios mínimos estabelecidos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular para a caracterização das CTMs, elas devem ser aderentes ao plástico, expressarem os marcadores de superfície CD105, CD73 e CD90, e não expressarem os marcadores CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 α ou CD19 e HLA-DR, e ainda, se diferenciarem em osteoblastos, adipócitos e condroblastos *in vitro* (DOMINICI et al., 2006).

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

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

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

2.1 Fontes para a aquisição das CTMs

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

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

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

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

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

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

que viabiliza a utilização de um banco de células a partir de cavalos doadores (PERONI; BORJESSON, 2011; BURK et al., 2013a).

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

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

2.2 Utilização de CTMs

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

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

Na medicina veterinária em geral, estudos estão sendo realizados em doenças sanguíneas, hepáticas, cardíacas, entre outras, pelo fato das CTMs originarem osso, cartilagem, músculo, estroma medular, tendão, gordura e outros tecidos conjuntivos (GATTEGNO-HO et al., 2012).

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

2.3 Uso de CTMs em medicina equina

A utilização desta terapia na medicina equina está em intensa expansão, pois fornece aos veterinários uma opção para o tratamento de condições musculoesqueléticas de difícil regeneração, como tendão, ligamentos, menisco e cartilagem (CLEGG; PINCHBECK, 2011; GUTIERREZ-NIBEYRO, 2011; STEWART, 2011; GARVICAN et al., 2014).

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

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

Porém, embora já se tenham alguns resultados altamente promissores, muito pouco se sabe a respeito dos efeitos a longo prazo deste tipo de terapia. Mais ainda, que pacientes reagem de forma diferente a medicamentos, esta terapia pode ser útil para certo número de indivíduos, enquanto para outros pode não ter efeito nenhum (SUMMER & FINE, 2008). Sendo assim, muitos estudos ainda devem ser realizados. (BYDLOWSKI et al., 2009).

A grande potencial de diferenciação das CTMs, a possibilidade de enxerto, seus efeitos imunossupressores e sua expansão em cultura levaram ao aumento do interesse clínico relativo ao uso destas células. No caso de estudos utilizando CTMs em ensaios clínicos, milhões de CTMs isoladas ou ligadas a biomateriais são necessárias. A produção de CTMs para este propósito necessita o cumprimento de boas práticas

laboratoriais, para assegurar a qualidade do cultivo. Todas as etapas do processo necessitam ser definidas, a saber: material utilizado (doador, tecido original, procedimentos de coleta, de enriquecimento do meio, de separação); processamento da cultura (densidade celular, número de passagens, meio de cultura); aparelhos para cultura (qual o melhor sistema fechado; utilização de métodos analíticos para detecção de compostos ativos indesejáveis e impurezas); controle de qualidade (condições de elegibilidade do doador, padrões para o fenótipo e potencial funcional, determinação da segurança microbiológica; verificação da ausência de transformação durante o processo de cultura) (SENSEBÉ, 2009).

3 Rastreabilidade das CTMs

Conforme BYDLOWSKI et al. (2009), sem a utilização de marcadores celulares positivos definidos, os estudos *in vivo* das linhagens celulares das CTMs tornam-se muito difíceis; já que o rastreamento exige a marcação.

Há diversos marcadores celulares descritos para esta finalidade, como Fluorescent Lipophilic Chloromethylbenzamido (CM-DiI), Green Fluorescent Protein (GFP), Quantum dots (QDs), Micron-Sized Iron Oxide Particles (MPIOs), dentre outros.

Anunciada como uma nova revolução tecnológica na medicina, nanomateriais denominados de pontos quânticos (*Quantum dots* ou QDs) estão sendo utilizados como marcadores biológicos fluorescentes para diagnósticos por imagem de células cancerígenas (YONG et al., 2007). Uma grande variedade de pontos quânticos baseados no CdS (sulfeto de cádmio) e ZnS (sulfeto de zinco) tem sido testados como marcadores fluorescentes para mapeamento de neoplasias (CASTRO & QUEIROZ, 2011). Estruturalmente, QDs consistem em um núcleo cristalino metalóide conjugado a um "escudo" que lhe confere uma proteção e lhe agrega uma biodisponibilidade. Em síntese, os "escudos" são uma variedade de metais complexos, tal como um semi condutor, metais nobres, metais de transição magnética. Além disso, pode-se associar mais um "revestimento" bioativo (uma proteína ou peptídeos) que lhe promove biofuncionalidades (durabilidade, estabilidade, luminescência). Um exemplo de QDs pode ser CdSe (seleneto de cádmio), conjugado com ZnS (sulfeto de zinco), sendo esta conjugação respectivamente o núcleo cristalino metalóide e seu "escudo". Associando-

se a isso, a albumina sérica de ovelha ("revestimento") confere-se a biofuncionalidade (HARDMAN, 2006).

Um marcador que possui propriedade bioluminescente *in vivo* é o Qtracker 655[®]. Este nanocristal, fluoresce com a emissão de um comprimento de onda de 655 nanômetros (nm) se excitado por um comprimento de onda entre 450 nm e 615 nm em microscopia de fluorescência, segundo seu fabricante.

Segundo Michalet et al. (2005), Lin et al. (2007) e Shashkov et al. (2008), a capacidade dos QDs vai além de simples nanomarcadores utilizados para visualizar elementos marcados em microscopia de fluorescência. Michalet et al. (2005) e Lin et al. (2007), mostram suas diversificadas aplicações biomédicas, incluindo métodos de formação de imagens de tumores *in vivo* de modo não invasivo, linfonodos, leitos vasculares e tráfego celular.

Deste modo, caso CTMs marcadas com nanocristal utilizando os QDs possam ser identificados pelo US, poderemos contribuir com novos estudos sobre o comportamento migratório das CTMs; tornando seu uso terapêutico mais seguro e eficaz nas enfermidades passíveis até o momento em equinos.

CAPÍTULO 2

TRABALHO CIENTÍFICO

Trabalho a ser enviado para a revista *Stem Cells International*.

Eficácia do ultrassom na identificação de transplantes de células tronco mesenquimais marcadas com Qtracker 655[®] em tecido muscular equino

Resumo

Células provenientes de medula óssea (CTM-MO) de um equino eleito doador foram coletadas, isoladas, cultivadas e caracterizadas *in vitro* como células tronco mesenquimais devido a aderência ao plástico, morfologia fibroblastóide, potencial de diferenciação osteogênico, adipogênico e condrogênico e caracterização imunofenotípica pela expressão dos marcadores CD34, CD44, CD90, CD105 e MHC II. Estas CTM-MO alogênicas foram transplantadas no músculo *brachiocephalicus* de 12 equinos marcadas com o nanocristal Qtracker 655[®]. As regiões que receberam os transplantes nos 12 equinos foram submetidas ao exame de ultrassom (US), no momento da aplicação (0), 24, 48, 72 e 96 horas após, visando avaliar a eficácia da ultrassonografia na identificação destes transplantes de CTM-MO marcadas, no músculo *brachiocephalicus* de equinos. Adicionalmente, foram realizadas biópsias musculares no local dos transplantes nos distintos momentos para posterior comparação com as imagens de US e a identificação pela técnica de imunofluorescência. O uso do US se mostrou capaz de contribuir no acompanhamento dos transplantes de CTM-MO marcadas imediatamente, 24 e 48 horas após o transplante e identificação do nanocristal em todos os fragmentos biopsiados pela técnica de imunofluorescência.

Palavras-chave: Equino, miopatias, células tronco mesenquimais, ultrassom, nanocristal.

Introdução

As células tronco mesenquimais (CTMs) são células progenitoras multipotentes, não hematopoiéticas, facilmente isoladas a partir de diversos tecidos adultos, e caracterizadas por sua extensa habilidade proliferativa e de se diferenciar *in vitro* em diversas linhagens mesenquimais em resposta a um estímulo apropriado, incluindo osteoblastos, adipócitos, condrócitos, tenócitos e miócitos [1,2], já sendo demonstrado seu uso em cartilagem, osso e tendão de equinos [3 – 5]. Adicionalmente, apesar de controverso, as CTMs também podem se diferenciar em resposta a estímulos específicos, em células de outras linhagens germinativas como neurônios, células da glia e hepatócitos [6 – 8]. Na espécie equina, a medula óssea (MO) é uma das fontes mais estudadas e utilizadas para a obtenção de células tronco adultas [9,10], mesmo o tecido adiposo (TA) [11,12], as células da membrana amniótica [13] e do cordão umbilical (CU) serem fontes de CTMs e com potencial de diferenciação. A identificação das CTMs equinas é realizada principalmente pela capacidade de aderência ao plástico e de se diferenciarem em múltiplas linhagens [16], pois a imunofenotipagem em equinos é dificultada pela falta de marcadores específicos, disponibilidade limitada de anticorpos monoclonais anti-cavalo [17 – 19] e evidências de que certos marcadores de outras espécies não apresentam reação cruzada com a espécie equina [11]. Diante disso, diversos marcadores têm sido utilizados para realizar a imunofenotipagem destas células, como os positivos CD44, CD90 CD29 [11,15,17,20], CD105 [21 – 23], MHC-I [5,15,20], e os negativos CD14 [17], CD34 [21,23], MHC-II [5,17,20,23,24] e CD45 [21,24]. Há evidências que sugerem que estas células melhoram a regeneração e função dos tecidos pela habilidade de auto renovação [3], de diferenciação em linhagens ectodermas [25], mesodermas [26] e endodermas [6,27], síntese de fatores de crescimento e liberação de citocinas anti-inflamatórias e imunomodulatórias [2,18,20,26]. A terapia autóloga com CTMs é muito utilizada, pois não resulta em nenhum efeito deletério significativo, tanto no momento da implantação quanto posteriormente, como por exemplo, formação de tumores [27]. O tratamento alogênico em cavalos oferece vantagens no caso de lesões agudas, por ser instituído rapidamente, pois se suprime o período necessário para o isolamento e

expansão de CTMs autólogas, e por permitir a utilização de uma população celular mais homogênea com capacidade de diferenciação comprovada [5,18,29], a partir da utilização de bancos de células de cavalos doadores [26,30]. Apesar disso, muitas características biológicas das CTMs e seus efeitos nos tecidos ainda permanecem desconhecidos. Desta forma, estudos que visem compreender aspectos da biologia das CTMs, como mecanismo de ação, potencial de migração para o foco da lesão e tempo de permanência das células no local do transplante, podem contribuir para o uso terapêutico seguro e eficaz. Neste contexto, a rastreabilidade celular é fundamental, sendo que diversos marcadores têm sido utilizados [31,46,47]. Este estudo optou pela identificação por meio de um nanomarcador conhecido por *Quantum Dot* Qtracker 655[®]. *Quantum dots* (pontos quânticos) são nanocristais semicondutores (~2-100 nm) com propriedades óticas e elétricas únicas [32,33] comumente aplicados em imagens biomédicas e em indústrias eletrônicas [34]. Uma das propriedades mais valiosas dos *Quantum dots* (QDs) é seu espectro de fluorescência, o que confere aos QDs luminescência ótica para imagens biomédicas [35,36]. Os QDs fluorescentes podem ser conjugados com moléculas bioativas (anticorpos, receptores celulares) para marcar eventos biológicos específicos e estruturas celulares, como peroxissomos, DNA e receptores de membrana celular [37], adequados para marcação de CTMs e passíveis de rastreabilidade por alguns equipamentos de diagnóstico por imagens capazes de estimular e/ou captar a luminescência. Os QDs estão emergindo como uma nova classe de nanopartículas excitáveis com diversificadas aplicações biomédicas, incluindo métodos de formação de imagens de tumores *in vivo* de modo não invasivo, linfonodos, leitos vasculares e tráfego celular [37,38,39,46,47]. Tais eventos estimularam em nos valer da ultrassonografia e a escolha do nanomarcador *Quantum Dot* Qtracker 655[®] com o intuito de se detectar diferenças de ecogenicidade e ecotextura na comparação de imagens obtidas por US em transplantes de CTMs marcadas com este nanocristal e não marcadas. Além disso, refinamos o delineamento e a metodologia de análise das imagens para garantir maior fidelidade ao estudo. O objetivo deste estudo foi avaliar se as CTMs marcadas com nanocristal Qtracker 655[®] podem ser identificadas pelo US, após serem transplantadas no músculo *brachiocephalicus* de equinos.

Materiais e métodos

Comitê de Ética

Todas as etapas do desenvolvimento do trabalho estavam de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal e foram aprovadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta Faculdade (protocolo nº 209/2012-CEUA).

Delineamento experimental

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizados 12 equinos (*Equus caballus*) adultos, clinicamente sadios, fêmeas e machos, sem raça definida, com idade entre 6 e 12 anos e peso corporal entre 300-500 kg. Durante a fase experimental os animais receberam capim picado (*Pennisetum purpureum*), feno de *Coast Cross* (*Cynodon dactylon*) e ração comercial para equinos, duas vezes ao dia. O fornecimento de água e sal mineral foi *ad libitum*. Os animais foram mantidos em piquetes coletivos no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, campus Botucatu.

Coleta, isolamento, cultivo e marcação das Células Tronco Mesenquimais com Nanocristal Qtracker 655®

A coleta e isolamento das CTM-MO foram realizadas através da punção aspirativa da medula óssea conforme a metodologia descrita por Barreira [40], com modificações.

Um animal clinicamente apto, com idade entre seis e oito anos, foi eleito doador para obtenção das CTM-MO. O mesmo foi mantido em estação, contido e sedado com cloridrato de xilazina 10% (0,5 mg/kg) (Sedomin, König, ARG) intravenoso e em seguida realizado um bloqueio anestésico local com cloridrato de lidocaína 2% (Xylestesin, Cristália, BRA) na região da quinta esternébra, onde células da medula óssea foram coletadas com auxílio de agulha Komiyashiki®, utilizando duas seringas de

20mL contendo 2mL de heparina a 1000 UI/mL (Hemofol, Cristália, BRA) e 2 ml de Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS, Invitrogen, USA). As amostras foram centrifugadas a 340G por 10 minutos, sendo o sobrenadante (plasma e gordura) descartado. Ao material remanescente foi adicionado o meio DMEN baixa glicose/F12 (Invitrogen, USA) na proporção de 1:1, sendo que essa mistura foi adicionada lentamente na proporção de 1:1 ao Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich Corp, USA), seguida de nova centrifugação a 340G por 40 minutos. Com a obtenção das células mononucleares, foi acrescido o meio DMEN baixa glicose/F12 na proporção de 1:1 e a amostra centrifugada duas vezes a 340G por 10 minutos. As células foram cultivadas em garrafas de 75cm² (Sarstedt, USA) contendo meio com 80% de DMEN baixa glicose/F12 na proporção de 1:1, 20% soro fetal bovino (Invitrogen, USA), 1% de penicilina/estreptomicina (Invitrogen, USA) e 1,2% de anfotericina B (Invitrogen, USA), em estufa a 37°C em atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% CO₂. O meio de cultivo foi trocado a cada 3 dias. As células apresentaram aderência ao plástico da garrafa com 48h de cultivo e morfologia fibroblásticoide com cinco dias.

Para a congelação, o tapete de células de cada garrafa foi removido com uso de tripsina (Invitrogen, USA). Após centrifugação, as células foram ressuspensas na concentração de 1×10^6 células/mL em meio de congelação constituído por 90% de soro fetal bovino (Invitrogen, USA) e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma, D2650). Em seguida, foram distribuídas em criotubos. Os criotubos foram acondicionados em um tubo especialmente desenvolvido para a troca lenta de calor e permaneceram 24 horas em freezer -80°C, sendo posteriormente mantidas nesta temperatura.

Para a marcação das CTMs com o nanocristal Qtracker 655[®] (Invitrogen, USA) foram utilizadas garrafas de cultivo com 80% de confluência (aproximadamente 6×10^6 células.). Como descrito no protocolo do fabricante, foi adicionado 1µl da solução A e 1µl da solução B em tubo plástico de 2 mL e incubados em temperatura ambiente durante 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 200 µl de meio padrão a esse tubo de plástico de 2 mL e agitado por 30 segundos em vortex. Essa solução foi adicionada na garrafa de cultivo e incubada durante 60 minutos em estufa a 5% CO₂. Posteriormente, o meio da garrafa foi descartado e as células foram lavadas duas vezes com o meio de cultivo padrão, estando preparada para visualização em microscópio de fluorescência. A marcação foi observada em laboratório. Após esse período, as células marcadas passaram pelo processo de tratamento com tripsina (Invitrogen, USA), sendo então suspensas em 100 µl de PBS.

Em todos os transplantes foram aplicadas cerca de 1×10^6 CTMs alogênicas, sendo estas de terceira geração celular (P3).

Diferenciação osteogênica, condrogênica e adipogênica das CTMs

Durante a terceira passagem (P3), amostras de CTM-MO foram acondicionados em placas de 6 Wells (Sarstedt, USA) em triplicatas, para diferenciação osteogênica e adipogênica, e incubadas em estufa a 37°C em atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% CO₂. Após confluência de 80%, o meio de manutenção foi removido e o meio de diferenciação Stempro adipogenesis e Stempro osteogenesis (Invitrogen, USA) foi adicionado aos cultivos, sendo mantido um poço de cada placa como controle e dois poços utilizados para avaliar a diferenciação. O meio foi trocado a cada 3 dias, permanecendo 15 dias, e a diferenciação em tecido adiposo foi confirmada pela deposição de gotículas de gordura no citoplasma pela coloração Oil Red 0,5% (Sigma-Aldrich Corp, USA). A diferenciação em tecido ósseo foi confirmada pela coloração positiva da matriz de cálcio extracelular pelo corante Alizarin Red 2% (Sigma-Aldrich Corp, USA).

Para a diferenciação condrogênica, um *pellet* de CTMs foi cultivado em um tubo Falcon e incubadas em estufa a 37°C em atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% CO₂. Após dois dias, o meio de manutenção foi removido, e adicionado o meio de diferenciação Stempro chondrogenesis (Invitrogen, USA), com troca a cada 3 dias, permanecendo por 21 dias. Para a confirmação da diferenciação condrogênica, os *pellets* foram corados com Alcian Blue (ph=2,5) e Azul de Toluidina (ph=1) para identificar proteoglicanos.

O potencial de diferenciação *in vitro* das CTM-MO em linhagens osteogênica e adipogênica foi demonstrado com após o décimo e quarto dia. A diferenciação tanto em osteócitos quanto adipócitos ocorreu somente após 15 dias nestas células [14,22,26,26].

A diferenciação em tecido ósseo foi confirmada pela coloração positiva da matriz de cálcio pelo corante Alizarin Red. Adicionalmente, foi observada mudança da morfologia fibroblastóide para poligonal em grande proporção de células. A diferenciação em tecido adiposo foi confirmada pela deposição de gotículas de gordura no citoplasma, confirmada pela coloração Oil Red [14,22,26,26].

A diferenciação condrogênica ocorreu após 21 dias, e foi confirmada pela deposição de matriz hialina, rica em proteoglicanos. Foram realizadas as colorações

Alcian Blue (áreas azuis) e Azul de Toluidina (áreas róseas metacromáticas) que identificaram matriz extracelular rica em proteoglicanos [14,22,26,26].

Caracterização das CTMs

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

A análise imunofenotípica das CTM-MO em P3 através da citometria de fluxo, utilizando um mínimo de 10.000 células para a avaliação, revelou marcação positivas para CD44 (91,2%), CD90 (92,1%), CD105 (53,1%) e negativa para CD34 (1,9%), MHC II (5,9%), concordando com os achados de outros estudos. [11,17,20,21,23,24,28].

Transplante das Células Tronco Mesenquimais

Para o transplante das CTM-MO usamos microseringas (Hamilton Company, USA) de 100 µL, série 700, com agulha removível, com ponta número 2 (meia lua), sem guia, corpo de vidro e embolo de aço inox. O uso destas microseringas nos promoveu maior garantia da não inoculação de ar junto com as CTM-MO; elemento que na imagem ultrassonográfica pode gerar artefatos.

Previamente, os animais foram contidos e mantidos em estação. Na região do músculo *brachiocephalicus* esquerdo (lado esquerdo dos equinos), realizou-se a tricotomia de um quadrante com medidas de 10 cm x 10 cm, localizado 3,5 cm acima da fossa jugular e denominado Transplante 1 (que recebeu transplantes de CTM-MO não marcadas).

Na região do músculo *brachiocephalicus* direito (lado direito dos equinos), realizou-se a tricotomia de dois quadrantes com medidas de 10 cm x 10 cm, distanciados em 3 cm e localizados 3,5 cm acima da fossa jugular. Foi denominado Transplante 2 (que recebeu transplantes de CTM-MO marcadas com o nanocristal) o mais cranial e alinhado com o quadrante Transplante 1 (lado esquerdo). O quadrante mais caudal do lado direito foi denominado Transplante 3 (que recebeu CTM-MO marcadas com o nanocristal).

Exame Ultrassonográfico

O aparelho ultrassonográfico empregado foi o modelo MYLAB70 (ESAOTE®), utilizando o “preset” para análise de sistema músculo esquelético, transdutor linear com frequência de 18 mhz, ganho entre 75% e 85%, profundidade de 37 mm e com foco aproximadamente entre 4mm e 10,7mm.

Todos os exames de US foram realizados pelo mesmo médico veterinário especialista na área de diagnóstico por imagem.

Para realização do exame ultrassonográfico e transplante, promoveu-se a limpeza local com detergente, seguido de limpeza com álcool e o uso de gel acústico. Primeiramente, as regiões correspondentes dos músculos *brachiocephalicus* Transplante 1, Transplante 2 e Transplante 3 foram identificadas pelo modo-B, sendo realizado cortes longitudinais e transversais; verificando sua integridade e características de ecogenicidade e ecotextura.

Deu-se continuidade ao exame de US em Transplante 1, Transplante 2 e Transplante 3, atentando-se as possíveis dispersões dos transplantes de CTM-MO marcadas e não marcadas nos locais adjacentes aos transplantes nos tecidos musculares, a alterações de ecogenicidade e ecotextura.

Em cada quadrante, o local do transplante foi identificado com caneta contendo tinta permanente para garantir a avaliação ultrassonográfica do mesmo local ao longo do experimento. O quadrante Transplante 3 foi separado apenas para biópsias, não sendo mais acompanhado pelo US.

Os quadrantes Transplante 1 e Transplante 2 foram submetidos ao exame de US logo após os transplantes (M0) e geradas as imagens referentes a este momento.

Transplante 1 (CTM-MO não marcadas) e Transplante 2 (CTM-MO marcadas) dos 12 animais foram submetidos ao exame de US 24, 48, 72 e 96 horas após M0 (M24,

M48, M72 e M96, respectivamente), tendo-se imagens para cada momento, totalizando 5 dias de acompanhamento ultrassonográfico com um intervalo de 24 horas entre cada momento (M0, M24, M48, M72, M96).

Análise das imagens de US

As imagens obtidas em todos os exames foram qualitativamente analisadas quanto a sua ecogenicidade e ecotextura por 3 avaliadores, atendo-se a possibilidade de diferenças entre os locais Transplante 1 e Transplante 2 de cada animal nos diferentes momentos (M0, M24, M48, M72, M96).

Adicionalmente, a técnica do histograma foi utilizada para avaliar quantitativamente a ecogenicidade e ecotextura do local dos transplantes, na tentativa encontrar diferenças entre as sequências dos momentos e Transplante 1 e Transplante 2 de cada animal e entre os animais estatisticamente.

O histograma foi realizado através do programa de computador específico para análise de imagens, Photoshop CS4®. Foi selecionado em cada imagem a região do transplante, centralizando a profundidade aproximada de 1 cm de cada animal, na área retangular de aproximadamente 5 cm de largura x 2,5 cm de altura (200 *pixels* x 100 *pixels*) para avaliação.

As variáveis mensuradas foram: NMOST, que se refere a todos os pontos luminosos semelhantes, ou seja, o número de pixels que mais se repetem (representada no histograma por *Count*); NALL, referente aos pontos luminosos totais presente na região selecionada (representada por *Pixels*); SD, desvio padrão da amplitude do eco (representado no histograma por *Std Dev*); LMEAN, que indica a luminosidade média ou o grau de cinza médio da região selecionada (representada por *Mean*).

A relação NMOST/NALL e SD são as variáveis que representam a distribuição, homogênea ou heterogênea, dos ecos na região selecionada, ou seja, a ecotextura da região, sendo que quanto maior a relação e menor o desvio padrão, mais homogênea a ecotextura. LMEAN representa a ecogenicidade da estrutura, valores baixos indicam menor ecogenicidade e valores altos, ecogenicidade mais elevada [43,44,45].

Todos os valores foram tabulados para cada animal e posteriormente avaliados estatisticamente.

Inicialmente a distribuição das variáveis foi analisada e somente a variável NMOST/NALL não apresentou normalidade. Modelos lineares mistos (PROC MIXED, SAS Institute, 2011) foram usados para comparar a média das variáveis LMEAN e SD entre os momentos estudados, dentro de cada tratamento (transplantes de CTM-MO marcadas e não marcadas). Uma estrutura de covariância de simetria composta foi usada para modelar a correlação entre as medidas repetidas dentro de cada animal. A variável “animal” foi considerada um termo aleatório. O teste de Tukey foi usado para ajustar os valores-P resultantes de comparações múltiplas. Para cada lado, o teste de postos de sinais de Wilcoxon para amostras pareadas (PROC UNIVARIATE; SAS Institute, 2011) foi utilizado para comparar a variável NMOST/NALL entre os momentos estudados. O método de Bonferroni foi usado para ajustar o valor-P resultante das comparações múltiplas. O nível de significância estatística foi definido como 0,05.

Biópsias musculares

Foram realizadas biópsias musculares utilizando-se a técnica "céu aberto" com auxílio de um *punch* com 0,8 cm de diâmetro e 1,0 cm de profundidade, no mesmo local dos transplantes (delimitadas pelo US) das CTM-MO marcadas com nanocristal, no momento M96 (logo após o exame de US deste momento), e no quadrante Transplante 2 nos 12 animais.

No quadrante Transplante 3 de cada animal, 4 animais foram submetidos a biópsia no M24, 4 animais no M48 e 4 animais no M72, respectivamente.

Deste modo, totalizando 12 fragmentos de tecido muscular no quadrante Transplante 2 no M96, 4 fragmentos de tecido muscular de no quadrante Transplante 3 no M24, 4 fragmentos de tecido muscular no quadrante Transplante 3 no M48 e 4 fragmentos de tecido muscular no quadrante Transplante 3 no M72 contendo transplantes de CTM-MO marcados com o nanocristal.

Os animais foram previamente sedados com xilazina (0,5 mg/kg) e submetidos a anestesia local com em média de 10 mL de lidocaína 2 % sem vasoconstritor. Após o bloqueio, uma incisão de 2 cm na pele, no subcutâneo e na fáscia muscular foi feita para que o *punch* penetrasse no local.

O fragmento foi então separado, após inserindo-se completamente o cilindro de corte. Uma sutura com ponto em “X” foi realizada na musculatura, seguido de 3 pontos simples e separados com Nylon 2.0 na pele após o término da biópsia.

As amostras retiradas foram por alguns segundos separadas em placa de Petri fechadas com uma gaze e embebida em soro fisiológico para que qualquer processo de contração muscular cessasse-se. Em seguida, foram envoltas por talco neutro, como crioprotetor e assim protegendo a arquitetura muscular dos efeitos da congelação. Os fragmentos foram então armazenados em cassetes para sofrer o processo da congelação em nitrogênio líquido em temperatura de -160°C em um botijão apropriado para posterior processamento histológico.

Imunofluorescência

Cada fragmento muscular foi retirado do nitrogênio líquido e colocado em temperatura de -20°C dentro de um criostato. Após a clivagem dos fragmentos musculares, as lâminas foram processadas pela técnica de imunofluorescência marcadas com DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dilactate - Invitrogen, USA) e Myosin Mouse Monoclonal Antibody (clone MY32 - Invitrogen, USA) com anticorpo secundário goat anti-mouse IgG-FITC (abD Serotec, UK) conforme protocolo recomendado pelos fabricantes. Posteriormente, as lâminas foram analisadas em microscopia confocal (Leica® SP5), de acordo com o protocolo do centro de microscopia eletrônica do Instituto de Biociências da Unesp de Botucatu.

Resultados e Discussão

Resultados

Análise das imagens de US

Na análise qualitativa, as imagens com CTM-MO marcadas exibem uma ecogenicidade diferente em comparação com as imagens que possuem CTM-MO não marcadas.

Transplantes de CTM-MO marcadas mostram na região dos transplantes uma ecotextura regular e definida e com área de ecogenicidade maior e característica; rodeado por uma ligeira reverberação na área do transplante formada em M0 (Figura 1).

Em M24 nota-se pequenos agrupamentos levemente distantes entre si (Figura 1).

Posteriormente, em M48 vê-se maior distância e menor ecogenicidade destes agrupamentos se comparados ao M24 (Figura 1).

Em M72 e M96, as imagens formadas apresentam uma maior dispersão e aumento da ecotextura heterogênea ao longo da região muscular; dificultando a identificação dos transplantes e assim tornando não confiável alegar sua presença no local (Figura 1).

Transplantes de CTM-MO não marcadas, mostram imagens dispersas e hiperecogênicas em M0, formando efeito de reverberação e sombra acústica moderada; similar a transplantes de CTM-MO marcadas no mesmo momento (Figura 1).

Em M24, M48 e M72 horas, não houve mudança na ecotextura muscular resultante dos transplantes das CTM-MO quando comparado com os transplantes de CTM-MO marcadas. Em M96, observou-se a formação de uma ecotextura muscular discretamente heterogênea em alguns animais, sugestivo de um processo de reparação instalado após a inoculação de conteúdo através de agulha fina (Figura 1).

Para avaliação quantitativa dos valores individuais, foram expressos os dados descritivos das variáveis NMOST/NALL, LMEAN e SD que mostram as associações entre os transplantes de CTM-MO marcadas e não marcadas em seus momentos (valor-P). A variável NMOST/NALL que não apresentou normalidade foi mostrada através da mediana e erro padrão (o método de Bonferroni foi usado para ajustar o valor-P); as outras foram demonstradas por média, desvio padrão e erro padrão (Tabela 1).

Os valores P resultantes de comparações mistas ($p < 0,05$) e múltiplas ($p < 0,013$) pareadas referentes às três variáveis, não evidenciaram significância estatística em nenhum ponto.

Com isso, a análise quantitativa não nos permitiu afirmar/sugerir diferenças como a análise qualitativa.

Imunofluorescência

A maioria dos 24 fragmentos musculares que continham transplantes de CTM-MO marcadas (4 cortes no M24, 4 cortes no M48, 4 cortes no M72 e 12 cortes no M96) apresentaram dupla marcação positiva para o nanocristal e para o DAPI, indicando a presença das CTMs transplantadas (Figura 2, Figura 3, Figura 4, Figura 5).

Discussão

Os nanocristais fluorescentes utilizados apresentaram excelente marcação celular, podendo ser observados no tecido muscular. O protocolo para marcação das CTM-MO com Qtracker 655® foi rápido, de fácil execução e proporcionou ótimos resultados, apresentando alta fluorescência. Donaldson [41] e Garon [42] descreveram que a fluorescência do nanocristal poder ser detectada com até duas semanas em algumas células. Foi observada a presença de CTMs marcadas em todos os momentos por meio da dupla marcação positiva na imunofluorescência para o nanocristal e DAPI. Desta forma comprova-se que as CTMs transplantadas permaneceram no local do transplante por até 96 horas. Deste modo, M96 definido como a última biópsia para identificação das CTM-MO marcadas e transplantadas no tecido muscular revelou a presença das CTMs marcadas em microscopia confocal; uma vez que estava dentro do período descrito para visualização.

Diversos fatores influenciam no estabelecimento do diagnóstico ultrassonográfico, tais como a experiência do avaliador, aparelho utilizado, a frequência do transdutor, a regulagem de profundidade, ganho e contraste. Além disso, o US é um exame dinâmico, no qual sucessivas imagens realizadas no mesmo momento se apresentam levemente distintas ao olho do avaliador, mas muitas vezes divergem na análise por pixels; medida utilizada em *software* de imagem.

Protocolos experimentais são descritos utilizando o método de histograma na medicina humana e veterinária como tentativa de superar a barreira da subjetividade por uma técnica quantitativa [43,44,45]. A análise de histograma está disponível em muitos aparelhos ultrassonográficos comerciais, entretanto, sua aplicação tem sido restrita ao meio acadêmico, carecendo de padronização de valores para maior uso na prática [44].

Mesmo na tentativa de agregar subsídios metodológicos com uso da análise quantitativa, técnica do histograma, infelizmente esta não nos permitiu verificar diferenças estatísticas que fossem significantes como ocorreu na análise qualitativa. Os fatores sugestivos da ineficaz resposta na análise pela técnica do histograma em nossa metodologia são o tamanho da área selecionada (uma grande área fica mais sujeita ao dinamismo do exame e diferenças de pixels) e uma amostragem pequena para as correlações estatísticas realizadas entre seus distintos momentos.

Assim, nosso estudo não conseguiu demonstrar, quantitativamente, a eficiência do US em identificar transplantes de CTMs marcadas com nanocristal. Porém, qualitativamente, pode-se observar diferenças entre as imagens ultrassonográficas

obtidas dos transplantes de CTMs marcadas com nanocristal e não marcadas até 48h após o transplante. Permitindo desta forma o monitoramento do tecido muscular transplantado.

Desta forma, podemos concluir que o US contribuiu de maneira qualitativa com a identificação dos transplantes de CTMs marcadas com nanocristal no tecido muscular de equinos. Contudo, novos estudos utilizando o US neste contexto devem ser realizados. A importância do desenvolvimento desta metodologia de rastreabilidade celular se deve a necessidade de conhecer o comportamento migratório e tempo de permanência das CTMs marcadas com nanocristal no tecido muscular transplantado, contribuindo para o uso terapêutico seguro e eficaz das CTMs em enfermidades musculares de equinos.

Conclusões

O uso do US se mostrou capaz de contribuir no acompanhamento de transplantes de CTM-MO marcadas com nanocristal no tecido muscular de equinos imediatamente, 24 e 48h após o transplante das CTMs marcadas.

Interesses conflitantes

Os autores declaram não terem interesses conflitantes.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo apoio financeiro e à FMVZ – UNESP por ceder suas instalações e serviços para que este trabalho pudesse ser realizado. O órgão de financiamento não desempenhou nenhum papel no desenvolvimento do estudo, na coleta, análise e interpretação dos dados, na redação do manuscrito, ou na decisão de enviar o manuscrito para publicação.

Referências

1. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J: **Concise review: Mesenchymal stem cells: Their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing.** *Stem Cells* 2007, 25:2739-2749.
2. Nöth U, Rackwitz L, Steinert AF.: **Cell delivery therapeutics for musculoskeletal regeneration.** *Adv Drug Deliv Rev* 2010, 62:765-783.
3. Taylor SE, Smith RKW, Clegg PD: **Mesenchymal stem cell therapy in equine musculoskeletal disease: scientific fact or clinical fiction?** *Equine Vet J* 2007, 39:172–180.
4. Guest DJ, Smith MRW, Allen WR: **Monitoring the fate of autologous and allogeneic mesenchymal progenitor cells injected into the superficial digital flexor tendon of horse: preliminary study.** *Equine Vet J* 2008, 40:178-181.
5. Carrade DD, Owens SD, Galuppo LD, Vidal MA, Ferraro GL, Librach F, Buerchler S , Friedman MS, Walker NJ, Borjesson DL: **Clinicopathologic findings following intra-articular injection of autologous and allogeneic placentally derived equine mesenchymal stem cells in horses.** *Cytotherapy* 2011, 13:419-430.
6. Chen Y, Shao JZ, Xiang LX, Dong XJ, Zhang GR: **Mesenchymal stem cells: A promising candidate in regenerative medicine.** *Int J Biochem Cell Biol* 2008, 40:815–820.
7. Wu X, Tao R: **Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells.** *HBPD Int* 2012, 11:360-371.

8. Reed SA, Johnson SE: **Equine umbilical cord blood contains a population of stem cells that express Oct4 and differentiate into mesodermal and endodermal cell types.** *J Cell Physiol* 2008, **215**:329-336.
9. Gutierrez-Nibeyro SD: **Commercial cell-based therapies for musculoskeletal injuries in horses.** *Vet Clin North Am Equine Pract* 2011, **27**:363-371.
10. Sole A, Spriet M, Galuppo LD, Padgett KA, Borjesson DL, Wisner ER, Brosnan RJ, Vidal MA: **Scintigraphic evaluation of intra-arterial and intravenous regional limb perfusion of allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the normal equine distal limb using (99m) Tc-HMPAO.** *Equine Vet J* 2012, **44**:594-599.
11. Carvalho AM, Alves ALG, Golim MA, Moroz A, Hussni CA, Oliveira PGG, Deffune E: **Isolation and immunophenotypic characterization of mesenchymal stem cells derived from equine species adipose tissue.** *Vet Immunol Immunopathol* 2009, **132**:303-306.
12. Ranera B, Lyahyaia J, Romero A, Vázquez FJ, Remacha AR, Bernal ML, Zaragoza P, Rodellar C, Martín-Burriel I: **Immunophenotype and gene expression profiles of cell surface markers of mesenchymal stem cells derived from equine bone marrow and adipose tissue.** *Vet Immunol Immunopathol* 2011, **144**:147–154.
13. Lange-Consiglio A, Corradetti B, Meucci A, Perego R, Bizzaro D, Cremonesi F: **Characteristics of equine mesenchymal stem cells derived from amnion and bone marrow: *in vitro* proliferative and multilineage potential assessment.** *Equine Vet J* 2013, in press.
14. Toupadakis CA, Wong A, Genetos DC, Cheung WK, Borjesson DL, Ferraro GL, Galuppo LD, Leach JK, Owens SD, Yellowley CE: **Comparison of the**

- osteogenic potential of equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, umbilical cord blood, and umbilical cord tissue.** *Am J Vet Res* 2010, **71**:1237-1245.
15. Guest DJ, Ousey JC, Smith MRW: **Defining the expression of marker genes in equine mesenchymal stromal cells.** *Stem Cells Cloning* 2008, **1**:1-9.
 16. Pascuccia L, Curinab G, Mercatia F, Marinib C, Dall'Aglia C, Paternesi B, Ceccarelli P: **Flow cytometric characterization of culture expanded multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) from horse adipose tissue: Towards the definition of minimal stemness criteria.** *Vet Immunol Immunopathol* 2011, **144**:499– 506.
 17. De Schauwer C, Meyer E, Van de Walle GR, Soom AV: **Markers of stemness in equine mesenchymal stem cells: a plea for uniformity.** *Theriogenology* 2010, **75**:1431-1443.
 18. Borjesson DL, Peroni JF: **The regenerative medicine laboratory: facilitating stem cell therapy for equine disease.** *Clin Lab Med* 2011, **31**:109-123.
 19. Burk J, Badylak SF, Kelly J, Brehm W: **Equine cellular therapy – from stall to bench to bedside?** *Cytometry* 2013, **83**:103-113.
 20. Carrade DD, Lane MW, Kent MS, Clark KC, Walker NJ, Borjesson DL: **Comparative Analysis of the Immunomodulatory Properties of Equine Adult-Derived Mesenchymal Stem Cells.** *Cell Med* 2012, **4**(1):1–11.
 21. Ranera B, Ordovás L, Lyahyai J, Bernal ML, Fernandes F, Remacha AR, Romero A, Vázquez FJ, Osta R, Cons C, Varona L, Zaragoza P, Martín-Burriel I, Rodellar C: **Comparative study of equine bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells.** *Equine Vet J* 2012, **44**:33–42.

22. Hoynowski SM, Fry MM, Gardner BM, Leming MT, Tucker JR, Black L, Sand T, Mitchell KE. **Characterization and differentiation of equine umbilical cord-derived matrix cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 2007, **362**:347–353.
23. Lovati AB, Corradetti B, Lange-Consiglio A, Recordati C, Bonacina E, Bizzaro D, Cremonesi F: **Comparison of equine bone marrow-, umbilical cord matrix and amniotic fluid-derived progenitor cells.** *Vet Res Commun* 2011, **35**:103–121.
24. De Schauwer C, Piepers S, Van de Walle GR, Demeyere K, Hoogewijs MK, Govaere JLJ, Braeckmans K, Soom AV, Meyer E: **In Search for Cross-Reactivity to Immunophenotype Equine Mesenchymal Stromal Cells by Multicolor Flow Cytometry.** *Cytometry Part A* 2012, **81A**:312-323.
25. Wang S, Kan Q, Sun Y, Han R, Zhang G, Peng T, Jia: **Caveolin-1 regulates neural differentiation of rat bone mesenchymal stem cells into neurons by modulating Notch signaling.** *Int J Devl Neuroscience* 2013, **31**: 30-35.
26. Min-qing D, Yue-qin H, Nai-Sheng L, Gang S, Xiao-tong Z, Li-na W, Ping G: **Characterization and Differentiation into Adipocytes and Myocytes of Porcine Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells.** *Journal of Integrative Agriculture* 2014, **13**(4):837-848.
27. Brückner S, Tautenhahn HM, Winkler S, Stock P, Jonas S, Dollinger M, Christ B: **Isolation and Hepatocyte Differentiation of Mesenchymal Stem Cells From Porcine Bone Marrow—“Surgical Waste” as a Novel MSC Source.** *Transplantation Proceedings* 2013, **45**:2056-2058.
28. Troyer DL, Weiss ML: **Concise review: Wharton’s jelly-derived cells are a primitive stromal cell population.** *Stem Cells* 2008, **26**:591-599.

29. Burk J, Ribitsch I, Gittel C, Juelke H, Kasper C, Staszyk C, Brehm W: **Growth and differentiation characteristics of equine mesenchymal stromal cells derived from different sources.** *Vet J* 2013, **195**:98–106.
30. Richardson LE, Dudhia J, Clegg PD, Smith R: **Stem cells in veterinary medicine – attempts at regenerating equine tendon after injury.** *Trends Biotechnol* 2007, **25**:409-416.
31. Bydlowski SP, Debes AA, Maselli LMF, Janz FL: **Características biológicas das células-tronco mesenquimais.** *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 2009, **31**:25-35.
32. Dabbousi BO, Rodriguez JV, Mikulec FV, Heine JR, Mattoussi H, Ober R: **(CdSe)ZnS core-shell quantum dots: synthesis and characterization of a size series of highly luminescent nanocrystallites.** *J Phys Chem B* 1997,**46**: 9463–9475.
33. Bruchez MJR, Moronne M, Gin P, Weiss S, Alivisatos AP: **Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels.** *Science* 1998, **281**:2013–2016.
34. Hardman RA: **toxicologic review of quantum dots: toxicity depends on physicochemical and environmental factors.** *Environmental Health Perspectives* 2006, **114**.
35. Chan WCW, Maxwell DJ, Gao X, Bailey RE, Han M, Nie S: **Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging.** *Curr Opin Biotechnol* 2002, **13**:40–46.
36. Alivisatos P. **The use of nanocrystals in biological detection.** *Nat Biotechnol* 2004, **22**:47–52.
37. Michalet X, Pinaud FF, Bentolila LA, Tsay JM, Doose S, Li JJ, Sundaresan G, WU AM, Gambhir SS, Weiss S. **Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics.** *Science* 2005, **5709**: 538-44.
38. Lin S, Xie X, Patel M R, Yang YH, Li Z, Cao F, Gheysens O, Zhang Y, Gambhir SS, Rao JH, Wu JC. **Quantum dot imaging for embryonic stem cells.** *BMC Biotechnol* 2007, **7**.
39. Shashkov E, Everts M, Galanzha E, Zharov V: **Quantum dots as multimodal photoacoustic and photothermal contrast agents.** *Nano Lett* 2008, **8**:3953–8.

40. Barreira APB, Bacellar DTL, Kiffer RG, Alves ALG: **Punção aspirativa de medula óssea em equinos adultos para obtenção de células-tronco.** *R. bras. Ci. Vet.* 2008, **15**:56-59.
41. Donaldson K, Stone V, Tran CL, Kreyling W, Borm PJA. **Nanotoxicology.** *Journal of Occupational and Environmental Medicine* 2004, **61**:727-728.
42. Garon, E. B. et al. **Quantum dot labeling and tracking of human leukemic, bone marrow and cord blood cells.** *Leukemia Research* 2007, **31**:643-651.
43. Maeda K, Utsu M, Kihale PE: **Quantification of sonographic echogenicity with grey-level histogram width: a clinical tissue characterization.** *Ultrasound in Medicine & Biology* 1998, **24**:225-234.
44. Nyland TG, Mattoon JS, Herrgesell EJ, Wisner ER Fígado. In: Nyland TG & Mattoon (Eds.) JS. **Ultra-som Diagnóstico em Pequenos Animais.** 2. ed. São Paulo, Roca. p.95-127, 2004.
45. Nicoll RG, Jackson MW, Knipp BS, Zagzebski JA, Steinberg H, O'Brien RT: **Quantitative ultrasonography of the liver in cats during obesity induction and dietary restriction.** *Research in Veterinary Science* 1998, **64**:1-6.
46. Carvalho AM, Yamaha ALM, Golim MA, Álvarez LEC, Hussni CA, Alves ALG: **Evaluation of mesenchymal stem cell migration after equine therapy.** *Equine Vet J* 2014, **46**:635-638.
47. Oliveira PGG, Carvalho AM, Yamada ALM, Maia L, Freitas NPP, Watanabe, Landim-Alvarenga FC, Alves ALG: **Avaliação da migração das células progenitoras após terapia da tendinite equina.** *Arq. Bras. Med. Zootec.* 2014, **66**:1133-1138.

Figuras

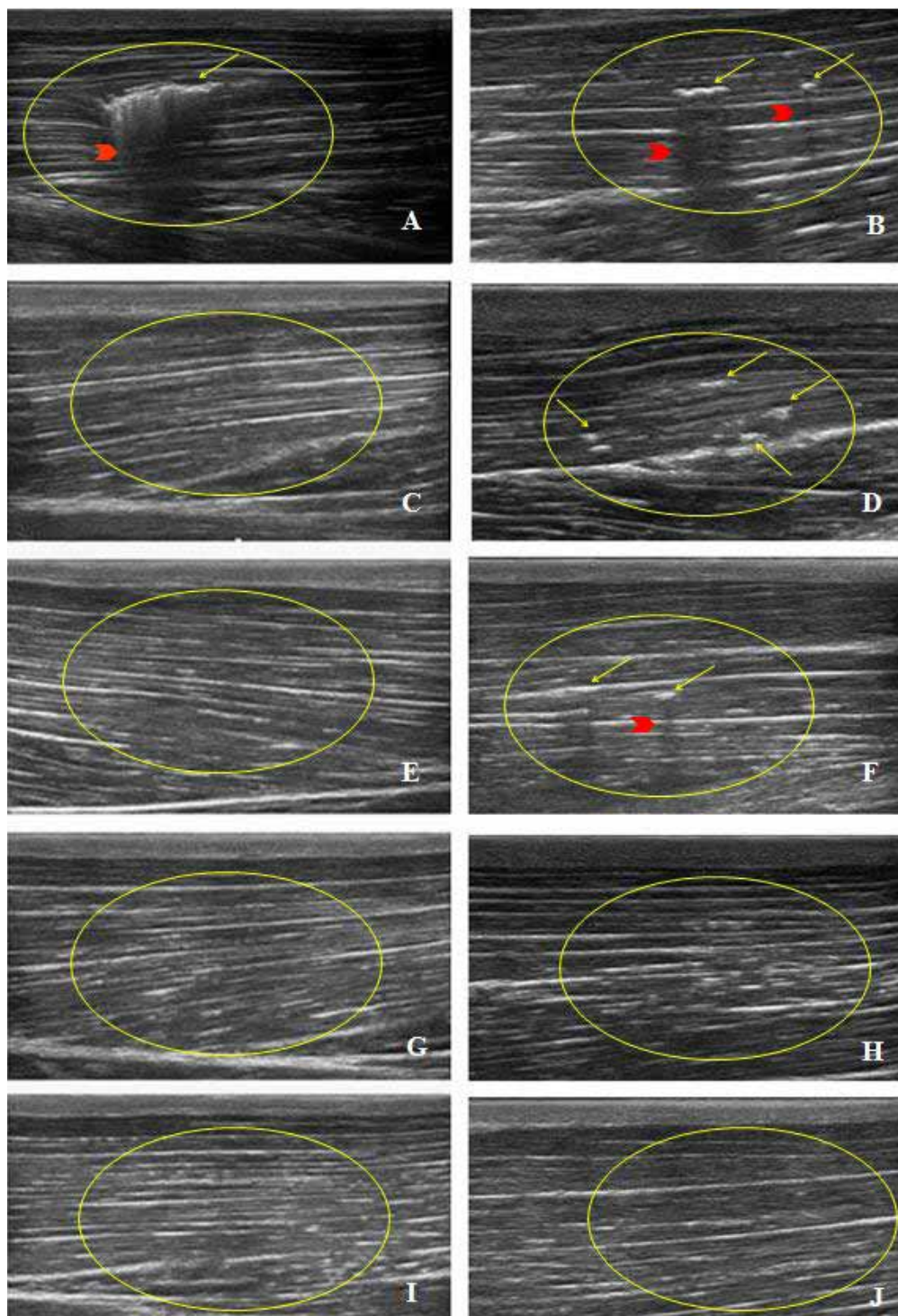


Figura 1- Características ultrassonográficas do tecido muscular do músculo *brachiocephalicus* equino na região do transplante de CTM-MO não marcadas com o nanocristal Qtracker® 655 (A, C, E, F, G, I) e marcadas (B, D, F, H, J) em M0 (A, B), M24, (C, D), M48 (E, F), M72 (G, H) e M96 (I, J). *Região do transplante (elipse amarela), foco hiperecótico ou conteúdos focais ecogênicos (seta amarela), efeito de reverberação e moderada sombra acústica (indicador vermelho).

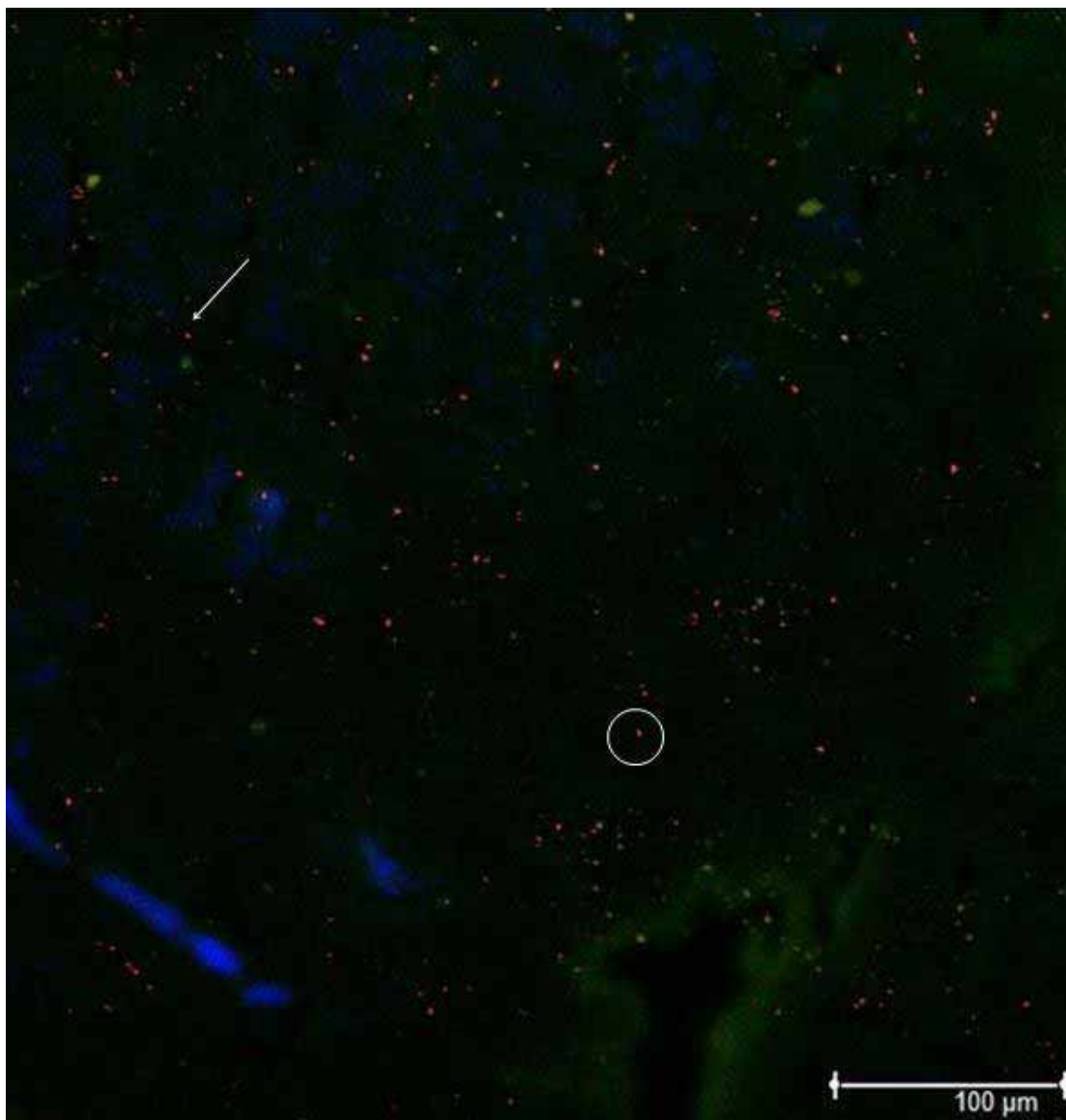


Figura 2 - Imagem de imunofluorescência pela microscopia confocal (100x) do corte do tecido muscular do músculo *brachiocephalicus* de um equino biopsiado na região do transplante de CTM-MO marcadas com o nanocristal Qtracker® 655 após 24 horas o transplante (M24). * Círculo branco destacando o nanocristal Qtracker® 655 (pontos com marcação vermelha), o tecido muscular do músculo *brachiocephalicus* (marcação em verde), os núcleos (marcação em azul pelo DAPI), seta branca (dupla marcação DAPI e nanocristal Qtracker® 655).

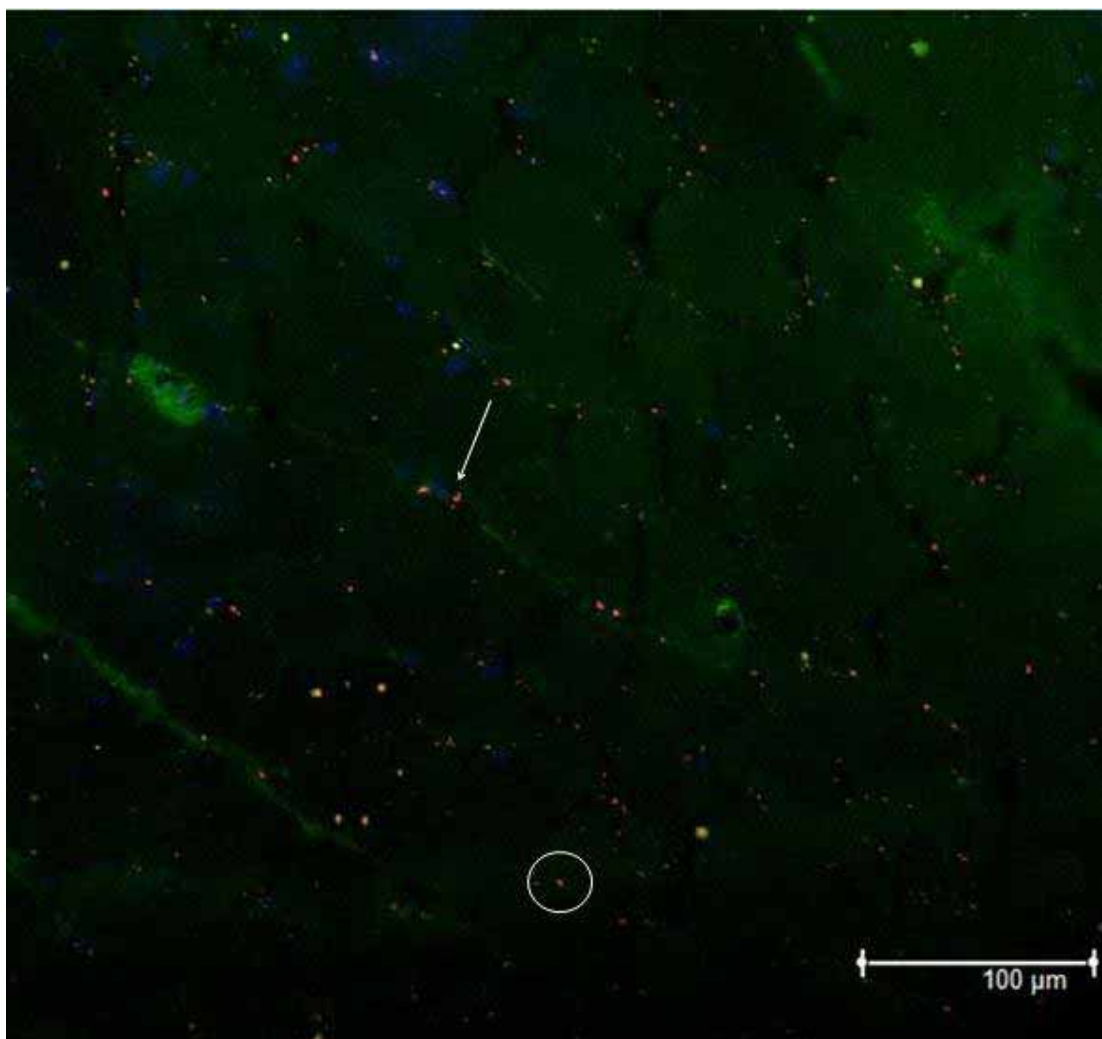


Figura 3 - Imagem de imunofluorescência pela microscopia confocal (100x) do corte do tecido muscular do músculo *brachiocephalicus* de um equino biopsiado na região do transplante de CTM-MO marcadas com o nanocristal Qtracker® 655 após 48 horas o transplante (M48).* Círculo branco destacando o nanocristal Qtracker® 655 (pontos com marcação vermelha), o tecido muscular do músculo *brachiocephalicus* (marcação em verde), os núcleos (marcação em azul pelo DAPI), seta branca (dupla marcação DAPI e nanocristal Qtracker® 655).

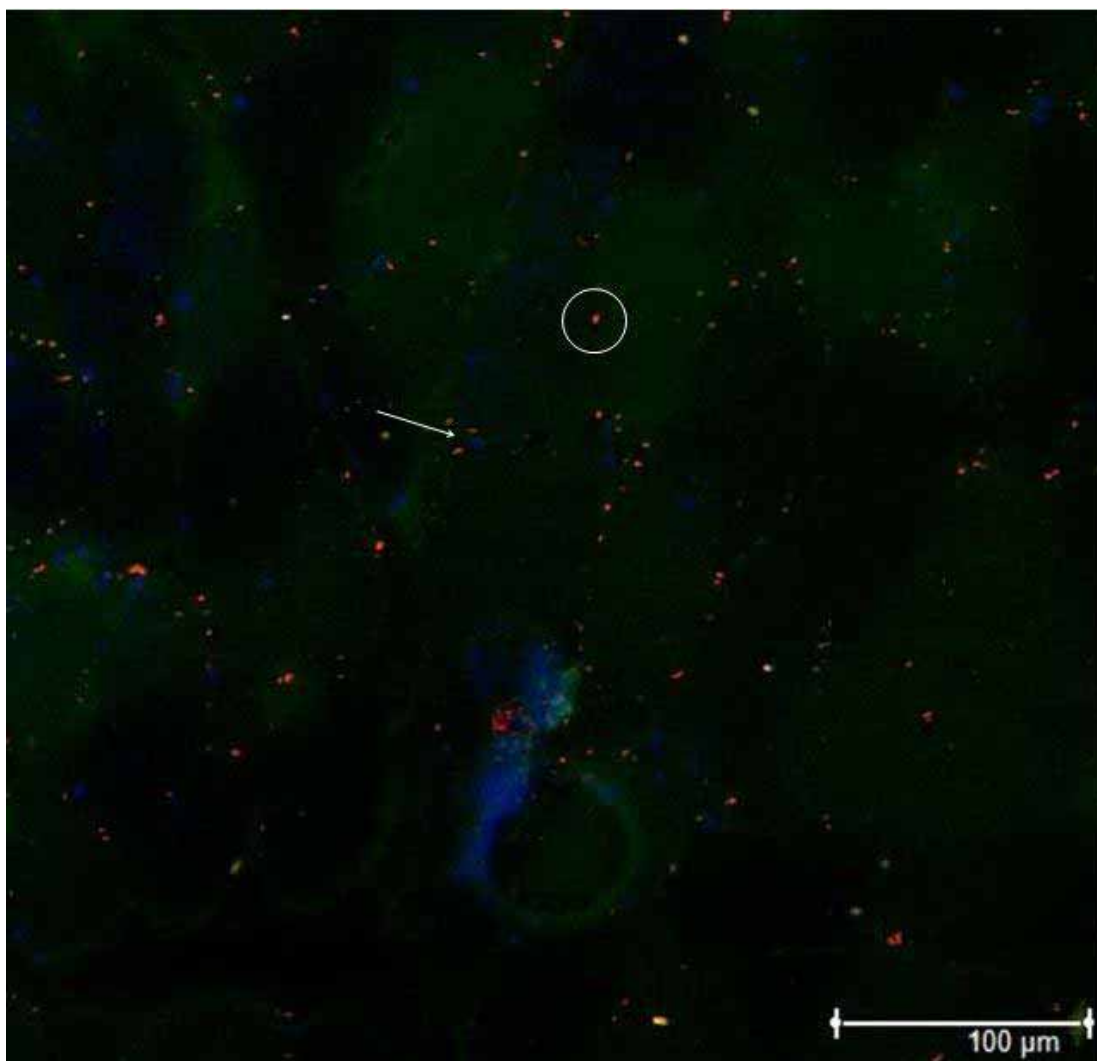


Figura 4 - Imagem de imunofluorescência pela microscopia confocal (100x) do corte do tecido muscular do músculo *brachiocephalicus* de um equino biopsiado na região do transplante de CTM-MO marcadas com o nanocristal Qtracker® 655 após 72 horas o transplante (M72). * Círculo branco destacando o nanocristal Qtracker® 655 (pontos com marcação vermelha), o tecido muscular do músculo *brachiocephalicus* (marcação em verde), os núcleos (marcação em azul pelo DAPI), seta branca (dupla marcação DAPI e nanocristal Qtracker® 655).

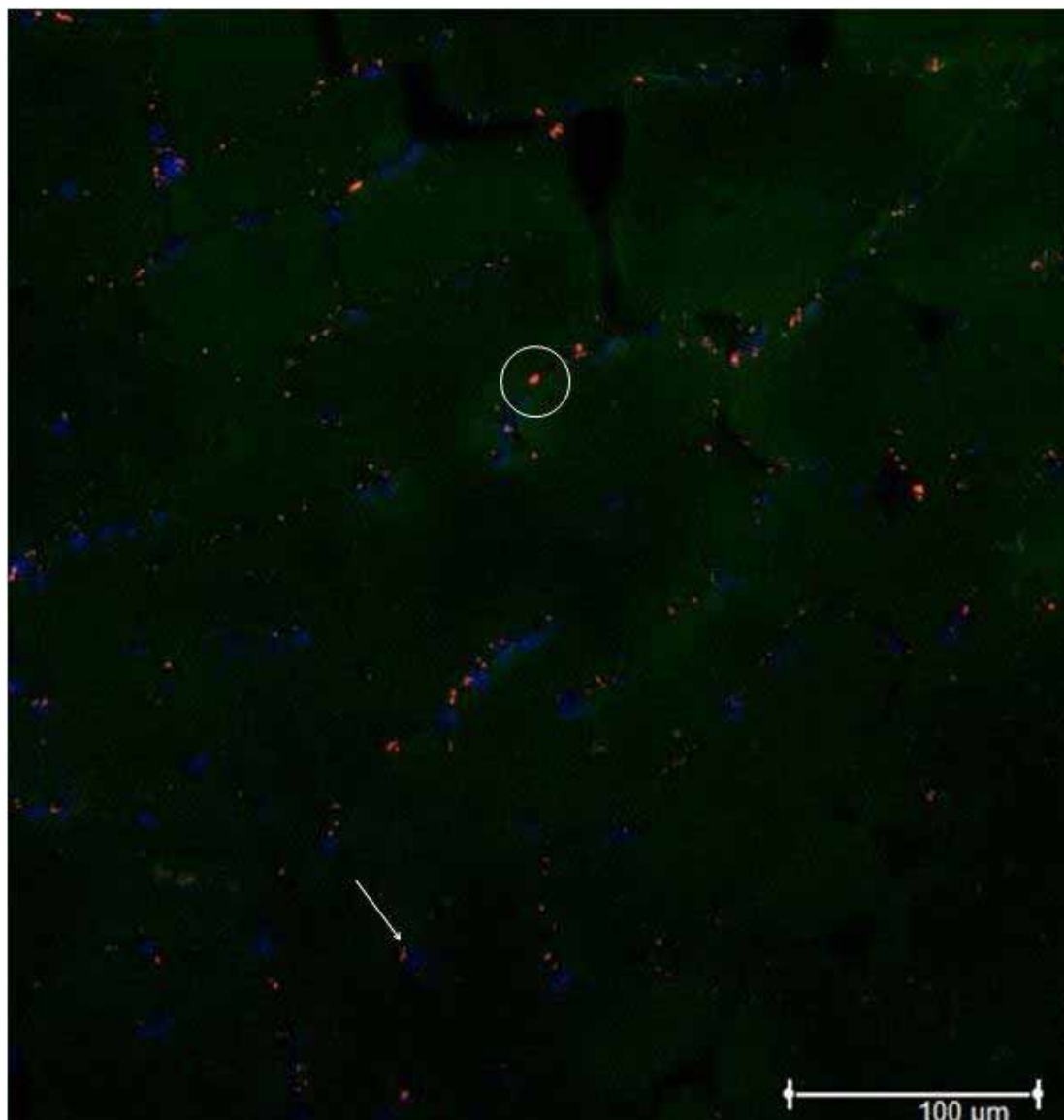


Figura 5 - Imagem de imunofluorescência pela microscopia confocal (100x) do corte do tecido muscular do músculo *brachiocephalicus* de um equino biopsiado na região do transplante de CTM-MO marcadas com o nanocristal Qtracker® 655 após 96 horas o transplante (M96). * Círculo branco destacando o nanocristal Qtracker® 655 (pontos com marcação vermelha), o tecido muscular do músculo *brachiocephalicus* (marcação em verde), os núcleos (marcação em azul pelo DAPI), seta branca (dupla marcação DAPI e nanocristal Qtracker® 655).

TABELAS

Tabela 1. Dados descritivos das variáveis NMOST/NALL, LMEAN e SD e suas associações resultantes da análise pela técnica do histograma das imagens de ultrassom do músculo *brachiocephalicus* de 12 equinos

Transplante	Momento (h)	LMEANm	LMEANdp	LMEANep	Valor - P	NMOST/NALL (%)md	NMOST/NALL (%)ep	Valor - P	SDm	SDdp	SDep	Valor - P
CTM-MO +	0	73,37	17,63	5,09	1,00	5,39	0,38		35,27	3,79	1,09	
CTM-MO -	0	70,61	21,81	6,30		5,30	0,42	0,96	35,27	6,27	1,81	1,00
CTM-MO +	24	72,56	21,81	6,30	0,99	5,33	0,55		33,69	5,81	1,68	
CTM-MO -	24	77,55	13,94	4,02		5,59	0,21	0,61	34,75	7,04	2,03	1,00
CTM-MO +	48	77,47	18,03	5,21	1,00	5,46	0,47		35,68	5,14	1,48	
CTM-MO -	48	76,79	11,75	3,39		5,24	0,26	0,51	38,76	6,52	1,88	0,99
CTM-MO +	72	74,38	29,31	8,46	1,00	5,69	1,93		37,84	8,93	2,58	
CTM-MO -	72	78,36	27,73	8,00		5,77	0,36	0,32	38,30	10,73	3,10	1,00
CTM-MO +	96	73,28	27,93	8,06	1,00	5,50	2,25		35,28	9,76	2,82	
CTM-MO -	96	75,31	23,63	6,82		5,12	0,89	0,45	36,71	8,80	2,54	1,00

*CTM-MO +: Células tronco mesenquimais de medula óssea marcadas com nanocrystal Qtracker 655®, CTM-MO -: Células tronco mesenquimais de medula óssea não marcadas com nanocrystal Qtracker 655®, LMEANm: média da medida quantitativa referente à ecogenicidade da região avaliada; LMEANdp: desvio padrão da medida quantitativa referente à ecogenicidade da região avaliada; LMEANep: erro padrão da medida quantitativa referente à ecogenicidade da região avaliada; NMOST/NALL(%)md: mediana da medida quantitativa referente à ecotextura da região avaliada; NMOST/NALL(%)ep: erro padrão da medida quantitativa referente à ecotextura da região avaliada; SDm: média do desvio padrão da amplitude do eco; SDdp: desvio padrão da amplitude do eco; SDep: erro padrão da média do desvio padrão da amplitude do eco.

CAPÍTULO 3

CONCLUSÕES GERAIS

Dentre as condições experimentais descritas pode-se concluir que:

- O US foi eficaz, qualitativamente, no acompanhamento de transplantes CTM-MO marcadas com nanocristal imediatamente, 24 e 48h após o transplante das CTMs marcadas.
- Os transplantes de CTMs marcadas com nanocristal permaneceram no local transplantado por até 96h.

BIBLIOGRAFIA

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

ALIVISATOS, P. The use of nanocrystals in biological detection. *Nat Biotechnol*, n. 22, p. 47–52, 2004.

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

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

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

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

BROOKE, G.; COOK, M.; BLAIR, C.; HAN, R.; HEAZLEWOOD, C.; JONES, B.; KAMBOURIS, M.; KOLLAR, K.; MCTAGGART, S.; PELEKANOS, R.; RICE, A.; ROSSETTI, T.; ATKINSON. Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells. *Semin Cell Dev Biol.*, v. 18, n. 6, p. 846–858, 2007.

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

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

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

BRUCHEZ, M. JR.; MORONNE, M.; GIN, P.; WEISS, S., ALIVISATOS, A. P. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science*, n. 5385, v. 281, p. 2013–2016, 1998.

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

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

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

CASTRO, V. F.; QUEIROZ, A. A. Pontos quânticos magneto ativos: uma nova fronteira para a medicina terapêutica e diagnóstica. *Revista Brasileira de Física Médica*, v. 4, n. 3, 2011.

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

CHAN, W. C. W.; MAXWELL, D. J.; GAO, X.; BAILEY, R. E; HAN, M.; NIE, S. Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging. *Curr Opin Biotechnol*, v. 1, n. 13, p. 40–46, 2002.

CHEN, F. H.; SONG L.; MAUCK R.L.; WAN-JU L.; TUAN R.S. Mesenchymal Stem Cells. In: LANZA R.; LANGER R.; VACANTI J. *Principles of Tissue Engineering*. 3. ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2007. chap. 55, p. 823-843.

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

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

COLLEONI S.; BOTTANI E.; TESSARO I.; MARI G.; MERLO B.; ROMAGNOLI N.; SPADARI A.; GALLI C.; LAZZARI G. Isolation, growth and differentiation of equine mesenchymal stem cells: effect of donor, source, amount of tissue and supplementation with basic fibroblast growth factor. *Veterinary Research Communications*, v.33, p. 811-821, 2009.

DABBOUSI, B.O.; RODRIGUEZ, J. V.; MIKULEC, F. V.; HEINE, J. R.; MATTOUSSI, H.; OBER, R.; et al. (CdSe)ZnS core-shell quantum dots: synthesis and

characterization of a size series of highly luminescent nanocrystallites. *J Phys Chem B*, v.46, n. 101, p. 9463–9475, 1997.

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

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

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

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

GARVICAN, E. R.; DUDHIA, J.; ALVES, A. L.; CLEMENTS, L. E.; DU PLESSIS, F.; SMITH, R. K.W. Mesenchymal stem cells modulate release of matrix proteins from tendon surfaces *in vitro*: a potential beneficial therapeutic effect. *Regen. Med.*, v.3, n.9, p. 295-308, 2014.

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

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

HARDMAN, R. A toxicologic review of quantum dots: toxicity depends on physicochemical and environmental factors. *Environmental Health Perspectives*, v. 114, n. 2, Feb. 2006.

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

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

KOCH, T.G.; BERG, L.C.; BETTS, D.H. Current and future regenerative medicine- Principles, concepts and therapeutic use of stem cell therapy and tissue engineering in equine medicine. *Can. Vet. J.*, n. 50, p. 155-165, 2009.

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

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

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

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

LIN, S.; XIE, X.; PATEL, M. R.; YANG, Y. H.; LI, Z.; CAO, F.; GHEYSENS, O.; ZHANG, Y.; GAMBHIR, S. S.; RAO, J. H.; WU, J. C. Quantum dot imaging for embryonic stem cells. *BMC Biotechnol*, v.7, n.67, 2007.

MAIA, L.; LANDIM-ALVARENGA F.C.; GOLIM, M.A.; SUDANO, M.J.; TAFFAREL, M.O.; DE VITA, B.; FREITAS, N.P.P.; AMORIM, R.M. Potencial de transdiferenciação neural das células-tronco mesenquimais da medula óssea de equino. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.32, n.5, p. 444-452, 2012.

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

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

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

MICHALET, X.; PINAUD, F. F.; BENTOLILA, L. A.; TSAY, J. M.; DOOSE, S.; LI, J. J.; SUNDARESAN, G.; WU, A. M.; GAMBHIR, S. S.; WEISS, S. Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *Science*, v. 307, n. 5709, p. 538-44, 2005.

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

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

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

RANERA B.; ORDOVÁS L.; LYAHYAI J.; BERNAL M.L.; FERNANDES F.; REMACHA A.R.; ROMERO A.; VÁZQUEZ F.J.; OSTA R.; CONS C.; VARONA L.; ZARAGOZA P.; MARTÍN-BURRIEL I.; RODELLAR C. Comparative study of equine bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Equine Veterinary Journal*, v. 44, n.1, p.33-42, 2012.

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

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

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

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

SENSEBÉ, L. Generation and characterization of mesenchymal stromal cells for clinical application. *ISBT Science Series*, n. 4, p. 31-6, 2009.

SHASHKOV, E.; EVERTS, M.; GALANZHA, E.; ZHAROV, V. Quantum dots as multimodal photoacoustic and photothermal contrast agents. *Nano Lett*, v. 11, n. 8, p.3953–8, 2008.

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

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

SUMMER, R.; FINE, A.; Mesenchymal progenitor cell research: limitations and recommendations. *Proc Am Thorac Soc*, v. 6, n.5, p. 707-10, 2008.

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

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

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

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

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

YONG, K. T.; QIAN, J.; ROY, I.; LEE, H. H.; BERGEY, E. J.; TRAMPOSCH, K. M.; et al. Quantum Rod bioconjugates as targeted probes for confocal and two-photon fluorescence imaging of cancer cells. *Nano Lett*, v. 3, n.7, p. 761–5, 2007.

ANEXOS

Anexo 1

Figuras



Figura 6 - Local preparado para o transplante de CTM-MO não marcadas no músculo *brachiocephalicus* de um equino.



Figura 7 - Transplante de CTM-MO marcadas no músculo *brachiocephalicus* de um equino guiado pela ultrassonografia.

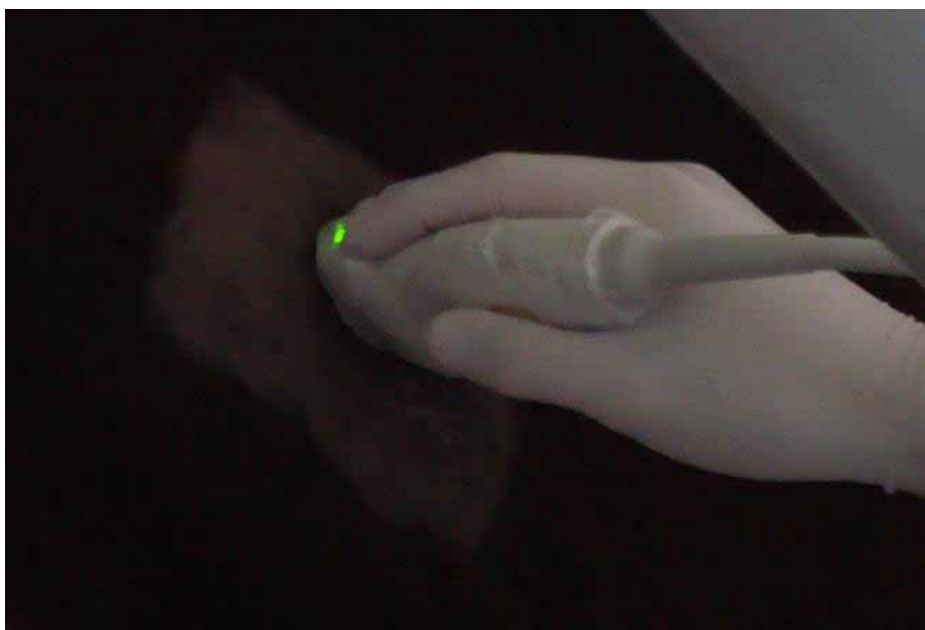


Figura 8 - Exame ultrassonográfico no músculo *brachiocephalicus* de um equino após transplante de CTM-MO marcadas com o nanocristal Qtracker® 655.

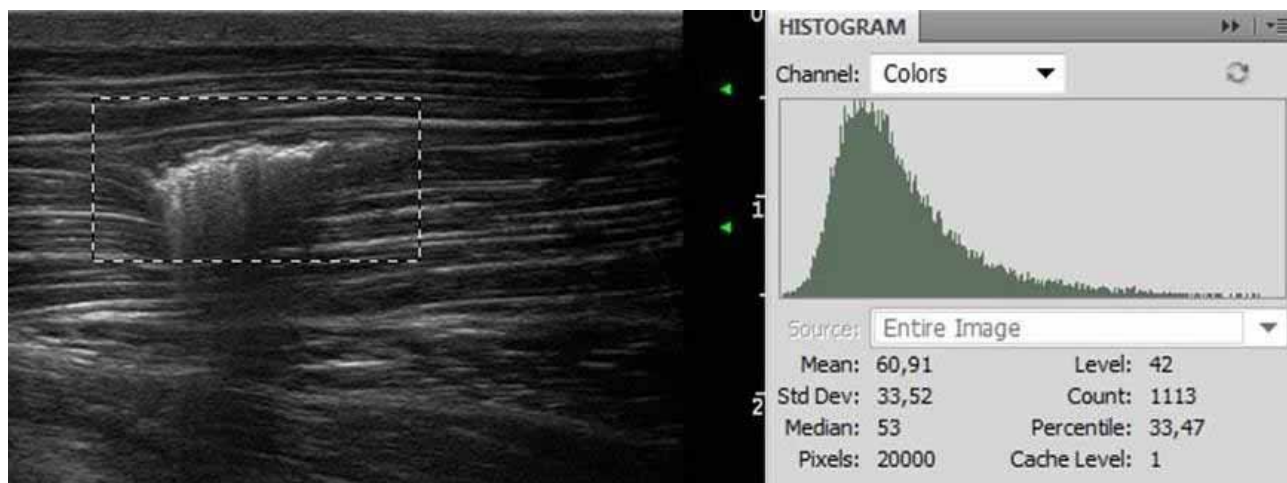


Figura 9 - Análise da imagem ultrassonográfica realizada no músculo *brachiocephalicus* de um equino após transplante de CTM-MO não marcadas com o nanocristal Qtracker® 655 pela técnica do histograma no software Photoshop CS4®.



Figura 10 - Biópsia muscular no local do transplante das CTM-MO marcadas com o nanocristal Qtracker® 655 no músculo *brachiocephalicus* direto de um equino; A: Introdução do punch; B: Retirada do punch com o fragmento de tecido muscular.

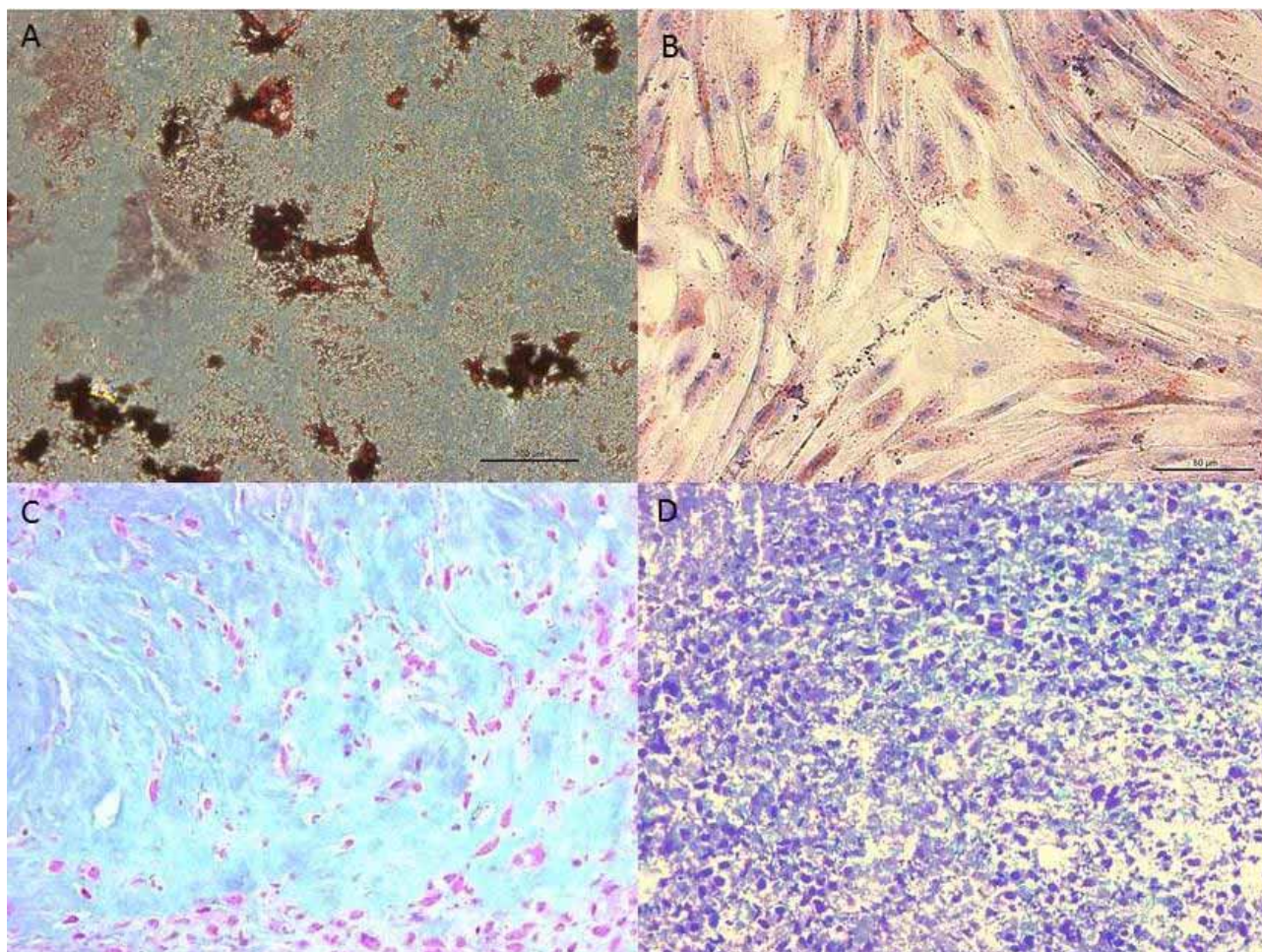


Figura 11 - Diferenciações osteogênica (A), adipogênica (B) e condrogênica (C e D) das CTM-MO provenientes de um equino eleito doador.

Anexo 2

Tabelas

Tabela 2. Valores P resultantes de comparações mistas pareadas para LMEAN entre os momentos resultantes da análise pela técnica do histograma

	TRANSPLANTE NÃO MARCADO			TRANSPLANTE MARCADO		
	LMEAN			LMEAN		
	Momento A	Momento B	Valor P	Momento A	Momento B	Valor P
US	0	24	1,00	0	24	1,00
	0	48	1,00	0	48	1,00
	0	72	1,00	0	72	1,00
	0	96	1,00	0	96	1,00
	24	48	1,00	24	48	1,00
	24	72	1,00	24	72	1,00
	24	96	1,00	24	96	1,00
	48	72	1,00	48	72	1,00
	48	96	1,00	48	96	1,00
	72	96	1,00	72	96	1,00

*LMEAN: medida quantitativa referente à ecogenicidade da região avaliada; US: Ultrassom; Momento A: momento em horas a ser comparado com o Momento B; Momento B: momento em horas a ser comparado com o momento A.

Tabela 3. Valores P resultantes de comparações múltiplas pareadas para NMOST/NALL (%) entre os momentos resultantes da análise pela técnica do histograma

	TRANSPLANTE NÃO MARCADO			TRANSPLANTE MARCADO		
	NMOST/NALL (%)			NMOST/NALL (%)		
	Momento A	Momento B	Valor P	Momento A	Momento B	Valor P
US	0	24	0,89	0	24	0,30
	0	48	0,91	0	48	0,84
	0	72	0,97	0	72	0,75
	0	96	0,52	0	96	0,34
	24	48	0,97	24	48	0,85
	24	72	0,35	24	72	0,85
	24	96	0,47	24	96	0,91
	48	72	0,37	48	72	0,31
	48	96	0,58	48	96	0,23
	72	96	0,20	72	96	0,42

*NMOST/NALL: medida quantitativa referente à ecotextura da região avaliada; US: Ultrassom; Momento A: momento em horas a ser comparado com o Momento B; Momento B: momento em horas a ser comparado com o momento A.

Tabela 4. Valores P resultantes de comparações mistas pareadas para SD entre os momentos resultantes da análise pela técnica do histograma

	TRANSPLANTE NÃO MARCADO			TRANSPLANTE MARCADO		
	SD			SD		
	Momento A	Momento B	Valor P	Momento A	Momento B	Valor P
US	0	24	1,00	0	24	1,00
	0	48	1,00	0	48	1,00
	0	72	1,00	0	72	1,00
	0	96	1,00	0	96	1,00
	24	48	1,00	24	48	1,00
	24	72	1,00	24	72	0,99
	24	96	1,00	24	96	1,00
	48	72	1,00	48	72	1,00
	48	96	1,00	48	96	1,00
	72	96	1,00	72	96	1,00

*SD: desvio padrão da amplitude do eco; US: Ultrassom; Momento A: momento em horas a ser comparado com o Momento B; Momento B: momento em horas a ser comparado com o momento A.

Anexo 3

Normas de publicação da Revista *Stem Cells International*.

Submission

Manuscripts should be submitted by one of the authors of the manuscript through the online Manuscript Tracking System. Regardless of the source of the word-processing tool, only electronic PDF (.pdf) or Word (.doc, .docx, .rtf) files can be submitted through the MTS. There is no page limit. Only online submissions are accepted to facilitate rapid publication and minimize administrative costs. Submissions by anyone other than one of the authors will not be accepted. The submitting author takes responsibility for the paper during submission and peer review. If for some technical reason submission through the MTS is not possible, the author can contact sci@hindawi.com for support.

Terms of Submission

Papers must be submitted on the understanding that they have not been published elsewhere and are not currently under consideration by another journal published by Hindawi or any other publisher. The submitting author is responsible for ensuring that the article's publication has been approved by all the other coauthors. It is also the authors' responsibility to ensure that the articles emanating from a particular institution are submitted with the approval of the necessary institution. Only an acknowledgment from the editorial office officially establishes the date of receipt. Further correspondence and proofs will be sent to the author(s) before publication unless otherwise indicated. It is a condition of submission of a paper that the authors permit editing of the paper for readability. All enquiries concerning the publication of accepted papers should be addressed to sci@hindawi.com.

Peer Review

All manuscripts are subject to peer review and are expected to meet standards of academic excellence. Submissions will be considered by an editor and “if not rejected right away” by peer-reviewers, whose identities will remain anonymous to the authors.

Concurrent Submissions

In order to ensure sufficient diversity within the authorship of the journal, authors will be limited to having two manuscripts under review at any point in time. If an author already has two manuscripts under review in the journal, he or she will need to wait until the review process of at least one of these manuscripts is complete before submitting another manuscript for consideration. This policy does not apply to Editorials or other non-peer reviewed manuscript types.

Article Processing Charges

Stem Cells International is an open access journal. Open access charges allow publishers to make the published material available for free to all interested

online visitors. For more details about the article processing charges of Stem Cells International, please visit the Article Processing Charges information page.

Units of Measurement

Units of measurement should be presented simply and concisely using System International (SI) units.

Title and Authorship Information

The following information should be included:

Paper title

Full author names

Full institutional mailing addresses

Email addresses

Abstract

The manuscript should contain an abstract. The abstract should be self-contained and citation-free and should not exceed 200 words.

Introduction

This section should be succinct, with no subheadings.

Materials and Methods

This part should contain sufficient detail so that all procedures can be repeated. It can be divided into subsections if several methods are described.

Results and Discussion

This section may each be divided by subheadings or may be combined.

Conclusions

This should clearly explain the main conclusions of the work highlighting its importance and relevance.

Acknowledgments

All acknowledgments (if any) should be included at the very end of the paper before the references and may include supporting grants, presentations, and so forth.

References

Authors are responsible for ensuring that the information in each reference is complete and accurate. All references must be numbered consecutively and citations of references in text should be identified using numbers in square brackets (e.g., “as discussed by Smith [9]”; “as discussed elsewhere [9, 10]”). All references should be cited within the text; otherwise, these references will be automatically removed.

Preparation of Figures

Upon submission of an article, authors are supposed to include all figures and tables in the PDF file of the manuscript. Figures and tables should not be submitted in separate files. If the article is accepted, authors will be asked to provide the source files of the figures. Each figure should be supplied in a separate electronic file. All figures should be cited in the paper in a consecutive order. Figures should be supplied in either vector art formats (Illustrator, EPS, WMF, FreeHand, CorelDraw, PowerPoint, Excel, etc.) or bitmap formats (Photoshop, TIFF, GIF, JPEG, etc.). Bitmap images should be of 300 dpi resolution at least unless the resolution is intentionally set to a lower level for scientific reasons. If a bitmap image has labels, the image and labels should be embedded in separate layers.

Preparation of Tables

Tables should be cited consecutively in the text. Every table must have a descriptive title and if numerical measurements are given, the units should be included in the column heading. Vertical rules should not be used.

Proofs

Corrected proofs must be returned to the publisher within 2-3 days of receipt. The publisher will do everything possible to ensure prompt publication. It will therefore be appreciated if the manuscripts and figures conform from the outset to the style of the journal.

Copyright

Open Access authors retain the copyrights of their papers, and all open access articles are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided that the original work is properly cited.

The use of general descriptive names, trade names, trademarks, and so forth in this publication, even if not specifically identified, does not imply that these names are not protected by the relevant laws and regulations.

While the advice and information in this journal are believed to be true and accurate on the date of its going to press, neither the authors, the editors, nor the publisher can accept any legal responsibility for any errors or omissions that may be made. The publisher makes no warranty, express or implied, with respect to the material contained herein.

Disclosure Policy

A competing interest exists when professional judgment concerning the validity of research is influenced by a secondary interest, such as financial gain.

We require that our authors reveal any possible conflict of interests in their submitted manuscripts.

If there is no conflict of interests, authors should state that “The author(s) declare(s) that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.”

Clinical Study

When publishing clinical studies, Hindawi aims to comply with the recommendations of the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) on trials registration. Therefore, authors are requested to register the clinical trial presented in the manuscript in a public trials registry and include the trial registration number at the end of the abstract. Trials initiated after July 1, 2005 must be registered prospectively before patient recruitment has begun. For trials initiated before July 1, 2005, the trial must be registered before submission.

Ethical Guidelines

In any studies that involve experiments on human or animal subjects, the following ethical guidelines must be observed. For any human experiments, all work must be conducted in accordance with the Declaration of Helsinki (1964). Papers describing experimental work on human subjects who carry a risk of harm must include a statement that the experiment was conducted with the understanding and the consent of the human subject, as well as a statement that the responsible Ethical Committee has approved the experiments. In the case of any animal experiments, the authors should provide a full description of any anesthetic and surgical procedure used, as well as evidence that all possible steps were taken to avoid animal suffering at each stage of the experiment.