

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**TRANSPLANTE INTRATECAL DE CÉLULAS ESTROMAIS
MESENQUIMAIS MULTIPOTENTES EM EQUINOS ATRAVÉS DO
ESPAÇO INTERVERTEBRAL C1-C2**

DIANA LEOCATA DE QUEIROZ

BOTUCATU, SÃO PAULO
NOVEMBRO, 2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**TRANSPLANTE INTRATECAL DE CÉLULAS ESTROMAIS
MESENQUIMAIS MULTIPOTENTES EM EQUINOS ATRAVÉS DO
ESPAÇO INTERVERTEBRAL C1-C2**

DIANA LEOCATA DE QUEIROZ

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

Orientador: Prof. Ass. Dr. Rogério Martins Amorim
Co-orientadora: Profa. Ass. Dra. Ana Liz Garcia Alves

BOTUCATU, SÃO PAULO
NOVEMBRO, 2017

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

Queiroz, Diana Leocata.

Transplante intratecal de células estromais mesenquimais multipotentes em equinos através do espaço intervertebral C1-C2 / Diana Leocata Queiroz. - Botucatu, 2017

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

Orientador: Rogério Martins Amorim

Coorientador: Ana Liz Garcia Alves

Capes: 50501062

1. Equino. 2. Células mesenquimais estromais. 3. Terapia celular. 4. Ceruloplasmina. 5. Haptoglobinas. 6. Transferrina.

Palavras-chave: Ceruloplasmina; Espaço subaracnoideo; Haptoglobina; Terapia celular; Transferrina.

Nome do Autor: Diana Leocata de Queiroz

Título: TRANSPLANTE INTRATECAL DE CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS MULTIPOTENTES EM EQUINOS ATRAVÉS O ESPAÇO INTERVERTEBRAL C1-C2

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Ass. Dr. Rogério Martins Amorim

Presidente e Orientador

Departamento de clínica Veterinária

FMVZ - UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Rui Seabra Ferreira Junior

Membro

Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos

CEVAP – Botucatu

Profa. Dra. Fernanda da Cruz Landim

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Data da defesa: 27 de novembro de 2017

A Teacher Rita, exemplo de mulher, professora e profissional, uma verdadeira guerreira que nunca perde a sua fé. Me ensinou muito mais do que está escrito nos livros de inglês.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Rogério Martins Amorim, por ter aceitado me orientar no mestrado, pelos conselhos, diálogos, incentivos, atenção, paciência e confiança, sem o qual não seria possível a realização desse trabalho.

A Profa. Dra. Ana Liz Garcia Alves, exemplo de profissional e mulher, pessoa pela qual tenho um carinho muito grande, sem a qual a minha qualificação não seria possível.

A Profa. Fabiana Ferreira de Souza, pela prontidão em me ajudar com as eletroforeses, por disponibilizar o laboratório e me auxiliar em todos os momentos que tive dúvidas.

Ao Prof. Paulo Ramos, por permitir a realização das leituras e pela prontidão em sanar as minhas dúvidas em relação a leitura da eletroforese.

Aos Professores Alexandre Secorun Borges, Regina Kiomi Takahira, pela participação e considerações no exame de qualificação. E aos professores Rui Seabra e Fernanda Landim pela participação e considerações na defesa.

Aos meus colegas de equipe, Danielle J. Barberini e Denis Svicero, pessoas com as quais trabalhei diretamente durante o mestrado, e que possuo grande admiração. Agradeço por me escutarem todas as vezes, até nos momentos em que eu queria comprar um instrumento musical novo.

A Maria Cristina Reis Castiglioni, pelo auxílio e ensinamentos referentes ao exame ultrassonográfico.

Aos amigos que fiz no laboratório de proteômica, Carol Scott, Otávio Luís de Oliveira Henriques Paulo e Cristiane Sella Paranzini, meus amigos da eletroforese, sem vocês a realização dos géis teria sido muito sem graça.

Ao Maurício Wilmsen, não só pelo auxílio neste trabalho, mas também pelas conversas, palavras de apoio, e também carinho prestado aos meus cães nos momentos de doação de sangue para o banco de sangue canino.

A FMVZ, minha casa, minha escola, por toda a estrutura e pelo privilégio de poder fazer parte da sua história.

A Capes pela concessão de bolsa durante o curso de mestrado.

A todos os funcionários, residentes e amigos que de alguma forma fizeram parte da história desse mestrado e de toda a minha vida

Ao time de futsal feminino da Unesp de Botucatu, a todas as amizades que esse time me proporcionou e a todas as histórias que terei para contar. Não é fácil ser laranja e preto.

A Republica Casa da Vizinha e agregadas, Rafaela Soares, Marina Cervato, Natália de Quadros, Paula Laszkiewicz, Maria Fernanda Alvarenga e Bruna Fernanda Firmo, as melhores irmãs que eu poderia ter ganho durante a faculdade.

A minha família pelo apoio incondicional e pela compreensão das minhas ausências. Aos meus avós Santo e Sônia, agradeço pela minha criação, sem eles eu nada seria. A minha mãe Jordina, que mesmo eu morando fora de casa há 9 anos, ainda passa noites em claro por conta de preocupação. Ao meu pai Joaquim, que me permitiu ter os primeiros contatos com os animais, para desespero da minha mãe. E em especial para a minha irmã Beatriz, que me fez rir e recobrar os sentidos quando a única certeza que eu tinha era que nada sabia.

Aos meus cães, Martin e Salomão, meus fiéis escudeiros, companheiros de risos e lágrimas, aguentaram minhas variações de humor, as noites em claro e outros perrengues mais, e sempre fizeram e fazem da minha rotina mais feliz.

A Deus, por escrever tão certo, por linhas tão tortuosas. Pela fé e coragem para seguir em frente, sempre.

EPÍGRAFE

um presságio
eu vi também
arrastou o céu numa conjuração
corpos ébrios
em confusão
a sustentação é que a manhã já vem
logo mais amanhã já vem

o acaso
empurra quem
se agarra à borda, preso em negação
solitário
na multidão
a sustentação é que a manhã já vem
logo mais amanhã já vem

chega dessa pele, é hora de trocar
por baixo ainda é serpente
e devora a cauda pra recomeçar
pelo fogo:
transmutação
sem afago, lapidando o aprendiz
o que sobra é cicatriz
a sustentação é que a manhã já vem
logo mais amanhã já vem
chega dessa pele, é hora de trocar
por baixo ainda é serpente
e devora a cauda pra continuar...

Om Namah Shivaya
Serpente - Pitty

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 A : Imagem ultrassonográfica do espaço subaracnoideo entre as vértebras C1-C2, em equinos, demonstrando a musculatura, ligamento amarelo, espaço subaracnoideo, medula espinhal e agulha espinhal no momento do transplante. B : Imagem ultrassonográfica do espaço entre as vértebras C1-C2, em equinos, demonstrando a musculatura, ligamento amarelo, espaço subaracnoideo e medula espinhal.	20
Figura 2 - Avaliação da concentração da Proteína Total, durante o delineamento experimental, para os grupos: SHAM, GTA (recebeu transplante com MSCs de origem do tecido adiposo), GCU (recebeu transplante com MSCs de origem do cordão umbilical), GMO (recebeu transplante com MSCs de origem da medula óssea).	22
Figura 3 - Avaliação da concentração dos Fibrinogênio, durante o delineamento experimental, para os grupos: SHAM, GTA (recebeu transplante com MSCs de origem do tecido adiposo), GCU (recebeu transplante com MSCs de origem do cordão umbilical), GMO (recebeu transplante com MSCs de origem da medula óssea).	23
Figura 4 - Avaliação da concentração dos Leucócitos, durante o delineamento experimental, para os grupos: SHAM, GTA (recebeu transplante com MSCs de origem do tecido adiposo), GCU (recebeu transplante com MSCs de origem do cordão umbilical), GMO (recebeu transplante com MSCs de origem da medula óssea).	24
Figura 5 - Avaliação da concentração dos Neutrófilos, durante o delineamento experimental, para os grupos: SHAM, GTA (recebeu transplante com MSCs de origem do tecido adiposo), GCU (recebeu transplante com MSCs de origem do cordão umbilical), GMO (recebeu transplante com MSCs de origem da medula óssea).	25
Figura 6 – A:Percentuais de elevação dos níveis séricos de ceruloplasmina após sucessivos transplantes de MSCs com intervalo de 30 dias. B:Percentuais de elevação dos níveis séricos de haptoglobina após sucessivos transplantes de MSCs com intervalo de 30 dias. C:Percentuais de elevação dos níveis séricos de transferrina após sucessivos transplantes de MSCs com intervalo de 30 dias.	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores hematológicos do grupo SHAM	37
Tabela 2 - Valores hematológicos do grupo tecido adiposo.....	39
Tabela 3 - Valores hematológicos do grupo medula óssea	41
Tabela 4 – Valores hematológicos do grupo cordão umbilical	43
Tabela 5 - Valores de leucograma do grupo SHAM.....	45
Tabela 6 - Valores de leucograma do grupo tecido adiposo	47
Tabela 7 - Valores de leucograma do grupo medula óssea	49
Tabela 8 - Valores de leucograma do grupo cordão umbilical	51
Tabela 9 Valores de IOD das proteínas de fase aguda, ceruloplasmina, transferrina e Haptoglobina para o grupo SHAM	53
Tabela 10 Valores de IOD das proteínas de fase aguda, ceruloplasmina, transferrina e Haptoglobina para o grupo tecido adiposo.....	54
Tabela 11 Valores de IOD das proteínas de fase aguda, ceruloplasmina, transferrina e Haptoglobina para o grupo medula óssea	55
Tabela 12 Valores de IOD das proteínas de fase aguda, ceruloplasmina, transferrina e Haptoglobina para o grupo cordão umbilical	56

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
CAPÍTULO 1	3
INTRODUÇÃO.....	3
REVISÃO DE LITERATURA.....	5
1 Uso de MSCs em lesões neurológicas	5
2 Proteínas de Fase Aguda	7
3 Protocolo de transplante intratecal de MSCs	10
4 HIPÓTESE	11
5 OBJETIVOS	12
CAPÍTULO 2.....	13
RESUMO.....	13
ABSTRACT	14
INTRODUÇÃO	15
MATERIAL E MÉTODOS	16
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
CONCLUSÕES	27
REFERÊNCIAS.....	27
CAPITULO 3	30
CONCLUSÕES GERAIS	30
REFERÊNCIAS	31
ANEXOS	37

QUEIROZ, D.L. **Transplante intratecal de células estromais mesenquimais multipotentes em equinos através do espaço intervertebral C1-C2.** Botucatu, 2017. 67p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Estudos demonstram o grande potencial do uso das células estromais mesenquimais multipotentes (MSCs) como terapia celular. Seu uso em lesões neurológicas, que usualmente apresentam difícil regeneração, tem sido estudado pelo fato das MSCs apresentarem baixa imunogenicidade efeitos imunomoduladores e neuroregenerativos. Nesse contexto, o presente estudo avaliou a viabilidade e a segurança do transplante de MSCs alogênicas provenientes do tecido adiposo, medula óssea e cordão umbilical de equinos, pela via intratecal através do espaço intervertebral C1-C2, por meio de exame neurológico seriado, análises hematológicas e determinação dos níveis séricos de proteínas de fase aguda. Foram utilizados 16 equinos saudáveis, divididos em quatro grupos: grupo SHAM (SHAM) que recebeu o transplante de salina tamponada com fosfato (PBS); grupo tecido adiposo (GTA), recebeu MSCs de origem do tecido adiposo; grupo medula óssea (GMO), recebeu MSCs de origem da medula óssea; e grupo cordão umbilical (GCU), recebeu células de origem da matriz do cordão umbilical. Foram realizadas três aplicações com intervalo de 30 dias em cada grupo, e coletou-se amostras de sangue, nos momentos que antecederam os transplantes, M0, M30 e M60 e 24 horas, após o transplante, M1, M31, M61. E por último foi realizada uma coleta 30 dias após M60, caracterizando M90. Não foram observadas alterações do exame clínico, hematológico e nas proteínas de fase aguda relacionadas aos sucessivos transplantes intratecais de MSCs, tampouco observou-se alterações que contra indicassem o uso de qualquer uma das fontes celulares, demonstrando que o protocolo utilizado, bem como qualquer uma das fontes celulares é viável e seguro.

Palavras chaves: Terapia celular, espaço subaracnóideo, ceruloplasmina, haptoglobina, transferrina.

QUEIROZ, D.L. **Intrathecal transplantation of multipotent mesenchymal stromal cells in equine through intervertebral space C1-C2**. Botucatu, 2017. 67p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Studies demonstrate the great potential of using multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) as cell therapy. Its use in neurological lesions, which usually present difficult regeneration, has been studied because MSCs have low immunogenicity and immunoregulatory and neuroregenerative effects. In this context, the present study evaluated the viability and safety of transplantation of allogeneic MSCs from the adipose tissue, bone marrow and umbilical cord of horses, through the intrathecal route through the C1-C2 intervertebral space, through serial neurological examination, hematological analyzes and determination of serum levels of acute phase proteins. Sixteen healthy horses were used, divided into four groups: SHAM group (SHAM) that received phosphate buffered saline (PBS) transplantation; adipose tissue group (GTA), received adipose tissue MSCs; bone marrow group (GMO), received MSCs from bone marrow origin; and umbilical cord (UGC) group, received cells from the umbilical cord array. M0, M30 and M60 were collected at the time of the transplantation, M1, M31 and M61 and 24 hours after transplantation. And finally a collection was performed 30 days after M60, characterizing M90. There were no changes in the clinical, hematological and acute phase-related proteins related to successive intrathecal transplantations of MSCs, nor were there alterations that contra indicated the use of any of the cellular sources, demonstrating that the protocol used, as well as any of cellular sources is viable and safe.

Keywords: Cell-based therapy, subarachnoid space, ceruloplasmin, haptoglobin, transferrin

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

O número de pesquisas com enfoque na terapia celular tem aumentado vertiginosamente, isso se deve ao fato das células mesenquimais estromais multipotentes (MSCs) apresentarem propriedades imunomoduladoras e anti-inflamatórias, estimulam a angiogênese, reduzem a inflamação, recrutam células progenitoras e minimizam a fibrose, potencializando as possibilidades de regeneração do tecido danificado (FRISBIE & SMITH, 2010; BORJESSON; PERONI, 2011; KARUSSIS *et al.*, 2013).

Existem diversas fontes de obtenção das MSCs, dentre elas o tecido adiposo e a medula óssea são as fontes mais comuns (GUTIERREZ-NIBEYRO, 2011), porém também é possível obter por meio do cordão umbilical, entre outros tecidos. O tecido adiposo é uma rica fonte celular e as MSCs possuem boa capacidade de proliferação. As MSCs oriundas da medula óssea possuem uma capacidade de proliferação limitada. E as MSCs obtidas a partir do cordão umbilical apresentam maior multipotencialidade. (Barberini, 2013). Ainda não existe um consenso em relação a qual é a melhor fonte para obtenção das MSCs, tampouco sabe-se qual o tipo celular que pode causar uma resposta inflamatória exacerbada no receptor do transplante.

Segundo Chen *et al.*, 2008, as MSCs possuem alta capacidade de diferenciação e migração. Possuem quimiotaxia pelas citocinas inflamatórias liberadas no sítio de uma lesão e/ou processo inflamatório e capacidade de regulação de mediadores inflamatórios por meio da liberação de fatores como a PGE2, IL-4, IL-6, IL-10, o fator de crescimento beta (TGF- β) (AGGARWAL; PITTENGER, 2004). Através da ação desses mediadores, pode ocorrer a supressão de células inflamatórias como os linfócitos natural killer.

Em especial a PGE2, produto das MSCs, é capaz de inibir a produção de TNF- α , de INF- γ , e estimular a produção de IL-10 (BORJESSON; PERONI 2011). A capacidade de mediar os fatores inflamatórios, torna as MSCs uma

importante ferramenta para justificar o uso da terapia celular em diversos tipos de lesões.

Inúmeras enfermidades neurológicas que acometem os equinos podem causar sequelas que comprometem a funcionalidade e qualidade de vida dos animais. Dentre estas enfermidades destacam-se pela maior prevalência, a mieloencefalite protozoária equina (EPM), a mieloencefalite herpética, a leucoencefalomalácia e a mielopatia estenótica cervical. (RADOSTITS *et al.*, 2002)

Estas enfermidades geram grandes perdas econômicas, visto que a “indústria do cavalo” no Brasil, movimenta cerca de 7,3 bilhões de reais por ano com aproximadamente 640 mil empregos diretos e 3,2 milhões de empregos, somando-se empregos diretos e indiretos (CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL, 2004).

Nesse contexto, a terapia celular com MSCs apresenta-se como uma alternativa promissora para o tratamento das enfermidades neurológicas em equinos, devido suas propriedades imunomoduladoras e neuroregenerativas. Porém, antes do uso desta biotecnologia na rotina clínica, faz-se necessário a realização de estudos sobre sua segurança e eficácia. O desenvolvimento de protocolos de transplantes, levando em consideração o tipo/gravidade da enfermidade, a fonte de MSCs, a via de transplante e a dose/número de transplantes são fundamentais para o sucesso da terapia.

Em termos de via de transplante de MSCs para tratamento de lesões neurológicas, a via intratecal apresenta vantagens sobre a via intravenosa ou intra-arterial por ultrapassar a barreira hemato-encefálica e possibilitar que um maior número de células atinja o local da lesão. Por outro lado, transplantar as MSCs no local da lesão do sistema nervoso central é mais invasivo e exige neurocirurgia, o que tornaria a terapia celular em equinos praticamente inviável. Segundo Mayhew (1975) o espaço subaracnóideo pode ser acessado em equinos através do espaço atlanto occipital ou do espaço lombo-sacro. Para realizar o transplante celular de MSCs alogênicas no espaço atlanto occipital é necessário posicionar o animal em decúbito lateral, sob anestesia geral. Já

pelo espaço lombo-sacro, existe a possibilidade de realizar o transplante com o animal em estação. Maia et al. 2015 realizou transplantes celulares via intratecal, através do espaço atlanto-occipital, em dois grupos, o grupo controle, que recebeu o transplante com PBS e o grupo tratado, que recebeu o transplante com MSC. Para avaliar a viabilidade e segurança do transplante, realizou análises das variáveis hematológicas, em dois momentos. Enquanto Barberini (2017) realizou transplantes celulares pelas vias intratecais lombo-sacra, atlanto-occipital e entre as vértebras C1 e C2.

REVISÃO DE LITERATURA

1 Uso de MSCs em lesões neurológicas

As MSCs são células que podem ser classificadas como progenitoras e multipotentes, e podem ser isoladas de diversos tecidos adultos e possuem capacidade de proliferação e diferenciação. (CHAMBERLAIN et al. 2007)

Os fatores determinantes para a caracterização das MSCs são a aderência ao plástico, capacidade de diferenciação em células de características osteogênica, condrogênica e adipogênica, bem como a expressão dos marcadores CD14, CD90, CD44, CD105, CD29 e a não expressão dos marcadores CD34, CD14, CD79 α e MHC-II (CARVALHO et al. 2011; BARBERINI et al, 2014). De acordo com Horwitz et. al.(2005), a célula que possuírem a essas características, devem receber a nomenclatura de células mesenquimais estromais multipotentes.

As fontes mais comumente utilizadas para obtenção de MSCs em equinos são a medula óssea e o tecido adiposo (GUTIERREZ-NIBEYRO, 2011). No entanto as células também podem ser obtidas a partir do tecido do cordão umbilical e da membrana amniótica (CAMPOS et al. 2017).

As MSCs atuam através da secreção de fatores bioativos que por sua vez irão exercer sua função inibindo a formação de um tecido cicatricial (fibrose), diminuindo a apoptose e estimulando a angiogênese (NÖTH et al. 2010), além de liberarem fatores de crescimento como o VEGF (fator de

crescimento vascular endotelial), HGF (fator de crescimento do hepatócito) e IGF -1 (fator de crescimento semelhante à insulina) (WANG et al. 2004).

A terapia com MSC autóloga consiste no transplante de células provenientes do próprio animal. Apresenta como vantagem menor chance de rejeição do transplante e desvantagem o tempo necessário para o cultivo das MSCs (BORJESSON; PERONI, 2011). Já a terapia com MSCs alôgenica consiste no transplante de células provenientes de um animal da mesma espécie. Apresenta como vantagem a possibilidade de rápido transplante, visto que as células já estão cultivadas e esse tipo de transplante é possível devido ao fato das MSCs possuírem baixa imunogenicidade (BARBERINI, *et al.*, 2014).

O sistema nervoso de mamíferos, em geral, possui grande complexidade e sua capacidade de recuperação perante lesões é limitada (MANSERGH et al. 2004). Perante ao alto índice de recidiva clínica e de sequelas apresentadas pelos animais que sofreram lesões de fundo neurológico, e também levando em consideração a alta especificidade do tecido nervoso e sua baixa capacidade regenerativa, a terapia celular por meio das MSCs pode estimular a angiogênese, reduzir a inflamação, recrutar células progenitoras e minimizar a fibrose (BORJESSON; PERONI, 2011), aumentando assim as possibilidades de regeneração do tecido danificado (KARUSSIS *et al.*, 2013).

Em humanos estudos com terapia celular vem buscando alternativas para auxiliar o tratamento em casos de esclerose múltipla (MANGANAS & MALETIC-SAVATIC, 2005), mal de Parkinson, acidente vascular cerebral, dentre outras (JANDIAL et al., 2007). Porém ainda não existe um protocolo/estudo definido em equinos.

A exemplo de Maia *et al.*, (2009), que realizaram o tratamento de um equino com paralisia do nervo facial que não apresentou resposta ao tratamento tradicional e após 90 dias do transplante perilesional das MSCs observaram melhora completa da ptose do lábio inferior. Os autores acreditam que as MSCs propiciaram uma melhora no microambiente neural, por conta dos seus efeitos parácrinos e imunomoduladores.

Maia et al. (2015) realizaram o transplante de MSCs via intratecal em equinos saudáveis e não observaram após o transplante, alterações no exame neurológico, na análise hematológica e na análise do LCR. Foi observado a expressão de MMP2, em sua forma inativa, porém não houve diferença estatística. Já para a MMP9 a expressão não foi observada. Os autores concluíram que o transplante de MSCs autólogas pela via intratecal apresentou-se viável e seguro. Já no presente estudo foi utilizada uma dose maior e a via utilizada para o transplante permitiu a realização do transplante com o animal em estação, também avaliou-se a resposta inflamatória por meio do comportamento das proteínas de fase aguda.

2 Proteínas de Fase Aguda

O transplante de células alogênicas pode ser rejeitado pelo organismo devido a exposição a proteínas estranhas. Quando o organismo identifica algum agente agressor, uma série de reações podem desencadear para combater o antígeno, dessa maneira, por meio de macrófagos teciduais, monócitos e linfócitos são liberadas citocinas pró-inflamatórias como as interleucinas IL-1 e IL- 6 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (SMITH, 2000; FAZIO, 2010).

Apesar das MSC alogênicas serem estranhas ao organismo receptor do transplante, diversos estudos demonstraram propriedades imunoprivilegiadas destas células fazendo com que elas não desencadeiem uma reação de rejeição ao transplante. Ao contrário as MSC tem sido utilizadas para o tratamento da doença de rejeição de enxerto, devido suas propriedades imunomoduladoras (MARTI; RIBEIRO; HAMERSCHLAK, 2011).

As MSCs possuem quimiotaxia pelas citocinas inflamatórias liberadas no sítio de uma lesão e/ou processo inflamatório e capacidade de regulação de mediadores inflamatórios por meio da liberação de fatores como a PGE2, IL-4, IL-6, IL-10, o fator de crescimento beta (TGF- β) (AGGARWAL; PITTENGER, 2004). Através da ação desses mediadores, pode ocorrer a supressão das células Natural Killer. Dessa maneira as MSCs não seriam reconhecidas pelo organismo como um antígeno, pelo contrário elas podem mediar a resposta inflamatória de forma positiva.

A resposta de fase aguda envolve mudanças metabólicas e sistêmicas, como a febre, a leucocitose, aumento do cortisol sanguíneo e diminuição das concentrações de tiroxina, ferro e zinco. Trata-se de um evento que tem como principal objetivo restabelecer a homeostasia do organismo e eliminar a causa da lesão (ECKERSALL, 2008).

Após a liberação dos mediadores inflamatórios, a IL-6 estimula a secreção das proteínas de fase aguda (PFAs) pelos hepatócitos, enquanto a IL-1 irá estimular o fluxo sanguíneo de aminoácidos e a TNF- α irá promover o catabolismo muscular por meio de glicocorticoides (ECKERSALL, 2008).

Após o estímulo, ou já passada a lesão, a IL-6 será responsável por induzir a diminuição dos níveis séricos de IL-1 e TNF- α , a partir desses eventos a IL-10 irá suprimir a produção local de IL-6 e por meio desta ocorrerá a diminuição da produção das PFAs (GRUYS *et al.*, 2005).

Os hepatócitos são os responsáveis pela síntese das PFAs, glicoproteínas que podem ser classificadas em negativas, quando apresentam diminuição dos seus níveis séricos perante um processo inflamatório, como, por exemplo, a albumina e a transferrina (TR); e positivas, quando ocorre aumento dos níveis séricos, como, por exemplo, a Alfa 1-glicoproteína ácida, a amiloide A sérica (SAA), a haptoglobina e a ceruloplasmina (JACOBSEN, 2007).

As PFAs também podem ser classificadas de acordo com o seu peso molecular em α , β e γ , e também de acordo com a sua densidade de cargas (MURATA, 2004).

As PFAs, estão presentes no processo de restauração de homeostase e limitam o crescimento bacteriano (MURATA, 2004), fazem parte estrutural de células, órgãos e tecidos, atuando como catalisadores de reações bioquímicas, tampão ácido – nutrientes, manutenção da pressão osmótica, portanto apresentam-se como importantes ferramentas no auxílio ao diagnóstico de processos inflamatórios (ECKERSALL, 2008).

Em equinos, as PFAs mais importantes são a ceruloplasmina, a haptoglobina e a Amilóide A sérica, que por sua vez é a proteína de maior destaque visto que seus níveis séricos aumentam de 100 a 1000 vezes quando na presença de um processo inflamatório, tendo um pico de 24 a 48 horas (ECKERSALL, 2008).

Outras proteínas também importantes são a haptoglobina, fibrinogênio e a α 1-glicoproteína ácida, porém diferentemente das proteínas citadas acima, seus níveis séricos elevam-se de forma lenta, apresentando pico de 2 a 3 dias e aumento de 5 a 10 vezes na concentração sanguínea (ECKERSALL & BELL, 2010; CRISMAN, 2008).

O fibrinogênio que é produzido pelos hepatócitos, possui meia vida de dois a três dias, sendo consumido durante a coagulação, não é uma das principais proteínas para avaliação de inflamação (LOPES, 2007).

Segundo Jacobsen (2005), comparando-se os níveis séricos do fibrinogênio, a contagem de leucócitos e análise das PFAs, observou-se que as PFAs foram mais eficientes e sensíveis. A SAA, é mais eficiente como marcador de processos inflamatórios, pelo fato de apresentar meia vida curta e alta resposta a inflamação. (ECKERSALL, 2008; FAGLIARI, 2008).

A transferrina (TR) que é indicada como a PFAs responsável pelo transporte de ferro no sangue, possui vida média de aproximadamente de 8 a 10 dias (ECKERSALL, 2010). Possui relação com a imunidade inata por se ligar aos íons ferro e desta maneira previne a proliferação de microorganismos que utilizam o ferro como nutriente. A concentração sérica da transferrina, quando diminuída, pode ocorrer em casos de doença renal, leucemias e por produção inadequada da mesma por conta de lesões em hepatócitos (MURATA, 2004).

Oliveira-Filho et al. (2014) verificou que a quantificação do ferro plasmático era um indicador mais precoce da inflamação quando comparado ao fibrinogênio. Isso se deve ao fato que a hipoferremia é uma consequência do aumento da hepcidina hepática, que teve o seu aumento observado as 6 e

18 horas após indução da inflamação, enquanto o fibrinogênio apresentou aumento somente 24 horas após a indução da inflamação.

A Ceruloplasmina (Ce) pode ser classificada como uma glicoproteína com peso de 151 KDa, conhecida por realizar o transporte do cobre, sendo essencial para a eritropoiese, exercendo efeito antioxidante nas células e tecidos, com o intuito de realizar proteção dos mesmo quando em contato com compostos gerados pela fagocitose de microrganismos (CÉRON *et al.*, 2005). Sua concentração sérica irá aumentar em casos de inflamação aguda, traumas e até mesmo processos infecciosos, por ocorrer um aumento da sua expressão genica em tecido hepático e extra hepático, como baço, pulmões e cérebro (ECKERSALL, 2010).

A Haptoglobina (Hp) é classificada como uma glicoproteína, que possui subunidades alfa e beta. Pode se ligar a hemoglobina impedindo a formação de radicais livres e diminuindo a disponibilidade de resíduos para a utilização bacteriana. Também estimula a angiogênese e possui efeito imunomodulador (ECKERSALL, 2008). Após um estímulo traumático pode ser detectada em 24 horas, sendo que suas concentrações atingem um pico em aproximadamente 4 dias (ECKERSALL & BELL, 2010).

Para a identificação das proteínas, a técnica da eletroforese apresenta-se como um método simples e não oneroso, visto que pode ser realizado com uma pequena quantidade de amostra (GORDON, 1995). Através da eletroforese realizada com a técnica de SDS-PAGE, é possível identificar um grande número de proteínas (FAGLIARI *et al.*, 2008).

3 Protocolo de transplante intratecal de MSCs

O estabelecimento de um protocolo seguro e aplicável para o transplante celular via intratecal é de suma importância para o desenvolvimento da terapia celular direcionada ao tratamento de lesões neurológicas em equinos. Até o presente momento não existe consenso sobre qual melhor forma de acesso para realização do transplante de MSC em enfermidades neurológicas. Tampouco existe consenso em relação a qual a melhor dose e qual o melhor tipo/fonte celular.

Maia et. al. (2015) realizaram transplante de 1 milhão de MSCs autólogas, provenientes da medula óssea, em 10 equinos, através da via atlanto – occipital, objetivando avaliar a segurança da via intratecal e não encontraram alterações significativas nas análises hematológicas. Já o presente estudo utilizou a dose de 50 milhões de células para avaliar a segurança do transplante e possíveis reações adversas perante altas doses.

Em geral, transplantes de MSC para o tratamento de lesões neurológicas podem ser realizados pela via intravenosa, intra-arterial, intratecal e intra/perilesional. A via de transplante intravenosa apresenta como vantagem a facilidade de realização, porém permite que a maioria das células transplantadas se direcionem para o pulmão dificultando a migração para o tecido nervoso, tanto pelo seu aprisionamento nos capilares pulmonares como pela maior dificuldade em atravessar a barreira hemato-encefálica (BHE). Por sua vez, a via intra-arterial, por exemplo, a artéria carótida externa, apesar de permitir que as células transplantadas sejam direcionadas para o encéfalo sem passar pelos pulmões, ainda apresenta a desvantagem de ter que atravessar a BHE, além de aumentar os riscos de tromboembolismo cerebral (ZHANG *et al.*, 2015). Já a via intratecal apesar de invasiva, apresenta a maior chance de distribuição no tecido nervoso, pelo fato das MSCs transplantadas não precisarem atravessar a BHE.

Uma região anatômica que pode ser utilizada para acessar o espaço subaracnoideo em equinos na posição quadrupedal é a cisterna lombo-sacra, seguindo a técnica descrita por DE LAHUNTA (1983). Já Pease *et al.*, (2012) descreveram uma técnica que também proporciona o acesso do espaço subaracnoideo em posição quadrupedal, através do espaço intervertebral C1-C2, guiada por ultrassom (US).

4 HIPÓTESE

O presente estudo apresenta a hipótese de que sucessivos transplantes intratecal de MSCs alogênicas oriundas do tecido adiposo, medula óssea e

cordão umbilical é viável de ser realizado à campo e seguro em equinos, sem reações adversas perante os diferentes tipos celulares.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

- Desenvolver um protocolo de transplante intratecal de MSCs alogênicas, viável de ser realizado à campo e seguro em equinos.

5.2 Objetivos específicos

- Desenvolver um protocolo de sucessivos transplantes de MSCs alogênicas, via intratecal através do acesso ao espaço subaracnoideo entre as vertebrae C1-C2.
- Avaliar clinicamente os animais, por meio de exames físicos e neurológicos, antes e após o transplante de MSCs alogênicas proveniente do tecido adiposo (TA), cordão umbilical (CU) e medula óssea (MO).
- Avaliar o quadro hematológico dos animais, antes e após o transplante intratecal de MSCs alogênicas provenientes do TA, CU e MO.
- Avaliar o proteinograma sérico, com enfoque nas proteínas ceruloplasmina, transferrina e haptoglobina, antes e após o transplante intratecal de MSCs alogênicas provenientes do TA, CU e MO.

1 **CAPÍTULO 2**

3 **TRABALHO CIENTÍFICO**

4 Trabalho a ser enviado para a revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e
5 Zootecnia

6 As normas para publicação encontram-se no endereço eletrônico:
7 <http://www.scielo.br/revistas/abmvz/pinstruc.htm>

9 **Viabilidade e segurança de transplantes seriados de células estromais**
10 **mesenquimais multipotentes em equinos sadios através do espaço subaracnoideo**
11 **entre a primeira e a segunda vertebra cervical.**

12 [Viability and safety of serial transplants of multipotent mesenchymal stromal cells in
13 healthy horses through the subarachnoid space between the first and second cervical
14 vertebrae.]

16 D.L.QUEIROZ¹, D.J.BARBERINI, D.J.SVICERO, M.C.R. CASTIGLIONI, N.D.
17 LIMONTA, F.F.SOUZA, R.M. AMORIM

18 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista
19 (Unesp), Campus de Botucatu, Distrito de Rubião Júnior s/n, Botucatu, SP 18618-000,
20 Brazil

22 **RESUMO**

23 O uso de células estromais mesenquimais multipotentes (MSCs) tem sido
24 estudado para auxiliar na recuperação de sequelas neurológicas, pelo fato das MSCs
25 apresentarem capacidade de auto renovação, baixa imunogenicidade, efeitos
26 antiinflamatórios, imunomoduladores e neuroprotetores. O presente estudo avaliou a
27 viabilidade e a segurança do transplante intratecal de MSCs através do espaço
28 intervertebral C1- C2, por meio de exames físicos e neurológicos, análises
29 hematológicas e dos níveis séricos das proteínas de fase aguda. Para isso foram

¹ E-mail: diana_leocata@hotmail.com

30 utilizados 16 equinos saudáveis, que foram divididos em quatro grupos: grupo SHAM
31 (SHAM) que recebeu o transplante de salina tamponada com fosfato (PBS); grupo
32 tecido adiposo (GTA), recebeu MSCs de origem do tecido adiposo; grupo medula óssea
33 (GMO), recebeu MSCs de origem da medula óssea; e grupo cordão umbilical (GCU),
34 recebeu células de origem da matriz do cordão umbilical. Foram realizadas três
35 aplicações com intervalo de 30 dias em cada grupo, e coletou-se amostras de sangue,
36 nos momentos que antecederam os transplantes, M0, M30 e M60 e 24 horas, após o
37 transplante, M1, M31, M61. E por último foi realizada uma coleta 30 dias após 60,
38 caracterizando M90. Os resultados obtidos demonstram a viabilidade do protocolo
39 proposto de transplante intratecal de MSCs, assim como a sua segurança em equinos
40 saudáveis. Estudos clínicos de segurança e eficácia terapêutica devem ser realizados em
41 equinos acometidos por afecções neurológicas antes da utilização desta biotecnologia na
42 rotina clínica.

43 **Palavras chaves:** Terapia celular, espaço subaracnoideo, ceruloplasmina, haptoglobina,
44 transferrina.

45

46 **ABSTRACT**

47 The use of multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) has been studied to aid in
48 the recovery of neurological sequelae, due to the fact that MSCs present self-renewal
49 capacity, low immunogenicity, anti-inflammatory, and immunomodulatory and
50 neuroprotective effects. The present study evaluated the viability and safety of
51 intrathecal transplantation of MSCs through the C 1 -C 2 intervertebral space through
52 physical and neurological exams, hematological and serum levels of acute phase
53 proteins. For this, 16 healthy horses were used, which were divided into four groups:
54 SHAM group (SHAM) that received phosphate buffered saline (PBS); adipose tissue
55 group (GTA), received adipose tissue MSCs; bone marrow group (GMO), received
56 MSCs from bone marrow origin; and umbilical cord (UGC) group, received cells from
57 the umbilical cord array. M0, M30 and M60 were collected at the time of the
58 transplantation, M1, M31 and M61 and 24 hours after transplantation. And finally a
59 collection was performed 30 days after 60, characterizing M90. The results obtained
60 demonstrate the viability of the proposed intrathecal MSC transplantation protocol, as
61 well as its safety in healthy horses. Clinical safety and therapeutic efficacy studies

62 should be performed on horses affected by neurological conditions prior to the use of
63 this biotechnology in routine clinical practice.

64

65 **Keywords:** Cell therapy, subarachnoid space, ceruloplasmin, haptoglobin, transferrin

66

67 **INTRODUÇÃO**

68 O número de pesquisas com enfoque na terapia celular tem aumentado
69 vertiginosamente, isso se deve ao fato das MSCs apresentarem propriedades
70 imunomoduladoras e antiinflamatórias, estimulam a angiogênese, reduzem a
71 inflamação, recrutam células progenitoras e minimizam a fibrose, potencializando as
72 possibilidades de regeneração do tecido danificado (Frisbie e Smith, 2010; Borjesson e
73 Peroni, 2011; Karussis, 2013).

74 Existem diversas fontes de obtenção das MSCs, dentre elas o tecido adiposo e a
75 medula óssea são as fontes mais comuns (Gutierrez-Nibeyro, 2011), porém também é
76 possível obter por meio do cordão umbilical, entre outros tecidos. O tecido adiposo é
77 uma rica fonte celular e as MSCs possuem boa capacidade de proliferação. As MSCs
78 oriundas da medula óssea possuem uma capacidade de proliferação limitada. E as MSCs
79 obtidas a partir do cordão umbilical apresentam maior multipotencialidade. (Barberini,
80 2013). Ainda não existe um consenso em relação a qual é a melhor fonte para obtenção
81 das MSCs, tampouco sabe-se qual o tipo celular é mais eficiente no tratamento de lesões
82 neurológicas.

83 Segundo Chen *et al.*, 2008, as MSCs possuem alta capacidade de diferenciação e
84 migração. Possuem quimiotaxia pelas citocinas inflamatórias liberadas no sítio de uma
85 lesão e/ou processo inflamatório e capacidade de regulação de mediadores inflamatórios
86 por meio da liberação de fatores como a PGE2, IL-4, IL-6, IL-10, o fator de crescimento
87 beta (TGF- β) (Aggarwal; Pittenger, 2004). Através da ação desses mediadores, pode
88 ocorrer a supressão de células inflamatórias como os linfócitos natural killer.

89 Em especial a PGE2, produto das MSCs, é capaz de inibir a produção de TNF- α ,
90 de INF- γ , e estimular a produção de IL-10 (Borjesson e Peroni 2011). A capacidade de
91 mediar os fatores inflamatórios, torna as MSCs uma importante ferramenta para
92 justificar o uso da terapia celular em diversos tipos de lesões.

93 Inúmeras enfermidades neurológicas que acometem os equinos podem causar
94 sequelas que comprometem a funcionalidade e qualidade de vida dos animais. Dentre
95 estas enfermidades destacam-se pela maior prevalência, a mieloencefalite protozoária
96 equina (EPM), a mieloencefalite herpética, a leucoencefalomalácia e a mielopatia
97 estenótica cervical. (Radostits *et al.*, 2002)

98 Nesse contexto, a terapia celular com MSCs apresenta-se como uma alternativa
99 promissora para o tratamento das enfermidades neurológicas em equinos, devido suas
100 propriedades imunomoduladoras e neuroregenerativas. Porém, antes do uso desta
101 biotecnologia na rotina clínica, faz-se necessário a realização de estudos sobre sua
102 segurança e eficácia. O desenvolvimento de protocolos de transplantes, levando em
103 consideração a tipo/gravidade da enfermidade, a fonte de MSCs, a via de transplante e a
104 dose/número de tratamentos são fundamentais para o sucesso da terapia. Dessa maneira
105 o presente estudo tem como objetivos desenvolver um protocolo de terapia celular
106 intratecal viável de ser realizado à campo e avaliar a segurança do transplante de MSCs
107 alogênicas provenientes do tecido adiposo, medula óssea e cordão umbilical.

108

109 **MATERIAL E MÉTODOS**

110 **Delineamento experimental:**

111 Todos os procedimentos experimentais envolvendo animais foram aprovados pela
112 Comissão de Ética da faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP-Botucatu
113 sob o protocolo nº 161/2014 – CEUA. Foram utilizados 16 equinos adultos hígidos,
114 com idade média entre 5 e 12 anos, machos e fêmeas divididos aleatoriamente em
115 quatro grupos: grupo SHAM (GS) que recebeu o transplante de salina tamponada com
116 fosfato (PBS); grupo tecido adiposo (GTA), recebeu MSCs de origem do tecido
117 adiposo; grupo medula óssea (GMO), recebeu MSCs de origem da medula óssea; e
118 grupo cordão umbilical (GCU), recebeu células de origem da matriz do cordão
119 umbilical. No grupo SHAM foi administrado 2 mL de PBS, e nos demais grupos foram
120 administrados aproximadamente 50×10^6 MSCs, por via intratecal entre o espaço
121 intervertebral C1-C2, mediante sedação com detomidina $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ e cloridrato de
122 morfina $0,05 \text{ mg}/\text{kg}$, associado ao bloqueio local com cloridrato de lidocaína com o
123 animal em posição quadrupedal de acordo com (PEASE *et al.*, 2012), realizando
124 transplantes seriados a cada 30 dias. Estes animais foram submetidos a exames físicos e

125 neurológicos, à coletas de sangue, para análises hematológica e séricas de proteína de
126 fase aguda, por meio do plasma sanguíneo, nos seguintes momentos: M0 -
127 imediatamente antes do primeiro transplante; M1 - 24 horas após o primeiro transplante;
128 M30 - imediatamente antes do segundo transplante (30 dias após M1); M31 - 24 horas
129 após M30; M60 - imediatamente antes do terceiro transplante (30 dias após M30); M61
130 - 24 horas após M60; e por fim M90 - 30 dias após M60.

131

132 **Coleta, isolamento, cultivo e caracterização das MSCs:**

133 As MSCs derivadas do tecido adiposo foram obtidas através de uma biópsia
134 conforme Carvalho *et al.* (2011). As MSCs derivadas da medula óssea foram obtidas por
135 meio de uma punção de medula óssea conforme Barberini *et al.* (2014). E por fim, para
136 obtenção das MSCs derivadas do cordão umbilical, isolamento e cultivo celular foram
137 realizados conforme Barberini *et al.* (2014). As células utilizadas para transplante
138 faziam parte de um banco de células, produzido pelo grupo de pesquisa e já estavam
139 previamente caracterizadas de acordo com a expressão dos marcadores CD90 e MHC-II.

140

141 **Protocolo de transplante intratecal de MSCs:**

142 O transplante foi realizado no espaço subaracnóideo entre as vértebras C1-C2 de
143 acordo com a técnica descrita por (Pease *et al.*, 2012), com modificações. Para isso, os
144 animais foram sedados com detomidina (10-20 µg/kg intravenoso) e morfina (0,05 mg/kg
145 intravenoso). Em posição quadrupedal, uma área de 15x15 cm, centrada sobre o espaço
146 das vértebras C1-C2, foi tricotomizada e preparada assepticamente com clorexidina e
147 álcool para transplante estéril. Foi realizada a infiltração da pele e do tecido subcutâneo
148 com anestésico cloridrato de lidocaína 2%, utilizando um bloqueio em botão. Com ajuda
149 da ultrassonografia (MyLab™30Gold VET), o espaço subaracnoideo entre C1-C2 foi
150 localizado, uma agulha espinhal de 25Gx90mm foi inserida até o espaço subaracnoideo,
151 sendo retirado aproximadamente 2 ml de LCR, com auxílio de uma seringa de 3mL. Logo
152 após este procedimento, o PBS (2 mL) foi aplicado no grupo SHAM e as MSCs (50x10⁶
153 em 2mL de PBS) foram transplantadas nos respectivos grupos experimentais,

154

155 **Exames físico e neurológico:**

156 Os exames físico e neurológico foram realizados conforme Feitosa (2008)
157 previamente a cada transplante, diariamente na primeira semana, e duas vezes por semana
158 nas demais semanas seguintes.

159 Para isso, foi avaliada a integridade encefálica, medular e dos nervos periféricos
160 através da avaliação do estado mental, do comportamento, da posição e coordenação da
161 cabeça, da integridade dos pares de nervos cranianos, da locomoção, da coluna vertebral
162 da região cervical até a sacral e dos membros torácicos e pélvicos. Além dos parâmetros
163 básicos como frequência cardíaca, frequência respiratória, temperatura, tempo de
164 preenchimento capilar, linfonodos, coloração de mucosas, bem como avaliações mais
165 pontuais ao local da aplicação, como avaliação da sensibilidade dolorosa e aumento de
166 temperatura local.

167

168

169 **Análise hematológica:**

170 As variáveis hematológicas de interesse para o presente estudo foram: Proteína
171 Total, Fibrinogênio, Leucócitos, Linfócitos e Segmentados. Pois são as variáveis com
172 maior relação com resposta inflamatória. Foram coletadas amostras de sangue através
173 da punção da veia jugular direita ou esquerda aleatoriamente com uso de vacuntainer®.
174 O sangue coletado para a hematologia (3mL), foi acondicionado em tubos contendo
175 ácido etilenodiamino tetra acético (EDTA K3) a 7,5%. As amostras foram processadas
176 em contador hematológico (Sysmex® - Poch-110 iV) (Thrall *et al.*, 2015). A contagem
177 diferencial de leucócitos foi realizada em 100 células com avaliação morfológica de
178 hemácias, leucócitos e plaquetas em esfregaços de sangue corados pelo panótico rápido.
179 Para análise do hematócrito (Ht), proteína plasmática total (PT) e fibrinogênio foram
180 preenchidos dois capilares (70%), sendo um corresponde a quantificação do hematócrito
181 e proteína plasmática total e o outro para o fibrinogênio. Ambos foram selados e
182 submetidos a centrifugação em micro-centrífuga² a 12.000 rpm por cinco minutos. A
183 porcentagem de hemácias foi aferida com auxílio de uma tabela graduada para
184 hematócrito. Para a leitura da PT, foi utilizada a coluna de plasma sobrenadante do tubo
185 de micro hematócrito com o auxílio de um refratômetro (Refratômetro Manual 0 a 32%
186 Brix c/ Compensação Automática Mod. 103 – Biobrix.). O capilar correspondente a
187 quantificação do fibrinogênio foi imerso em banho maria a temperatura de 52°C por até

188 cinco minutos e novamente submetido ao mesmo protocolo de centrifugação. A leitura
189 foi realizada com auxílio do refratômetro. Para obtenção dos valores de fibrinogênio, o
190 valor da PT da primeira centrifugação foi subtraído do valor obtido na segunda
191 centrifugação e multiplicado por 1000.

192

193 **Análise Eletroforética:**

194 Para o fracionamento das proteínas, foram utilizados 1mL de plasma sanguíneo,
195 e realizou-se eletroforese em gel de poliacrilaminada contendo dodecil sulfato de sódio
196 (SDS-PAGE), conforme técnica descrita por Laemmli (1970). Para realização da
197 eletroforese foi utilizado um sistema vertical (Mini VE, GE Healthcare, Uppsala,
198 Suécia), utilizando uma concentrações de poliacrilamida de 10% no gel de separação. E
199 a concentração do 5% no gel de empilhamento foi usado em todas as corridas. A
200 quantidade total carregada de proteína em cada poço foi 90 ug em 50 uL. Cada gel
201 também foi carregado 5 uL do marcador de proteína padrão (Perfect Protein Markers,
202 10-225 kDa, EMD Millipore Corporation, San Diego, CA, USA). O sistema de
203 eletroforese foi conectado a uma fonte de alimentação (EPS 300 Power Supply, GE
204 Healthcare, Uppsala, Suécia) com corrente constante de 15mA e tensões máximas
205 aproximadas de 180 V durante aproximadamente 2 h. Após a corrida, o gel foi fixado na
206 solução fixadora por 1 hora, transcorrido esse tempo foi retirada a solução e o gel foi
207 corado com a solução de trabalho coomassie G – 250, durante 16 horas, no agitador
208 (Rotary Shaker, Biomixer, modelo MOS-1, São Paulo, SP, Brasil). Após a coloração o
209 gel foi retirado da solução e deixado durante 1 hora em água destilada para descorar o
210 fundo. Por fim, a água destilada foi retirada e o gel ficou armazenado em solução de
211 ácido acético 10%. As imagens dos géis foram digitalizadas e para cada gel foi gerada
212 uma imagem no analisador (Image Master TM 1D, GE Healthcare), e através disso foi
213 determinado o peso molecular (MW) integrado a densidade óptica (IOD).

214

215 **Análise Estatística:**

216 A distribuição das diversas variáveis foi verificada utilizando análises gráficas e
217 testes de normalidade (Shapiro-Wilk). Para as variáveis consideradas paramétricas foi
218 utilizado um modelo de regressão linear (ANOVA) multivariada com pós teste de
219 Tukey, tendo como variáveis explanatórias o tratamento e o momento avaliado. Para as

220 variáveis não paramétricas foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com pós teste de
221 Dunns para verificar diferenças entre os momentos e os tratamentos. Foram
222 consideradas diferenças estatísticas quando $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas
223 com o *Statistical Analysis Software – SAS* versão 9.4 (SAS Institute, 2011).

224

225 RESULTADOS E DISCUSSÃO

226 Para realização do transplante celular, a identificação ultrassonográfica das
227 estruturas na região intervertebral entre C1-C2 foi eficiente e determinante para o
228 sucesso da técnica, conforme demonstrado na figura 1. Em todos os transplantes de
229 MSCs não se observou resistência na seringa.

230



231

232 Figura 1 **A**: Imagem ultrassonográfica do espaço subaracnoideo entre as vértebras C1-
233 C2, em equinos, demonstrando a musculatura, ligamento amarelo, espaço
234 subaracnoideo, medula espinhal e agulha espinhal no momento do transplante. **B**:
235 Imagem ultrassonográfica do espaço entre as vértebras C1-C2, em equinos,
236 demonstrando a musculatura, ligamento amarelo, espaço subaracnoideo e medula
237 espinhal.

238

239 Transplantes de MSC para o tratamento de lesões neurológicas podem ser
240 realizados pela via intravenosa, intra-arterial, intratecal e intra/perilesional. A via de
241 transplante intravenosa apresenta como vantagem a facilidade de realização, porém
242 permite que a maioria das células transplantadas se direcionem para o pulmão
243 dificultando a migração para o tecido nervoso, tanto pelo seu aprisionamento nos
244 capilares pulmonares como pela maior dificuldade em atravessar a barreira hemato-

245 encefálica (BHE). Por sua vez, a via intra-arterial, apesar de permitir que as células
246 transplantadas sejam direcionadas para o encéfalo sem passar pelos pulmões, ainda
247 apresenta a desvantagem de ter que atravessar a BHE, além de aumentar os riscos de
248 tromboembolismo cerebral (ZHANG et. al., 2015). Já a via intratecal apesar de
249 invasiva, apresenta a vantagem de melhor distribuição no tecido nervoso, pelo fato das
250 MSCs transplantadas não precisarem atravessar a BHE.

251 O transplante intratecal somente não foi possível quando o animal movimentou a
252 cabeça de forma excessiva, pois essa movimentação alterava o trajeto da agulha e
253 dificultava o acesso ao espaço subaracnoideo. Poucos animais não ficaram na posição
254 ideal, após a sedação, dificultando a realização do transplante. Nesses casos optou-se
255 primeiramente por um reforço na bloqueio periregional e quando mesmo assim o animal
256 continuava a movimentar-se optou-se por realizar metade da dose inicial de detomidina.

257 Somente um animal foi retirado do estudo por não permitir a realização do
258 transplante, mesmo após a sedação. Durante o estudo notou-se que os animais
259 apresentavam maior incomodo no momento em que a agulha transpassava a pele. Então
260 antes de realizar o transplante é necessário localizar o espaço subaracnoideo de forma
261 precisa e realizar o bloqueio de forma eficaz.

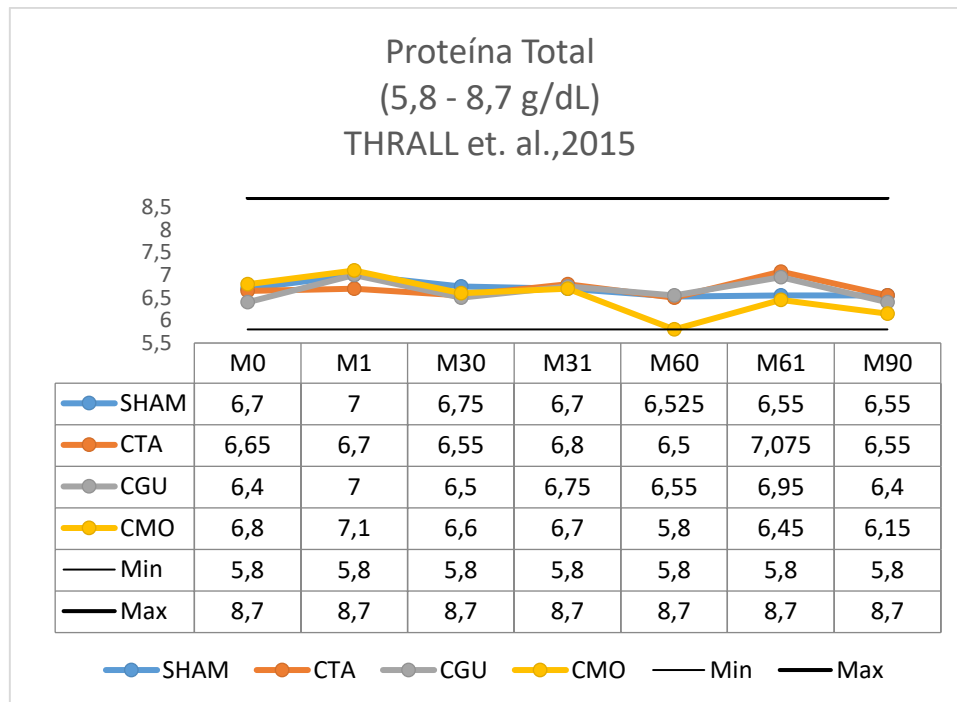
262 Não foi observada nenhuma alteração nos exames físico e neurológicos, após a
263 realização dos transplantes. Também não foi observado nenhum acidente durante o
264 transplante celular no espaço subaracnoideo que colocasse em risco a integridade física
265 do animal, assim como não se observou nenhum efeito colateral durante o transplante
266 das MSCs nos diferentes grupos. Não foi observado sensibilidade dolorosa, aumento de
267 volume ou de temperatura na região do transplante em nenhum animal.

268

269 Nas análises hematológicas, para a linfócitos, não houve diferença estatística entre
270 nenhum dos momentos e tampouco observou-se algum valor fora dos valores de
271 referência.

272 Para a variável proteína total houve diferença estatística entre os momentos M1
273 e M60 do Grupo GMO. Porém, ambos os valores de M1 e M60 encontram-se dentro
274 dos valores de referência, portanto essa diferença estatística não tem significância para o
275 presente estudo.

276



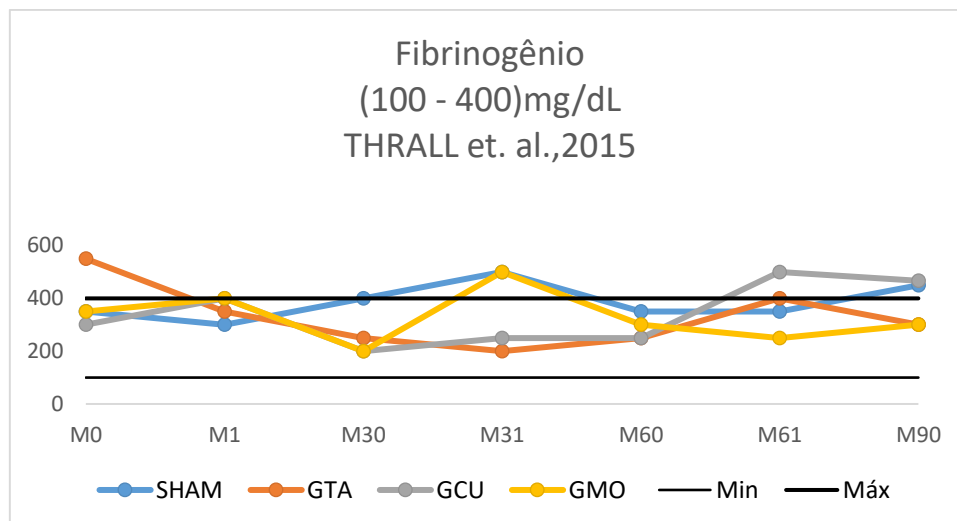
277

Figura 2 - Avaliação da concentração da Proteína Total, durante o delineamento experimental, para os grupos: SHAM, GTA (recebeu transplante com MSCs de origem do tecido adiposo), GCU (recebeu transplante com MSCs de origem do cordão umbilical), GMO (recebeu transplante com MSCs de origem da medula óssea).

278

279 Para a variável fibrinogênio não houve diferença estatística entre nenhum dos
 280 momentos, porém observa-se aumento ultrapassando os valores de referência no M31
 281 do grupo GMO e no M61 do grupo GCU. No grupo GMO o aumento ocorreu somente
 282 em um animal, enquanto no grupo GCU dois animais apresentaram aumento. Acredita-
 283 se que esse aumento trata-se de variação individual pontual ou resposta a fatores
 284 externos ao experimento uma vez que este aumento não se repetiu em outros momentos
 285 experimentais. Quando comparado a sensibilidade e precocidade como marcador, do
 286 fibrinogênio com as PFAs, o mesmo apresentou aumento tardio, visto que começa a
 287 aumentar em 24 horas, enquanto as PFAs começam a aumentar entre 6 e 8 horas.
 288 (Oliveira-Filho *et al.* 2014)

289



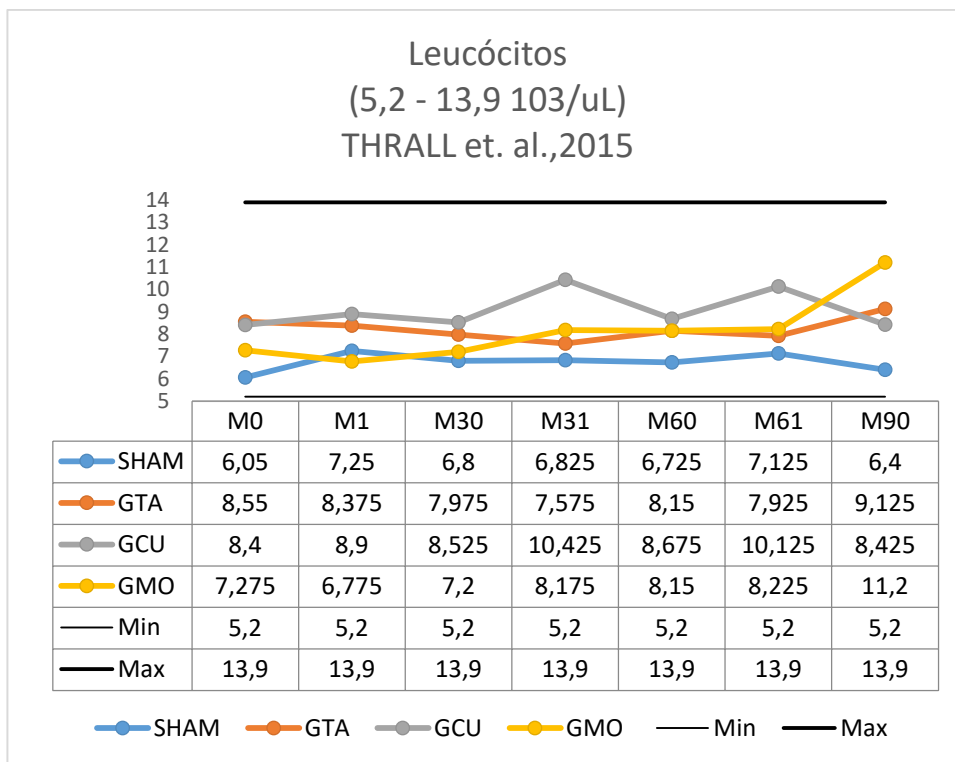
290

Figura 3 - Avaliação da concentração dos Fibrinogênio, durante o delineamento experimental, para os grupos: SHAM, GTA (recebeu transplante com MSCs de origem do tecido adiposo), GCU (recebeu transplante com MSCs de origem do cordão umbilical), GMO (recebeu transplante com MSCs de origem da medula óssea).

291

292 Para a variável leucócitos houve diferença estatística entre os momentos M0,
293 M1, M30 e M60 com o momento M90 do grupo GMO, porém todos os valores de todos
294 os momentos encontram-se dentro dos valores de normalidade. E os momentos são
295 muito distantes do M90, logo não caracteriza uma resposta inflamatória ao tratamento
296 proposto.

297 Nota-se que no M31 e no M61 houve um aumento na concentração, no grupo
298 GCU, mas este aumento não encontra-se acima dos valores de referência. Somente foi
299 observado aumento em dois animais do grupo e esses animais sofreram intercorrências
300 externas ao tratamento proposto pelo fato de terem sido manipulados por pessoas
301 externas à equipe de pesquisa.



302

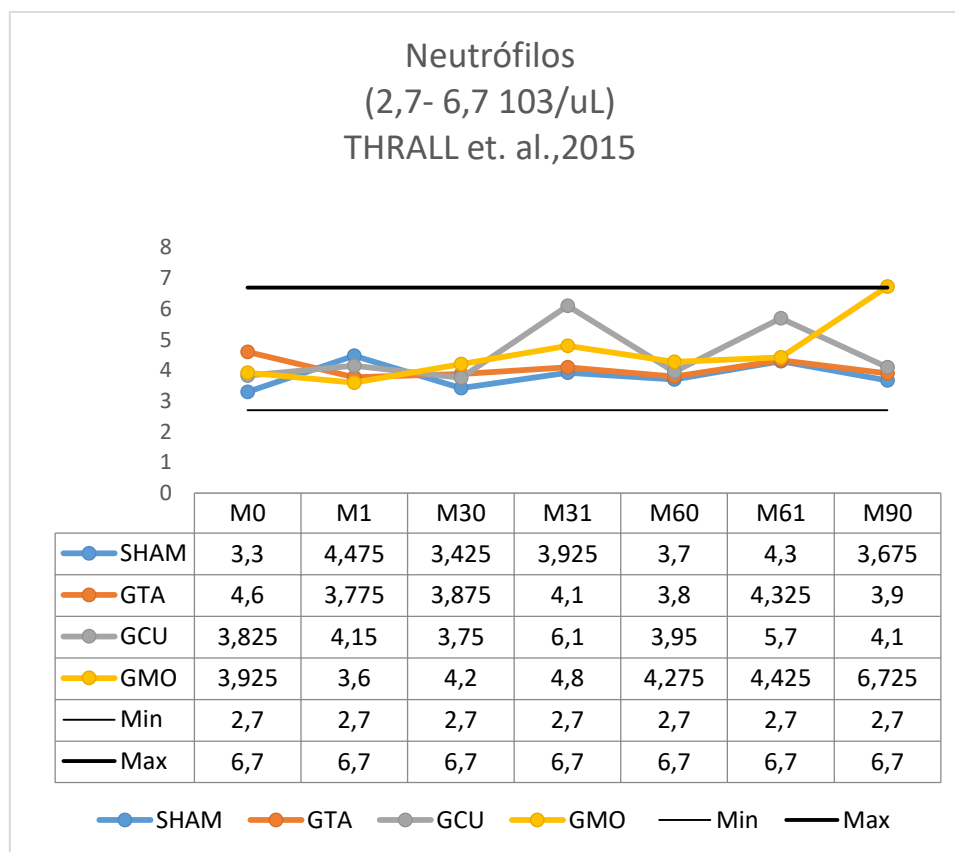
Figura 4 - Avaliação da concentração dos Leucócitos, durante o delineamento experimental, para os grupos: SHAM, GTA (recebeu transplante com MSCs de origem do tecido adiposo), GCU (recebeu transplante com MSCs de origem do cordão umbilical), GMO (recebeu transplante com MSCs de origem da medula óssea).

303

304 Para a variável Neutrófilos, houve diferença estatística entre o M0 do grupo
305 SHAM e o M90 do grupo GMO, entre o M30 o grupo SHAM e o M90 o grupo GMO, e
306 entre os momentos M0, M1, M3, do grupo GMO e o M90 do grupo GMO.

307 Pode se observar que o valor de M90 do grupo GMO está discretamente
308 aumentado, porém esse aumento foi observado somente em um animal, portanto trata-se
309 de uma variação individual. O aumento dos neutrófilos pode estar relacionado a
310 diversos fatores como processos infecciosos, processos anêmicos, necróticos e
311 inflamatórios. Também pode ser observado em casos de estresse, ou resposta de fuga e
312 também por terapia com glicocorticoides (Stockham e Scott, 2011). No presente estudo
313 trata-se de um momento isolado, e a amostra de sangue analisada foi coletada antes do
314 transplante celular, portanto, acredita-se que a neutrofilia apresentada não condiz com
315 um processo inflamatório pós transplante.

316



317

318 Figura 5 - Avaliação da concentração dos Neutrófilos, durante o delineamento
319 experimental, para os grupos: SHAM, GTA (recebeu transplante com MSCs de origem
320 do tecido adiposo), GCU (recebeu transplante com MSCs de origem do cordão
321 umbilical), GMO (recebeu transplante com MSCs de origem da medula óssea).

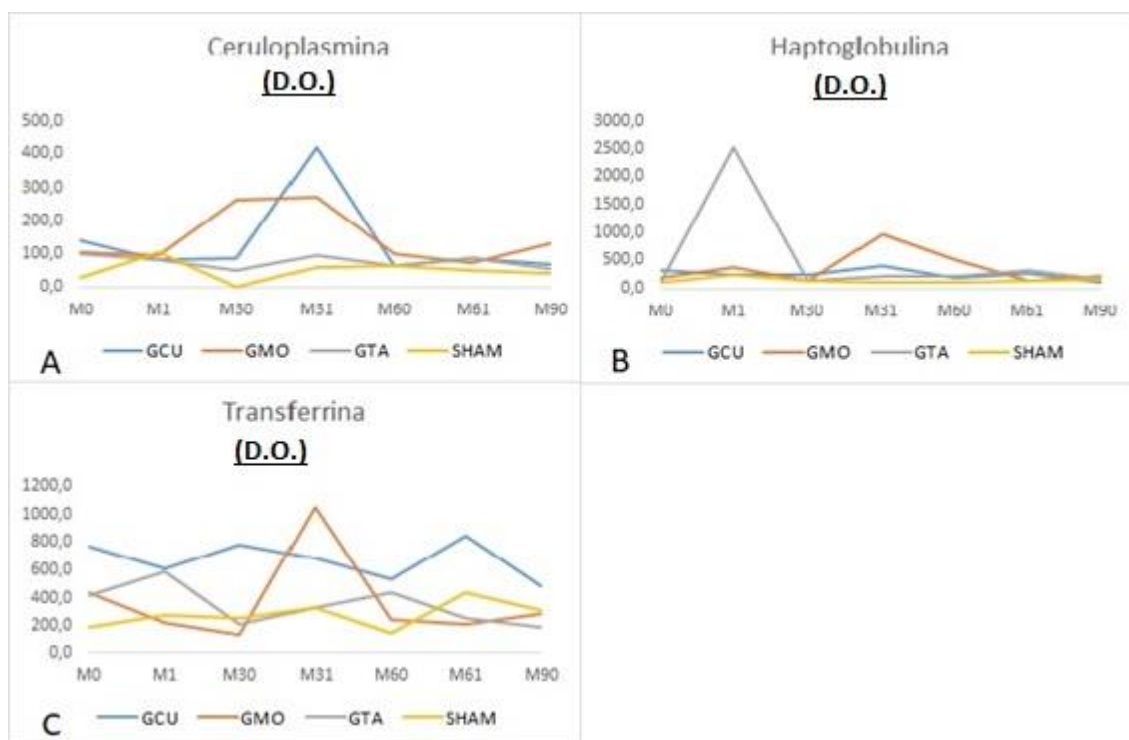
322

323 Através da análise das bandas dos géis obtidos através da eletroforese, observou-
324 se a presença de três proteínas com massa molecular aproximado de 150 kDa, 80 kDa e
325 47 kDa, sugerindo a presença de Ceruloplasmina, Transferrina e Haptoglobina,
326 respectivamente.

327

328 Não foi observada nenhuma diferença estatística entre os momentos e os
329 tratamentos, porém observou-se um pico no M31 nas proteínas ceruloplasmina e
330 transferrina. Acredita-se que esse pico ocorreu devido a fatores externos ao tratamento,
331 devido ao fato desse aumento ter sido observado somente em um animal de forma
332 isolada e também pelo fato do pico ocorrer de forma isolada, ou seja, não se repetir em
333 outros momentos seguintes a aplicação de MSCs. A transferrina, por ser uma PFA
negativa, quando em resposta a um processo inflamatório, apresentaria diminuição dos

334 níveis séricos (Murata, 2004). Fato este não observado no presente estudo visto que os
 335 índices de transferrina se mantiveram, com exceção do M31.
 336



337

Figura 6 – A: Percentuais de elevação dos níveis séricos de ceruloplasmina após sucessivos transplantes de MSCs com intervalo de 30 dias. B: Percentuais de elevação dos níveis séricos de haptoglobulina após sucessivos transplantes de MSCs com intervalo de 30 dias. C: Percentuais de elevação dos níveis séricos de transferrina após sucessivos transplantes de MSCs com intervalo de 30 dias.

338 Já para a proteína Haptoglobulina, observou-se um pico no M1. Analisando os
 339 animais de forma individual, nota-se que somente um animal apresentou maior expressão
 340 da proteína, portanto trata-se de uma variação individual ou de algum acontecimento
 341 externo ao tratamento proposto pelo estudo.

342 As PFAs também podem auxiliar a resposta imunológica, inibindo o crescimento
 343 de microrganismos (Jain, 2011) por se ligarem a íons como cobre, no caso da
 344 ceruloplasmina, e o íons ferro no caso da transferrina. Ao se ligarem com esses íons as
 345 PFAs diminuem a disponibilidade desses íons para consumo e consequente crescimento
 346 de microrganismos como bactérias (Murata, 2004). Por esse ponto de vista pode-se

347 encarar o aumento das proteínas como uma forma de auxiliar a diminuir a presença de
348 microrganismos, dessa forma auxiliando na atuação das MSCs.

349 Murata (2004) descreveu aumento da Hp em equinos, após procedimentos
350 cirúrgicos, processos inflamatórios experimentais e em doenças naturais. Tendo a proteína
351 sido um fiel marcador a infecções virais. E em relação a transferrina, descreve que a
352 mesma pode ter sua concentração diminuída em casos de lesão nos hepatócitos, doença
353 renal, leucemias e em processos inflamatórios. Já Jain, 1993 descreveu aumento da Ce em
354 processos inflamatórios, virais e parasitários. As descrições acima não corroboram com os
355 resultados presentes no estudos, fato este que reforça a hipótese que sucessivos
356 transplantes de MSCs são seguros e viáveis, independentemente da fonte celular utilizada.
357 Contudo, estudos clínicos em equinos com enfermidades neurológicas são necessários
358 para se avaliar a eficácia terapêutica do protocolo de transplante proposto.

359

360 **CONCLUSÕES**

361 O protocolo de transplantes intratecal de MSCs alogênicas pela via C1-C2,
362 mostrou-se seguro e viável. Os três tipos celulares utilizados demonstraram serem
363 seguros para a realização do transplante, indicando que qualquer uma das três fontes
364 pode ser utilizada.

365

366

367

368 **REFERÊNCIAS**

369 AGGARWAL, S.; PITTENGER, M.F.; Human mesenchymal stem cells modulate
370 allogenic immune cell response. *Transplantation* v.105, n.4, p.1815-1822, 2004

371 BARBERINI, D.J. *et al.* Equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose
372 tissue and umbilical cord: immunophenotypic characterization and differentiation
373 potential. *Stem Cell Res Ther*, v. 5, 2014.

374 BORJESSON, D.L.; PERONI, J.F. The Regenerative Medicine Laboratory: Facilitating
375 Stem Cell Therapy for Equine Disease. *Clinics in Laboratory Medicine*, v. 31, n. 1, p.
376 109-123, 2011. ISSN 0272-2712.

377 CARVALHO, A.D. *et al.* Use of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells for
378 Experimental Tendinitis Therapy in Equines. *J Equine Vet Sci*, v. 31, 2011.

- 379 CHEN, Y; SHAO, J.Z; XIANG, L.X; DONG, X.J; ZHANG, G.R. Mesenchymal stem
380 cells: A promising candidate in regenerative medicine. *Int J Biochem Cell Biol.*; 40:815-
381 20. 2008.
- 382 DE LAHUNTA, A.D. Cerebrospinal fluid and hydrocephalus. In: *Veterinary*
383 *neuroanatomy and clinical neurology*. 2 ed., Philadelphia: W.B.Sauders, p.30-32, 1983.
- 384 ECKERSALL, P.D. Proteins, Proteomics and Dysproteinemias. In: KANEKO, J.J.;
385 HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 6th ed.,
386 San Diego: Academic Press, p.117-155, 2008.
- 387 ECKERSALL, P.D.; BELL, R. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and
388 inflammation in veterinary medicine. *The Veterinary Journal*. v185.p 23-27. 2010.
- 389 FEITOSA, F.L.F. *Semiologia Veterinária: A arte do diagnóstico*. 2 ed. São Paulo: Roca.
390 2008.
- 391 FRISBIE, D.D.; SMITH, R.K.W., Clinical update on the use of mesenchymal stem cells
392 in equine orthopaedics. *Equine Vet J.*; 42:86-9. 2010.
- 393 GUTIERREZ-NIBEYRO, S.D. Commercial Cell-based Therapies for Musculoskeletal
394 Injuries in Horses. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, v. 27, n. 2, p.
395 363-371, 07/02/2013 2011.
- 396 JAIN, N.C. *Essentials of veterinary hematology*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993.
397 417p.
- 398 Jain, S, *et al*. Acute-phase proteins: As diagnostic tool. *J Pharm Bioallied Sci*. Jan; v. 3.
399 p. 118-27. 2011
- 400 KARUSSIS, D.; PETROU, P.; KASSIS, I. Clinical experience with stem cells and other
401 cell therapies in neurological diseases. *Journal of the Neurological Sciences*, v. 324, n.
402 1–2, p. 1-9, 2013. ISSN 0022-510X.
- 403 LAEMMLI, U K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of
404 Bacteriophage T4. *Nature*. v. 227, p. 680–685. 1970.
- 405 LOPES, S.T.A.; BIONDO, A.W.; SANTOS, A. P. *Manual de patologia clínica*
406 *veterinária*. Universidade Federal de Santa Maria. 3. ed. 2007.
- 407 MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSSHIOKA, M. Current research on acute phase
408 proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Vet. J*. v. 168, p. 28-40, 2004.
- 409 OLIVEIRA-FILHO, J.P. *et al*. Freund's adjuvant-induced inflammation: clinical
410 findings and its effect on hepcidin mRNA expression in horses. *Pesq. Vet. Bras.*, Rio de

411 Janeiro, v. 34, n. 1, p. 51-56, Jan. 2014. Disponível em:
412 <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2014000100009
413 &lng=en&nrm=iso>. Acessado em: 29 Mar. 2017.

414 PEASE, A.; BEHAN, A.; BOHART, G. ULTRASOUND-GUIDED CERVICAL
415 CENTESIS TO OBTAIN CEREBROSPINAL FLUID IN THE STANDING HORSE.
416 *Veterinary Radiology & Ultrasound*, v. 53, n. 1, p. 92-95, 2012. ISSN 1740-8261.

417 RADOSTITS, M.; GAY, C., BLOOD, C.; HINCHCLIFF, W.: *Clinica Veterinária: Um*
418 *Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Equinos*, 9ª ed. Rio de
419 Janeiro: Guanabara Koogan, p.1187-1189. 2002.

420 SAS Institute. 2011. *SAS/STAT User's Guide. Version 9.4*, SAS Institute Inc., Cary,
421 NC.

422 SMITH, L.L. Cytokine hypothesis of overtraining: a physiological adaptation to
423 excessive stress. *Medicine Science Sports Exercises*; v32; p 317-331. 2000.

424 STOCKHAM, S.L.; SCOTT, M.A. *Fundamentos de Patologia Clínica Veterinária*; Rio
425 de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011

426 THRALL, M.A. *et al. Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*; Rio de Janeiro:
427 Guanabara Koogan, 2015.

CAPITULO 3

CONCLUSÕES GERAIS

- No presente estudo o transplante celular através do espaço subaracnoideo, localizado entre as vertebrae C1-C2 mostrou-se seguro e aplicável, visto que não foram observados evidências de reações adversas após o transplante.
- Entre os grupos celulares, GCU, GMO e GTA, também não foram observadas diferenças que indicassem uma melhor fonte celular para a realização dos transplantes.
- A dose de 50 milhões de células e o protocolo proposto de três aplicações com intervalo de 30 dias, também mostrou-se viável e seguro.

REFERÊNCIAS

AGGARWAL, S.; PITTENGER, M.F.; **Human mesenchymal stem cells modulate allogenic immune cell response.** Transplantation v.105, n.4, p.1815-1822, 2004.

BARBERINI, D. J. **Caracterização Imunofenotípica e Potencial DE Diferenciação DE Células-Tronco Mesenquimais Provenientes de Medula Óssea, Tecido Adiposo e Cordão Umbilical De Equinos.** Botucatu, 2013. 80p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista

BARBERINI, D. J. et al. **Equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue and umbilical cord: immunophenotypic characterization and differentiation potential.** Stem Cell Res Ther, v. 5, 2014.

BARBERINI, D. J. **Avaliação do Transplante Intratecal de Células Tronco Mesenquimais Alogênicas em Equinos Sadios e Portadores de Sequelas Neurológicas.** 2017. 203 f. Tese de Doutorado - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

BORJESSON, D. L.; PERONI, J. F. **The Regenerative Medicine Laboratory: Facilitating Stem Cell Therapy for Equine Disease.** Clinics in Laboratory Medicine, v. 31, n. 1, p. 109-123, 2011. ISSN 0272-2712.

CAMPOS, L. L. et al. **Isolation, culture, characterization and cryopreservation of stem cells derived from amniotic mesenchymal layer and umbilical cord tissue of bovine fetuses.** Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 37, p. 278-286, 2017.

CARVALHO, A. M., et al. **Use of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells for Experimental Tendinitis Therapy in Equines.** J Equine Vet Sci, v. 31, 2011.

CÉRON, J.J.; ECKERSALL, P.D.; MARTÍNEZ-SUBIETA, S. **Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives.** Vet. Clin. Patol., v.34, p.85-89, 2005.

CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL. **Estudo do Complexo do Agronegócio Cavalo.** Brasília: CNA, Coletânea Estudos Gleba; 39; 68p; 2004

CHAMBERLAIN, G. et al. **Concise Review: Mesenchymal Stem Cells:** Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing. STEM CELLS, v. 25, n. 11, p. 2739-2749, 08/09/2012 2007.

CHEN Y, SHAO JZ, XIANG LX, DONG XJ, ZHANG GR. **Mesenchymal stem cells: A promising candidate in regenerative medicine.** Int J Biochem Cell Biol.; 40:815-20. 2008.

CRISMAN, V.M; SCARRATT, K.W; ZIMMERMAN, L.K; **Blood proteins and inflammation in the horse.** Veterinary Clinics Equine Practice. v24, p285-29, 2008.

DE LAHUNTA, A.D. **Cerebrospinal fluid and hidrocephalus.** In: Veterinary neuroanatomy and clinical neurology. 2 ed., Philadelphia: W.B.Sauders, p.30-32, 1983.

ECKERSALL, P.D. Proteins, Proteomics and Dysproteinemias. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals.** 6th ed., San Diego: Academic Press, p.117-155, 2008.

ECKERSALL, P.D.; BELL, R. **Acute phase proteins**: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *The Veterinary Journal*. v185.p 23-27. 2010.

FAGLIARI, J. J.; SILVA, S. L.; SILVA, P. C.; PEREIRA, G. T. **Leucograma e teores plasmáticos de proteínas de fase aguda de equinos portadores de abdômen agudo e submetidos a laparotomia**. *Arq. Bras. Med. Vet.Zootec*, v. 60, n. 2, p. 322- 328, 2008.

FAZIO, F.; ASSENZA, A.; TOSTO, F.; CASELLA, S.; PICCIONE, G.; CAOLLA, G. **Modifications of some acute phase proteins and the white blood cell count in thoroughbreds during training**. *Veterinary Record*, London, v. 167, n. 10, p. 370-373, 2010.

FRISBIE DD, SMITH R KW, **Clinical update on the use of mesenchymal stem cells in equine orthopaedics**. *Equine Vet J*.; 42:86-9. 2010.

GORDON, A. H. **Electrophoresis of proteins in polyacrylamide and starch gels**. New York: Elsevier Science Publishers, 1995. 213p.

GUTIERREZ-NIBEYRO, S. D. **Commercial Cell-based Therapies for Musculoskeletal Injuries in Horses**. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, v. 27, n. 2, p. 363-371, 07/02/2013 2011.

GRUYS, E. et al. **Acute phase reaction and acute phase proteins**. *Journal of Zhejiang University Science*. V 6b (11) p 1045-1056. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1390650/>>. Acesso em: 18 jun. 2013. doi:10,1631/jzus. 2005.B1045.

HORWITZ, E.M. et al, **Clarification of the nomenclature for MSC**: The International Society for Cellular Therapy position Statement. *Cytotherapy* (2005) Vol. 7, No. 5, 393-395

JACOBSEN, S. **Review of Equine Acute-Phase Proteins.** In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 53., 2007, Orlando, Florida. Proceedings... Orlando: University of Florida, 2007. v. 53, p. 230-235.

JACOBSEN, S. KJELGAARD-HANSEN, M; HAGBARD PETERSEN, H.; JENSEN, A.L; **Evaluation of commercially available human serum amyloid A(SAA) turbidometric immunoassay for determination of equine SAA concentration.** The Veterinary Journal., v 172, p 315-319, 2005.

JAIN, N. C. **Essentials of veterinary hematology.** Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 417p.

JANDIAL, R.; SINGEC, I.; DUENAS, V. J.; HO, A. L.; LEVY, M. L.; SNYDER, E. Y. **Central nervous system repair and stem cells.** International Congress Series, v. 1302, p. 154-163, 2007.

KARUSSIS, D.; PETROU, P.; KASSIS, I. **Clinical experience with stem cells and other cell therapies in neurological diseases.** Journal of the Neurological Sciences, v. 324, n. 1–2, p. 1-9, 2013. ISSN 0022-510X.

LOPES, S. T. A.; BIONDO, A. W.; SANTOS, A. P. **Manual de patologia clínica veterinária.** Universidade Federal de Santa Maria. 3. ed. 2007.

MAIA L, AMORIM RM, ALVARENGA FCL, ALVARENGA ML, JOAQUIM JGF, LIMA NETO JF, et al. **Uso de la terapia celular en el tratamiento de parálisis del nervio facial:** Reporte de caso. In: Anales del 2º Congreso Latinoamericano de Neurología Veterinaria; 2009,Bogotá. Bogotá: Neurolatinvet; 2009. p.1-6.

MAIA, L. et al. **Feasibility and safety of intrathecal transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in horses.** BMC Vet Res, v. 11, n. 1, p. 63, 2015.

MANGANAS, L.N.; MALETIC-SAVATIC, M. **Stem cell therapy for central nervous system demyelinating disease.** Current Neurology and Neuroscience Reports, v. 5, p. 225-231, 2005.

MANSENGH, F. C.; WRIDE, M. A.; RANCOURT, D. E. **Neurons, stem cells and potential therapies.** In. SELL, S. Stem Cells Handbook, New Jersey: Human Press, p. 526, 2004.

MARTI, L.C.; RIBEIRO, A.A.F.; HAMERSCHLAK, N. **O efeito imunomodulatório de células-tronco mesenquimais.** Einstein. 2011; 9 (2 Pt 1):224-8

MAYHEW IG. **Collection of cerebrospinal fluid from the horse.** Cornell Vet;65: 500-11.1975.

MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSSHIOKA, M. **Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview.** Vet. J. v. 168, p. 28-40, 2004.

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.

OLIVEIRA-FILHO, José P. et al. **Freund's adjuvant-induced inflammation: clinical findings and its effect on hepcidin mRNA expression in horses.** Pesq. Vet. Bras., Rio de Janeiro, v. 34, n. 1, p. 51-56, Jan. 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2014000100009&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 29 Mar. 2017.

PEASE, A.; BEHAN, A.; BOHART, G. **ULTRASOUND-GUIDED CERVICAL CENTESIS TO OBTAIN CEREBROSPINAL FLUID IN THE STANDING HORSE.** Veterinary Radiology & Ultrasound, v. 53, n. 1, p. 92-95, 2012. ISSN 1740-8261.

RADOSTITS, M.; GAY, C., BLOOD, C.; HINCHCLIFF, W.: **Clinica Veterinária: Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Eqüinos**, 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.1187-1189. 2002.

SAS Institute. 2011. SAS/STAT User's Guide. Version 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC.

SMITH, LL. **Cytokine hypothesis of overtraining: a physiological adaptation to excessive stress**. Medicine Science Sports Exercises; v32; p 317-331. 2000.

STOCKHAM, S.L.; SCOTT, M.A. **Fundamentos de Patologia Clínica Veterinária**; Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011

THRALL, M.A. et al. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**; Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015

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

ZHANG, J. et al. **The challenges and promises of allogeneic mesenchymal stem cells for use as a cell-based therapy**. Stem Cell Research & Therapy, v. 6, p. 234, 12/01/2015 2015.

ANEXOS

Tabela 1 - Valores hematológicos do grupo SHAM

Animal	Grupo	Momento	He	HG	HT	VCM	CHCM	PT	RDW	Plaquetas	Fibrinogênio
Unidade			10 ⁹ /UI	g/dL	%	FL	%	g/dL	%	/uL	mg/dL
Min-Max			6,4 – 10	11,0-17,0	32-47	39-52	31-35	5,8-8,7	18-22	100000 - 270.000	100 - 400
A1	SHAM	M0	6,52	11,1	32	49,1	34,7	6,6	20,4	202.000	400
		M1	6,55	10,8	34	51,9	31,8	6,4	20,2	200.000	400
		M30	8,2	13,2	38	47,4	34,7	7,8	10,1	218.000	600
		M31	6,57	11,2	33	50,2	33,9	6,8	20,2	217.000	400
		M60	6,53	11,2	33	50,5	33,9	6,6	19	217.000	400
		M61	6,14	10,4	31	50,5	33,5	6,4	19	212.000	600
		M90	6,18	10,5	32	51,8	32,8	6,4	18,1	196.000	400
A2	SHAM	M0	6,91	11,3	35	50,7	32,3	6,4	19,3	109.000	400
		M1	7,83	12,8	38	48,5	33,7	7,4	19,3	118.000	200
		M30	7,18	12,1	35	48,7	34,6	6,4	19,2	199.475	400
		M31	7,31	12,1	37	50,6	32,7	7,2	19,2	118.675	800
		M60	7,46	12,4	38	50,9	32,6	6,4	19,2	138.875	400
		M61	7,07	11,8	34	48,1	34,7	6,2	18,8	110.000	200
		M90	7,23	11,9	35	48,4	34	6,8	17,9	103.000	400
A3	SHAM	M0	5,27	9	27	51,2	33,3	6,2	18,6	189.000	200

Animal	Grupo	Momento	He	HG	HT	VCM	CHCM	PT	RDW	Plaquetas	Fibrinogênio
Unidade			10 ⁶ /UI	g/dL	%	FL	%	g/dL	%	/uL	mg/dL
Min-Max			6,4 – 10	11,0-17,0	32-47	39-52	31-35	5,8-8,7	18-22	100000 - 270.000	100 - 400
		M1	6,96	12	35	50,3	34,3	7,8	18,8	191.000	400
		M30	6,56	11,5	34	51,8	33,8	7	16,7	170.000	400
		M31	5,82	10,2	30	51,5	34	6,6	18,6	183.000	400
		M60	5,92	10,1	30	50,7	33,7	6,6	18	180.000	400
		M61	5,74	9,8	30	52,3	32,7	6,8	18,1	182.000	400
		M90	6,1	10,5	31	50,8	33,9	6,8	17,7	152.000	600
A4	SHAM	M0	11,01	17,7	51	46,3	34,7	7,6	18,1	149.000	400
		M1	8,68	14,2	41	47,2	34,6	6,4	17,9	140.000	200
		M30	7,78	13	38	48,8	34,2	5,8	17,6	161.000	200
		M31	8,23	12,7	39	47,4	32,6	6,2	17,3	178.000	400
		M60	8,58	14,6	42	49	34,8	6,5	17,4	145.000	200
		M61		15,5	45		34,4	6,8		118.675	200
		M90	9,3	14,7	42	45,2	35	6,2	16,3	120.000	400

Tabela 2 - Valores hematológicos do grupo tecido adiposo

Animal	Grupo	Momento	He	HG	HT	VCM	CHCM	PT	RDW	Plaquetas	Fibrinogênio
Unidade			10 ⁹ /uL	g/dL	%	FL	%	g/dL	%	/uL	mg/dL
Min-Max			6,4 - 10	11,0-17,0	32-47	39-52	31-35	5,8-8,7	18-22	100000 - 270.000	100 - 400
A5	GTA	M0	8,27	11,6	34	41,1	34,1	7	21,7	245.000	400
		M1	10,28	13,9	41	39,9	33,9	7	21,4	272.000	200
		M30	9,76	13,1	40	41	32,8	6,4	20,8	174.225	200
		M31	7,96	10,7	32	40,1	33,4	6,4	20,3	181.800	200
		M60	8,46	11,16	34	40,2	34,1	6,6	19,6	181.000	200
		M61		12,9	37		35	7,5		143.925	600
		M90	8,28	11,9	35	42,3	34	6,4	21,2	182.000	400
A6	GTA	M0	7,18	12,3	36	50,1	34,2	6,2	18,6	138.000	600
		M1	6,89	11,8	34	49,3	34,7	6,4	18,3	103.000	400
		M30	7,88	13,2	38	48,2	34,7	6,4	17,8	150.000	200
		M31	7,1	11,9	36	50,7	33,1	6,4	17,7	183.000	200
		M60	7,64	12,7	39	51	32,6	6,4	17,9	129.000	400
		M61	7,8	13,1	38	48,7	34,5	6,6	17,8	115.000	200
		M90		14,8	40		37	6,8		103.525	400
A7	GTA	M0	6,68	11,8	34	50,9	34,7	6,8	18,5	181.000	400

Animal	Grupo	Momento	He	HG	HT	VCM	CHCM	PT	RDW	Plaquetas	Fibrinogênio
Unidade			10 ⁶ /uL	g/dL	%	FL	%	g/dL	%	/uL	mg/dL
Min-Max			6,4 - 10	11,0-17,0	32-47	39-52	31-35	5,8-8,7	18-22	100000 - 270.000	100 - 400
		M1	6,93	12,2	36	51,9	33,9	7	19,1	178.000	400
		M30	7,04	12,6	36	51,1	35	6,8	19,1	209.000	400
		M31	8,47	12,6	36	42,5	35	7,6			
		M60	7,55	13,8	43	57	32,1	6,8	18,8	184.000	200
		M61	5,94	12,8	37	53,3	34,6	6,8	18,5	214.000	200
		M90		15	43		34,9	6,8			200
A8	GTA	M0	5,88	9,5	28	47,6	33,9	6,6	17,9	190.000	800
		M1	6,68	10,9	3	49,4	33	6,4	17,7	206.000	400
		M30	6,57	10,5	31	47,2	33,9	6,6	17,7	225.000	200
		M31	6,81	11,1	33	48,5	33,6	6,8	17,9	187.000	200
		M60	7,73	12,8	38	49,2	33,7	6,2	17,6	214.000	200
		M61	7,68	12,6	36	46,9	35	7,4	17,7	197.000	600
		M90		12,2	35		34,9	6,2			200

Tabela 3 - Valores hematológicos do grupo medula óssea

Animal	Grupo	Momento	He	HG	HT	VCM	CHCM	PT	RDW	Plaquetas	Fibrinogênio
Unidade			10 ⁹ /uL	g/dL	%	FL	%	g/dL	%	/uL	mg/dL
Min-Max			6,4 - 10	11,0-17,0	32-47	39-52	31-35	5,8-8,7	18-22	100000 - 270.000	100 - 400
A9	GMO	M0	6,87	11,7	34	49,5	34,4	7,8	17,9	184.000	200
		M1	7,79	13,3	40	51,3	33,3	7,6	17,8	183.000	200
		M30	7,8	11,8	38	48,7	31,1	7	16,9	214.000	200
		M31	6,61	11,8	33	49,9	35,8	7,6	16,9	197.000	800
		M60	6,38	11,1	33	51,7	33,6	6	16,4	134.000	200
		M61	7,16	12,7	37	51,7	34,3	6,8	16,7	102.000	400
		M90	7,17	10,5	31	43,2	33,9	5,8		242.400	200
A10	GMO	M0	6,82	11,1	33	48,4	33,6	6,2	19,7	174.000	400
		M1	7,48	12,4	38	50,8	32,6	7	19,7	179.000	400
		M30	7,24	11,8	34	47	34,7	6,4	18,5	235.000	200
		M31	7,18	12	35	48,7	34,3	6,2	18,5	206.000	400
		M60	6,52	9,8	38	58,3	25,8	5,6			200
		M61	7,6	12,9	37	48,7	34,9	5,8	18	188.000	200
		M90	9,32	13,2	38	41	35	6		257.550	400
A11	GMO	M0	5,91	10,1	30	50,8	33,7	6,8	19	171.000	400

Animal	Grupo	Momento	He	HG	HT	VCM	CHCM	PT	RDW	Plaquetas	Fibrinogênio
Unidade			10 ⁶ /uL	g/dL	%	FL	%	g/dL	%	/uL	mg/dL
Min-Max			6,4 - 10	11,0-17,0	32-47	39-52	31-35	5,8-8,7	18-22	100000 - 270.000	100 - 400
		M1	5,57	9,5	28	50,3	33,9	6,8	14,4	148.000	400
		M30	5,75	9,6	29	50,4	33,1	7	17,8	216.000	200
		M31	5,51	9,8	28	50,8	34,3	7	18,1	192.000	400
		M60	7,45	12,6	37	49,7	34,1	6	17,5	189.000	200
		M61	7,42	12,5	36	48,5	35	7,4	17,9	182.000	200
		M90	9,97	13	39	39,1	33,3	6,6		181.800	200
A12	GMO	M0	6,41	10,9	33	51,5	33	6,4	18,2	223.000	400
		M1	6,64	11,7	34	51,2	34,4	7	18,3	197.000	600
		M30	6,44	11	33	51,2	33,3	6	17,7	202.000	200
		M31	6,39	11,2	33	51,6	33,9	6	17,3	205.000	400
		M60	6,32	10,9	32	50,6	34,1	5,6	17,8	229.000	600
		M61	6,61	11,4	34	51,4	33,5	5,8	17,5	215.000	200
		M90	9,28	12,6	37	39,9	34,1	6,2		244.925	400

Tabela 4 – Valores hematológicos do grupo cordão umbilical

Animal	Grupo	Momento	He	HG	HT	VCM	CHCM	PT	RDW	Plaquetas	Fibrinogênio
Unidade			10 ⁶ /uL	g/GL	vg%	GL	%	g/GL	%	uL	mg/GL
Min-Max			6,4 - 10	11,0-17,0	32-47	39-52	31-35	5,8-8,7	18-22	100000 - 270.000	100 - 400
A13	GCU	M0	6,96	11,1	33	47,5	33,6	5,8	19,1	237.350	200
		M1	6,42	10,3	32	49,8	32,2	6,4	18,8	231.000	400
		M30	7,04	11,2	33	46,9	33,9	6,4	17,7	237.000	200
		M31	7,52	12,2	36	47,9	33,9	7	17,9	249.000	400
		M60	8	12,7	40	50	31,8	6,2	17	198.000	200
		M61	8,16	13	39	47,8	33,3	6,4	16,8	143.925	600
		M90	6,29	10,6	31	49,3	34,2	5,6	17,7	173.000	400
A14	GCU	M0	8,42	11,4	33	39,2	34,5	6,8	19,6	366.125	200
		M1	8,09	11,1	32	39,6	34,7	8,4	20,5	244.925	600
		M30	6,86	9,9	30	43,7	33	6	18,7	248.000	200
		M31	7,33	10,7	31	42,3	34,5	6	18,8	189	200
		M60	7,08	10,7	32	45,2	33,4	6,4	19,8	188.000	400
		M61	8,64	12,8	37	42,8	34,6	7,4	20,3	214.000	400
		M90	7,72	11,4	34	44	33,5	6,6	21,1		
A15	GCU	M0	6,84	10,9	32	46,8	34,1	6,8	19,2	214.000	400
		M1	5,93	10,4	30	50,6	34,7	6,8	18,5	227.000	400

Animal	Grupo	Momento	He	HG	HT	VCM	CHCM	PT	RDW	Plaquetas	Fibrinogênio	
Unidade			10 ⁶ /uL	g/GL	vg%	GL	%	g/GL	%		uL	mg/GL
Min-Max			6,4 - 10	11,0-17,0	32-47	39-52	31-35	5,8-8,7	18-22		100000 - 270.000	100 - 400
		M30	7,09	13,7	36	50,8	38,1	7,2	18		276.000	200
		M31	7,1	12,4	36	50,7	34,4	7,6	17,8		259.000	200
		M60	7	12,6	36	51,4	35	7,2	16,9		232.000	200
		M61	6,83	11	35	51,2	31,4	7	16,9		218.000	400
		M90	6,6	11,8	34	51,5	34,7	7,2	17,5		153.000	400
A16	GCU	M0	6,97	11,4	33	47,3	34,5	6,2	20,3		178.000	400
		M1	6,88	11,1	33	48	33,6	6,4	19,9		192.000	200
		M30	7,42	12,4	33	48,5	34,4	6,4	19,5		215.000	200
		M31	7,38	11,9	36	48,8	33,1	6,4	19,3		252.000	200
		M60	7,84	12,9	37	47,2	34,9	6,4	18,6		179.000	200
		M61	7,68	12	38	49,5	31,6	7	18,7		180.000	600
		M90	7,43	12,8	37	49,8	34,6	6,2	19,2		142.000	600

Tabela 5 - Valores de leucograma do grupo SHAM

Animal	Grupo	Momento	Metarrubricitos	Leucócitos	Mielocitos	Metamielócitos	Bastonetes	Segmentados	Linfócitos	Eosinófilos	Basófilos	Monócitos	Reticulócitos	Obs.
UN			/100	10 ⁹ /uL									x10 ⁶	
Min				0	5,2 - 13,9	0 - 0	0 - 0	0 - 100	2700 - 6700	1700 - 5300	0 - 600	0 - 300	0 - 900	
Max														
A1	SHAM	M0	0	7,2	0	0	0	0	4,2	2,3	0,4	0,1	0,2	0 NC
		M1	0	7,8	0	0	0	0	4,9	2,3	0,2	0,1	0,3	0 NC
		M30	0	6,9	0	0	0	0	4,2	2,2	0,1	0,1	0,3	0 NC
		M31	0	7,7	0	0	0	0	4,5	2,6	0,2	0,2	0,2	0 NC
		M60	0	8	0	0	0	0	5,3	2,3	0,1	0,1	0,2	0 NC
		M61	0	7,4	0	0	0	0	4,4	2,7	0,1	0	0,1	0 NC
		M90	0	7	0	0	0	0	4,8	2	0,2	0	0,1	0 NC
A2	SHAM	M0	0	5,1	0	0	0	0	2,8	1,7	0,3	0,1	0,2	0 NC
		M1	0	6,7	0	0	0	0	5	1,7	0	0	0,1	0 DA
		M30	0	6,3	0	0	0	0	3,4	2,4	0,2	0,1	0,3	0 NC
		M31	0	5,6	0	0	0	0	3,6	1,5	0,3	0	0,3	0 NC
		M60	0	5,7	0	0	0	0	3,4	1,9	0,2	0,1	0,1	0 NC
		M61	0	5,7	0	0	0	0	3,5	1,8	0,1	0	0,3	0 NC

Animal	Grupo	Momento	Metarrubricitos	Leucócitos	Mielocitos	Metamielócitos	Bastonetes	Segmentados	Linfócitos	Eosinófilos	Basófilos	Monócitos	Reticulócitos	Obs.
UN			/100	10 ³ /uL									x10 ⁶	
Min			0	5,2 - 13,9	0 - 0	0 - 0	0 - 100	2700 - 6700	1700 - 5300	0 - 600	0 - 300	0 - 900		
Max														
		M90	0	5	0	0	0	2,4	2,7	0,1	0	0,1	0	NC
A3	SHAM	M0	0	5,4	0	0	0	3,1	1,8	0,1	0,1	0,3	0	NC
		M1	0	6,5	0	0	0	4,3	1,9	0,1	0,1	0,1	0	NC
		M30	0	6	0	0	0	2,7	1,1	0	0	0	0	NC
		M31	0	5,9	0	0	0	3,9	1,8	0,1	0	0,2	0	NC
		M60	0	5,4	0	0	0	2,9	1,7	0	0,1	0,2	0	NC
		M61	0	6,8	0	0	0	5,1	1,5	0	0,1	0,1	0	NC
		M90	0	5,6	0	0	0	3,4	1,8	0,2	0	0,1	0	NC
A4	SHAM	M0	0	6,5	0	0	0	3,1	3,1	0,1	0,1	0,2	0	NC
		M1	0	8	0	0	0	3,7	3,9	0,1	0	0,3	0	NC
		M30	0	8	0	0	0	3,4	4,3	0	0,1	0,2	0	NC
		M31	0	8,1	0	0	0	3,7	4,1	0,1	0,1	0,2	0	NC
		M60	0	7,8	0	0	0	3,2	3,8	0,2	0	0,6	0	F
		M61	0	8,6	0	0	0	4,2	3,7	0,1	0	0,6	0	C
		M90	0	8	0	0	0	4,1	3,3	0,4	0,2	0,1	0	NC

Tabela 6 - Valores de leucograma do grupo tecido adiposo

Animal	Grupo	Momento	Metarrubricitos	Leucócitos	Mielocitos	Metamielócitos	Bastonetes	Segmentados	Linfócitos	Eosinófilos	Basófilos	Monócitos	Reticulócitos	Obs.
UN			/100	10 ⁹ /uL									x10 ⁶	
													/uL	
				0	5,2 - 13,9	0 - 0	0 - 0	0 - 100	2700 - 6700	1700 - 5300	0 - 600	0 - 300	0 - 900	
				Min										
				Max										
A5	GTA	M0	0	8,9	0	0	0	3,6	5	0,1	0	0,3	0	NC
		M1	0	10,5	0	0	0	4,3	5	0,4	0	0,7	0	NC
		M30	0	10,1	0	0	0	3,3	6,2	0,2	0	0,1	0	NC
		M31	0	9,6	0	0	0	5,8	3,6	0,2	0	0,1	0	NC
		M60	0	8,7	0	0	0	3,2	4,3	0,9	0,1	0,3	0	NC
		M61	0	9	0	0	0	4,9	3,2	0,3	0	0,7	0	C
		M90	0	9,6	0	0	0	4	4,7	0,8	0	0,1	0	NC
A6	GTA	M0	0	9,9	0	0	0	6,1	3,2	0,2	0,1	0,3	0	NC
		M1	0	8	0	0	0	3,4	3,9	0,3	0	0,4	0	NC
		M30	0	6,8	0	0	0	3,7	2,2	0,7	0	0,2	0	NC
		M31	0	7,8	0	0	0	4	3,2	0,3	0,1	0,2	0	NC
Animal	Grupo	Momento	Metarrubricitos	Leucócitos	Mielocitos	Metamielócitos	Bastonetes	Segmentados	Linfócitos	Eosinófilos	Basófilos	Monócitos	Reticulócitos	Obs.

UN		/100	10 ³ /uL								x10 ⁶		
Min		0	5,2 - 13,9	0 - 0	0 - 0	0 - 100	2700 - 6700	1700 - 5300	0 - 600	0 - 300	0 - 900		
Max													
	M60	0	7,2	0	0	0	2,7	4,1	0,1	0,1	0,1	0	NC
	M61	0	7,8	0	0	0	4,3	3,2	0,2	0	0,2	0	NC
	M90	0	6,9	0	0	0	3,1	3,3	0,3	0,1	0,1	0	NC
A7	GTA	M0	9,5	0	0	0	5	3,9	0,3	0	0,3	0	NC
	M1	0	8,8	0	0	0	3,3	5,1	0,1	0	0,4	0	NC
	M30	0	8,3	0	0	0	4,1	3,7	0,2	0	0,2	0	NC
	M31	0	7,1	0	0	0	3,6	2,7	0,3	0,3	0,3	0	AF
	M60	0	9,4	0	0	0	4,6	4,4	0,2	0	0,2	0	NC
	M61	0	8,4	0	0	0	3,7	4,6	0	0	0,1	0	NC
	M90	0	10,5	0	0	0	2,9	7,3	0,2	0	0,2	0	NC
A8	GTA	M0	5,9	0	0	0	3,7	1,8	0,1	0,1	0,2	0	NC
	M1	0	6,2	0	0	0	4,1	1,6	0,2	0,1	0,2	0	NC
	M30	0	6,7	0	0	0	4,4	1,9	0,2	0,1	0	0	NC
	M31	0	5,8	0	0	0	3	2,3	0,3	0,1	0,1	0	NC
	M60	0	7,3	0	0	0	4,7	2,6	0	0	0	0	NC
	M61	0	6,5	0	0	0	4,4	2	0,1	0	0,1	0	NC
	M90	0	9,5	0	0	0	5,6	2,9	0,3	0,1	0,3	0	NC

Tabela 7 - Valores de leucograma do grupo medula óssea

Animal	Grupo	Momento	Metarrubricitos	Leucócitos	Mielocitos	Metamielócitos	Bastonetes	Segmentados	Linfócitos	Eosinófilos	Basófilos	Monócitos	Reticulócitos	Obs.
UN			/100	10 ³ /uL									x10 ⁶	
Min	Max		0	5,2 - 13,9	0 - 0	0 - 0	0 - 100	2700 - 6700	1700 - 5300	0 - 600	0 - 300	0 - 900		
A9	GMO	M0	0	7,4	0	0	0	3,8	3	0,1	0,1	0,4	0	NC
		M1	0	7	0	0	0	3,1	3,2	0,2	0,1	0,4	0	NC
		M30	0	6,3	0	0	0	2	4,1	0	0	0,2	0	NC
		M31	0	7,9	0	0	0	3,6	3,7	0,1	0,1	0,4	0	NC
		M60	0	6,1	0	0	0	3,1	2,8	0,1	0	0,1	0	NC
		M61	0	8,3	0	0	0	4,9	3,2	0,1	0	0,1	0	NC
		M90	0	7,4	0	0	0	3,8	3,3	0,1	0,1	0,1	0	NC
A10	GMO	M0	0	8,1	0	0	0	3,9	3,6	0,2	0,2	0,2	0	NC
		M1	0	6,7	0	0	0	3,2	2,7	0,1	0,1	0,5	0	NC
		M30	0	7,2	0	0	0	3,7	2,6	0,7	0	0,2	0	NC
		M31	0	9,7	0	0	0	5,5	3,9	0,2	0,1	0	0	NC
A11	GMO	M0	0	7,6	0	0	0	4,7	2,4	0,2	0,2	0,2	0	NC
		M1	0	6	0	0	0	3,4	2,2	0,1	0	0,4	0	NC

Animal	Grupo	Momento	Metarrubricitos	Leucócitos	Mielocitos	Metamielócitos	Bastonetes	Segmentados	Linfócitos	Eosinófilos	Basófilos	Monócitos	Reticulócitos	Obs.
			/100	10 ³ /uL									x10 ⁶	
		Min Max	0	5,2 - 13,9	0 - 0	0 - 0	0 - 100	2700 - 6700	1700 - 5300	0 - 600	0 - 300	0 - 900		
		M30	0	5,6	0	0	0	3	2,2	0,2	0,1	0,2	0	NC
		M31	0	6,5	0	0	0	4,2	2,1	0,1	0	0,1	0	NC
		M60	0	5,5	0	0	0	3	2,1	0,2	0	0,2	0	NC
		M61	0	6,8	0	0	0	3,6	3,1	0,1	0,1	0	0	NC
		M90	0	8,5	0	0	0	4,1	3,1	0	0,3	1	0	NC
A12	GMO	M0	0	6	0	0	0	3,3	2,2	0,2	0,1	0,2	0	NC
		M1	0	6	0	0	0	3,4	2,2	0,1	0	0,4	0	NC
		M30	0	5,6	0	0	0	3	2,2	0,2	0,1	0,2	0	NC
		M31	0	6,5	0	0	0	4,2	2,1	0,1	0	0,1	0	NC
		M60	0	5,5	0	0	0	3	2,1	0,2	0	0,2	0	NC
		M61	0	6,8	0	0	0	3,6	3,1	0,1	0,1	0	0	NC
		M90	0	8,5	0	0	0	4,1	3,1	0	0,3	1	0	NC

Nota: Legenda das abreviações da coluna Obs.: Obs.: Observações; NC: Nada Consta; DA: Discreta anisocoria; F: Fibrinogênio menor que 200mg/dL; C: Contagem de hemácias e RDW não realizadas; AF: Amostra com fibrina; H: Hematimetria repetida.

Tabela 8 - Valores de leucograma do grupo cordão umbilical

Animal	Grupo	Momento	Metarrubricitos	Leucócitos	Mielocitos	Metamielócitos	Bastonetes	Segmentados	Linfócitos	Eosinófilos	Basófilos	Monócitos	Reticulócitos	Obs.
UN			/100	10 ³ /uL									x10 ⁵	
Min	Max		0	5,2 - 13,9	0 - 0	0 - 0	0 - 100	2700 - 6700	1700 - 5300	0 - 600	0 - 300	0 - 900		
A13	GCU	M0	0	6,9	0	0	0	3,3	3,2	0,3	0	0,1	0	NC
		M1	0	7,8	0	0	0	4	3,6	0	0	0,2	0	NC
		M30	0	6,9	0	0	0	3,1	3,2	0,3	0	0,3	0	NC
		M31	0	9	0	0	0	5,9	2,3	0	0	0,8	0	NC
		M60	0	7	0	0	0	3,5	2,7	0,1	0,1	0,6	0	NC
		M61	0	6,2	0	0	0	3,5	2,2	0,1	0	0,4	0	NC
		M90	0	6,5	0	0	0	2,3	3,6	0,5	0	0,1	0	NC
A14	GCU	M0	0	9,7	0	0	0	4,9	4,4	0,1	0,1	0,3	0	NC
		M1	0	8,7	0	0	0	3,1	4,8	0,2	0,1	0,5	0	NC
		M30	0	9,2	0	0	0	4,6	4	0	0	0,6	0	NC
		M31	0	10,6	0	0	0	6,1	3,6	0	0	0,8	0	NC
		M60	0	9,9	0	0	0	4,3	5,4	0	0	0,2	0	NC
		M61	0	11	0	0	0	5,6	4,7	0,1	0,1	0,4	0	NC
		M90	0	11,9	0	0	0	6,7	4,8	0	0	0,5	0	AF

Animal	Grupo	Momento	Metarrubricitos	Leucócitos	Mielocitos	Metamielócitos	Bastonetes	Segmentados	Linfócitos	Eosinófilos	Basófilos	Monócitos	Reticulócitos	Obs.
			/100	10 ⁹ /uL									x10 ⁶	
													/uL	
		Min Max	0	5,2 - 13,9	0 - 0	0 - 0	0 - 100	2700 - 6700	1700 - 5300	0 - 600	0 - 300	0 - 900		
A15	GCU	M0	0	8,4	0	0	0	3,7	4	0,4	0	0,3	0	NC
		M1	0	9	0	0	0	3,4	5,1	0,2	0	0,3	0	NC
		M30	0	9,5	0	0	0	3,8	5,7	0	0	0	0	H
		M31	0	9	0	0	0	3,9	5	0	0	0,1	0	NC
		M60	0	9,2	0	0	0	4	4,7	0,4	0	0,2	0	NC
		M61	0	9,8	0	0	0	6,1	3	0,3	0	0,4	0	NC
		M90	0	7,8	0	0	0	3,9	3,4	0,5	0	0,1	0	NC
A16	GCU	M0	0	8,6	0	0	0	3,4	4,7	0	0,1	0,3	0	NC
		M1	0	10,1	0	0	0	6,1	33	0	0	0,7	0	NC
		M30	0	8,5	0	0	0	3,5	4,5	0,2	0	0,3	0	F
		M31	0	13,1	0	0	0	8,5	4,2	0	0	0,4	0	NC
		M60	0	8,6	0	0	0	4	4,4	0,1	0	0,1	0	NC
		M61	0	13,5	0	0	0	7,6	4,6	0,1	0,3	0,9	0	NC
		M90	0	7,5	0	0	0	3,5	3,8	0,2	0	0,1	0	NC

Nota: Legenda das abreviações da coluna Obs.: Obs.: Observações; NC: Nada Consta; DA: Discreta anisocoria; F: Fibrinogênio menor que 200mg/dL; C: Contagem de hemácias e RDW não realizadas; AF: Amostra com fibrina; H: Hematimetria repetida.

Tabela 9 Valores de IOD das proteínas de fase aguda, ceruloplasmina, transferrina e Haptoglobina para o grupo SHAM

Animal	Grupo	Momento	Ceruloplasmina	Transferrina	Haptoglobina
			IOD	IOD	IOD
A1	SHAM	M0	32,603	174,51	57,76
		M1	34,457	360,94	127,14
		M30		211,36	126,27
		M31	70,646	228,63	135,66
		M60		108,92	79,954
		M61	73,634	867,78	153,02
		M90			
A2	SHAM	M0		191,17	268,61
		M1	169,96	153,39	363,05
		M30		264,19	198,64
		M31	13,444	512,39	100,46
		M60	31,028	290,11	96,72
		M61		230,21	96,789
		M90		347,96	229,74
A3	SHAM	M0		148,89	103,82
		M1		412,84	
		M30		263,21	81,832
		M31	88,233		81,989
		M60	131,01	10,708	122,07
		M61	44,677	356,6	216,82
		M90	27,267	166,35	173,9
A4	SHAM	M0	25,775	254,75	21,012
		M1		187,1	
		M30		268,1	94,868
		M31		247,83	114,69
		M60	33,667	152,8	129,37
		M61	25,767	297,31	122,23
		M90	51,78	424,06	84,002

Tabela 10 Valores de IOD das proteínas de fase aguda, ceruloplasmina, transferrina e Haptoglobina para o grupo tecido adiposo

Animal	Grupo	Momento	Ceruloplasmina	Transferrina	Haptoglobina		
			IOD	IOD	IOD		
A5	GTA	M0	70,004	611,83	77,634		
		M1	92,25	915,3	146,87		
		M30		227,46			
		M31	87,705	685,11	352,48		
		M60	45,583	493,26	194,8		
		M61	58,58	357,18	257,4		
		M90		250,87	18,128		
		A6	GTA	M0	91,076	155,5	69,636
				M1		1042,6	9663,2
M30				144,73	158,36		
M31	22,246			34,902	42,449		
M60	21,134			323,17	138,61		
M61				211,96	172,52		
M90				299,29	184,57		
A7	GTA			M0	80,705	772,45	20,103
				M1		255,22	39,835
		M30	23,708	255,1	79,999		
		M31	179,42	436,52	57,79		
		M60	43,369	790,54	90,745		
		M61	109,85	180,9	564,91		
		M90	65,738	165,51	300,84		
		A8	GTA	M0	155,71	142,78	219,82
				M1	155,29	161,94	257,1
M30	74,789			231,3	164,01		
M31	98,033			171,73	393,51		
M60	136,81			151,25	453,76		
M61					251,8		
M90	45,624			45,45	166,18		

Tabela 11 Valores de IOD das proteínas de fase aguda, ceruloplasmina, transferrina e Haptoglobina para o grupo medula óssea

Animal	Grupo	Momento	Ceruloplasmina	Transferrina	Haptoglobina
			IOD	IOD	IOD
A9	GMO	M0		75,139	23,445
		M1	92,391	561,03	929,02
		M30	567,24	114,73	360,77
		M31	137,16	63,945	2928,8
		M60	139,83	487,93	691,28
		M61	55,676	103,34	27,23
		M90			131,56
A10	GMO	M0	69,366	1009,5	144,4
		M1	107,93	77,192	47,591
		M30	116,29	160,41	79,295
		M31	670,59	3723,1	287,68
		M60			44,224
		M61			
		M90	161,67	98,624	444,64
A11	GMO	M0			
		M1	89,715	19,41	327,61
		M30		102,29	105,78
		M31	109,66	202,3	475,86
		M60	46,221	83,867	969,41
		M61	61,703	84,219	213,63
		M90			210,82
A12	GMO	M0	139,44	235,85	400,25
		M1			194,8
		M30	100,59	155,28	30,973
		M31	167,78	202,46	213,48
		M60	108,66	143,12	367,16
		M61	100,33	455,53	168,31
		M90	104,4	471,3	122,35

Tabela 12 Valores de IOD das proteínas de fase aguda, ceruloplasmina, transferrina e Haptoglobina para o grupo cordão umbilical

Animal	Grupo	Momento	Ceruloplasmina	Transferrina	Haptoglobina
			IOD	IOD	IOD
A13	CU	M0	119,39	782,88	171,95
		M1	45,88	248,68	164,57
		M30	93,04	1025,5	125,41
		M31	1018,2	802,61	94,458
		M60	89,958	390,82	325,57
		M61	32,94	409,21	197,37
		M90	47,55	33,526	
A14	GCU	M0	31,989	293,6	95,016
		M1	69,675	663,85	295,16
		M30	39,709	548,32	206,63
		M31	50,321		150,53
		M60	13,351	414,12	135,12
		M61	51,7		157,72
		M90	66,717	374,77	147,26
A15	GCU	M0	360,49	1022,4	464,92
		M1	61,137	576,73	312,33
		M30		651,99	626,61
		M31	96,652	900,11	1026,6
		M60	83,599	1107,1	101,55
		M61	81,164	1024,5	12,101
		M90	56,006	770,89	205,25
A16	GCU	M0	57,424	1007	598,72
		M1	141,42	950,91	219,12
		M30	123,12	922,08	24,367
		M31	510,32	342,38	319,55
		M60		218,44	
		M61	182,43	1125,5	679,8
		M90	104,06	759,79	10,436

