

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 25/02/2018.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA LOCAL
APÓS APLICAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO
MESENQUIMAIS ALOGÊNICAS EM TENDÃO FLEXOR
DIGITAL SUPERFICIAL DE EQUINOS

JAQUELINE BRANDÃO DE SOUZA

Botucatu/SP
Fevereiro de 2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA LOCAL
APÓS APLICAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO
MESENQUIMAIS ALOGÊNICAS EM TENDÃO FLEXOR
DIGITAL SUPERFICIAL DE EQUINOS

JAQUELINE BRANDÃO DE SOUZA

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-graduação em
Biotecnologia Animal para
obtenção do título de Mestre

Orientadora: Profa. Dra. Ana Liz Garcia Alves

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

Souza, Jaqueline Brandão de.

Avaliação da resposta inflamatória local após aplicação de células tronco mesenquimais alogênicas em tendão flexor digital superficial de equinos / Jaqueline Brandão de Souza. - Botucatu, 2016

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

Orientador: Ana Liz Garcia Alves

Capes: 50501070

1. Equino - Doenças. 2. Células-tronco. 3. Tendões - Inflamação. 4. Pesquisa imunológica. 5. Mudança de hábitos.

Palavras-chave: Alogênica; Células tronco mesenquimais; Equino; Inflamação; Reação imunológica .

Nome do autor: Jaqueline Brandão de Souza

Título: Avaliação da resposta inflamatória local após aplicação de células tronco mesenquimais alogênicas em tendão flexor digital superficial de equinos.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Ana Liz Garcia Alves
Presidente e Orientadora
Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia UNESP Botucatu

Profa. Renee Laufer Amorim
Membro da banca
Departamento de Clínica Veterinária
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia UNESP Botucatu

Profa. Anna Paula Balesdent Barreira
Membro da banca
Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ)

Data da defesa: 25 de fevereiro de 2016.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus meu grande protetor e guia. Sem ele nada seria possível. Ele me permite ter fé na vida, mesmo nos dias atuais.

Aos meus pais, José Braz de Souza e Aurea Donizeti Brandão de Souza que sempre me apoiaram em minhas decisões ajudando a torná-las possível.

A minha avó Maria Gomes de Souza por ajudar na minha criação e a minha querida tia Sônia Aparecida de Souza, pelo apoio e incentivo ao longo da trajetória.

A minha irmã Letícia Brandão de Souza que sempre me inspirou e inspira mostrando que a vida é muito mais do que podemos imaginar.

A minha família amada de Caraguatatuba, Jonas Prado Cervoni, Sônia Macedo do Prado Cervoni, João Carlos Cervoni e Júlia Prado Cervoni que mesmo a distância se mantêm presentes em minha vida e são grandes inspirações para mim, pessoas de luz e alma gentil.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de Mestrado e pronto atendimento às dúvidas durante o Processo 2013/17880-3.

Agradeço a Deus por me guiar e me iluminar em momentos que precisei e preciso.

Aos animais: Upper, Armlock, Spider, Trovão, Minotauro, Jagunço, Safira, Samôa e Kira, que sem eles não seria possível.

Meus amados pais e minha família, presentes em minha vida.

Aos meus amigos queridos que me deram força ao longo do caminho, em especial a minha amiga Mirian Rodrigues, por sempre me ouvir e aconselhar em momentos difíceis; à Marina Landim Alvarenga que muito me ajudou durante o experimento, uma amiga querida; à Ana Lúcia Miluzzi Yamada por me ensinar muito do que ela sabe e sempre me orientar quando precisei; ao Carlos Eduardo Fonseca Alves por me ensinar a técnica de imunoistoquímica, ter paciência durante todo o processo, ser tão atencioso e carinhoso, graças a ele um momento que eu acreditava ser tão complexo e trabalhoso tornou-se divertido e emocionante, hoje adoro a técnica e tudo que ela pode nos acrescentar. Ao João Pedro Hubbe Pfeifer e Vitor Hugo dos Santos pela presença ativa e grande ajuda com os animais ao longo do experimento; ao Gustavo Viana pela contribuição na parte de imagem e pela grande amizade; à Bianca Paola Santarosa pela amizade, paciência em ouvir minhas aflições e pelos conselhos concedidos com carinho e amor; à Clotilde Gonçalves de Oliveira pela paciência, carinho e força; aos residentes Gustavo dos Santos Rosa, Carolina Mura Ramos, Marília Ferrari Marsiglia e Caio Nunes de Barros pelo carinho, amizade, além da paciência e ajuda; à Mariana Werneck Fonseca pela amizade, paciência e ajuda com os animais quando precisei e ao José Castilho pela participação no trabalho como anestesista, pela amizade e gentileza, além do humor, tornando parte do trabalho mais divertido.

A minha orientadora Professora Doutora Ana Liz Garcia Alves por me estimular sempre a buscar o conhecimento, estudar, lidar com situações complexas e me orientar, obrigada pela atenção e carinho.

À Carolina Sasso, psicóloga que me atendeu prontamente quando estava confusa e em desequilíbrio emocional. Carol é sempre atenciosa e me guia com muito carinho. Sem ela, o processo seria mais doloroso.

À banca, Professora Doutora Renee Laufer Amorim e Professora Doutora Anna Paula Balesdent Barreira pela contribuição e atenção com o trabalho, além da disponibilidade para acrescentar melhorias.

“O poder mágico da borboleta dá leveza para superar momentos de mudanças e transformação. Ela dá outra visão do mundo, mostrando-lhe que nada é realmente tão sério quanto parece. Nem mesmo a morte que quando chega pra lagarta, apenas a torna mais bela e mais livre. Sua imagem ajuda nas viagens astrais no aumento da consciência, dá clareza mental e inspiração.”

Borboleta – O Renascimento

“Só se vê bem com o coração, o essencial é invisível aos olhos.”

Antoine de Saint-Exupéry

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo para aplicação em tendão flexor digital superficial.....	33
Figura 2	Aplicação das células tronco mesenquimais guiada por ultrassom.....	33
Figura 3	Exame termográfico realizado no tendão flexor digital superficial.....	34
Figura 4	Perimetria do membro em função do tempo de avaliação.....	34
Figura 5	Sensibilidade dolorosa à palpação em função dos dias de avaliação.....	35
Figura 6	Calor no local de aplicação em função do tempo.....	35
Figura 7	Claudicação em função do tempo de avaliação.....	36
Figura 8	Avaliação termográfica em função do tempo.....	36
Figura 9	Ecogenicidade do tendão flexor digital superficial.....	37
Figura 10	Relação da área do tendão com os dias de avaliação em todos os grupos.....	37
Figura 11	Relação da presença de fluxo sanguíneo no tendão em função do tempo.....	38
Figura 12	Corte histopatológico, coloração de hematoxilina-eosina; Gcont, Gaut e Galog.....	38
Figura 13	Intensidade do infiltrado inflamatório, após biópsia.....	39

Figura 14	Imunomarcaco do anticorpo CD172a para infiltrado inflamatoro; Gcont, Gaut e Galog.....	39
Figura 15	Avaliaco imunoistoquímica do anticorpo CD172a, após biópsia.....	40
Figura 16	Imunomarcaco do anticorpo CD3 para linfócitos; Gcont, Gaut e Galog.....	40
Figura 17	Avaliaco imunoistoquímica do anticorpo CD3, após biópsia.....	41
Figura 18	Imunomarcaco do anticorpo fator VIII para vasos; Gaut e Galog.....	41
Figura 19	Avaliaco imunoistoquímica do fator VIII, após biópsia.....	42

ABREVIATÖES

TFDS	tendão flexor digital superficial
AdCTMs	células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo
MMP	metaloproteinase
G	grupo
MEC	matriz extracelular
IL	interleucina
IL-1ra	antagonista de IL-1
TGF	fator de transformação do crescimento
INF	interferon
MHC	complexo principal de histocompatibilidade
APCs	células apresentadoras de antígenos
NK	natural killer
TNF	fator de necrose tumoral
MoCTMs	células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea
CdCTMs	células tronco mesenquimais derivadas do cordão umbilical
AVC	acidente vascular cerebral
PGE2	prostaglandina E2 ou dinoprostona
Tregs	células T reguladoras
CD	citocina
Th	célula T helper
MTD	membro torácico direito
T	tempo do experimento em semanas
PBS	phosphate-buffered saline
iNOS	óxido nítrico sintase

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	1
Introdução e justificativa.....	2
Revisão de literatura.....	3
Referências.....	8
CAPÍTULO 2 – Trabalho Científico.....	11
Abstract.....	12
Resumo.....	14
Introdução.....	15
Materiais e métodos.....	17
Comissão de ética.....	17
Coleta de tecido adiposo.....	17
Isolamento e cultivo das CTMs.....	17
Criopreservação das AdCTMs.....	17
Transplante das CTMs.....	18
Avaliação física.....	18
Avaliação ultrassonográfica.....	18
Avaliação termográfica.....	18
Biópsias tendíneas.....	19
Avaliação histopatológica.....	19
Avaliação imunoistoquímica.....	19
Análise estatística.....	20
Resultados.....	20
Coleta de tecido adiposo, isolamento e cultivo das CTMs.....	20
Avaliação física.....	20
Avaliação ultrassonográfica.....	21
Avaliação histopatológica.....	21
Avaliação imunoistoquímica.....	21
Discussão.....	22
Conclusão.....	27
Referências.....	28

BRANDAO, J.S. **Avaliação da resposta inflamatória local após aplicação de células tronco mesenquimais alogênicas em tendão flexor digital superficial de equinos**. Botucatu, 2016. Páginas 44p. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O tendão flexor digital superficial (TFDS) é uma estrutura importante para a espécie equina e para animais de alto desempenho atlético. Atualmente, a medicina regenerativa vem evoluindo de forma significativa no tratamento de diversas enfermidades, no entanto, o entendimento a respeito do comportamento celular quando do transplante de células tronco mesenquimais (CTMs) em tecido hígido ainda não é completamente conhecido. Sendo assim, este trabalho tem como objetivo a avaliação da resposta inflamatória local após aplicação de células tronco mesenquimais alogênicas derivadas do tecido adiposo (AdCTMs) em tendão equino comparado ao transplante autólogo e ao grupo controle. Para isso, 18 membros torácicos de 9 animais, divididos em três grupos, foram submetidos à aplicação de AdCTMs em tendão hígido, sendo que em Galog os animais receberam aplicação de AdCTMs alogênicas no membro torácico (MT); em Gauto, aplicação de células autólogas no MT e em Gcont aplicou-se o PBS como grupo controle. Esses animais foram avaliados por parâmetros físicos, exames ultrassonográficos e termográficos até o momento da biópsia, que foi realizada uma semana após aplicação das células autólogas e alogênicas para avaliar a possível reação inflamatória aguda, decorrente do implante de células no tecido tendíneo. O transplante alogênico de CTMs não resultou em reação adversa ou inflamatória que compromettesse o uso dessas células, elucidando a sua segurança neste trabalho. O seu comportamento mostrou-se semelhante ao implante autólogo, sendo assim, a formação de bancos de células alogênicas pode ser favorável e seguro.

Palavras-chave: alogênica; reação imunológica; células tronco mesenquimais; inflamação; equino.

BRANDAO, J.S. **The local inflammatory response evaluation in equine superficial digital flexor tendon after allogeneic mesenchymal stem cell application.** Botucatu, 2016. Pages 44p. Dissertation (Master) – School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University, Botucatu.

ABSTRACT

The superficial digital flexor tendon (SDFT) is an important structure for the equine species and for high performance animals. Currently, regenerative medicine has evolved significantly in the treatment of several diseases, even though the cellular behavior during the implantation of mesenchymal stem cells in healthy tissue is not completely known, despite the fact that it has been tirelessly studied in the last few years. This study aims to evaluate and compare the local inflammatory response upon injection in equine tendon of either allogeneic and autologous mesenchymal stem cells derived from adipose tissue (AdMSC). For this purpose, 18 forelimbs, 9 animals were submitted to the application of AdMSC in healthy tendon, which were divided into 3 groups: in Galog the animals received application of allogeneic AdMSC in the thoracic member; in Gauto, autologous AdMSC were injected in the thoracic member; in Gcont, PBS was implanted as control group. These animals were evaluated through physical exams, ultrasound, and thermography up until the moment of the biopsy, which was performed a week after the application of AdMSC in order to evaluate the inflammatory response due to the implantation of the cells in the tendinous tissue. Biopsy samples were taken to histopathology and immunohistochemistry in order to evaluate the actions of allogeneic AdMSC. The allogeneic MSCs implantation did not result in adverse or inflammatory reaction which could compromise the use of these cells, elucidating their safety in this work. Their behavior was similar to autologous implant, and thus the formation of allogeneic cell banks could be favorable and safe.

Keywords: allogeneic; immunologic reaction; mesenchymal stem cells; inflammation; equine.

CAPÍTULO 1

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A tendinite do flexor digital superficial é uma das lesões mais comuns em equinos de alto desempenho atlético, o que compromete a carreira desse animal, resultando em grande perda econômica. Atualmente, com o advento da biotecnologia, a medicina regenerativa vem evoluindo de forma significativa em diversos tratamentos e várias formas terapêuticas têm contribuído para o restabelecimento da morfofisiologia tendínea. A literatura igualmente refere trabalhos promissores empregando a terapia celular autóloga na tendinite de equinos.

A maioria dos estudos sobre o comportamento das células tronco mesenquimais (CTMs) é realizado em modelos de lesão tecidual, porém a avaliação destas, quando aplicadas em tecido hígido faz-se necessário para compreender melhor a terapia celular.

A resposta tecidual primária a uma lesão pode ser a inflamação e/ou ativação e proliferação celular local. A inflamação celular ocorre na fase precoce da lesão equina de ocorrência natural evoluindo para um mecanismo de resolução ou a continuidade deste processo inflamatório. Os desafios atuais incluem diferenciar os efeitos benéficos e prejudiciais da inflamação e a resposta celular local (SMITH E MCLLWRAITH, 2014).

A literatura expõe diversas competências positivas inerentes às CTMs. Sabe-se que essas células além de apresentarem capacidade de expansão e de diferenciação, possuem efeito quimiotático e possivelmente são capazes de realizar imunomodulação local (YAMADA et al., 2013).

O desenvolvimento de um banco de tecido alogênico de CTMs para aplicações terapêuticas permitirá o uso da terapia celular em lesões agudas ao invés de se limitar à espera do tempo inerente ao cultivo de células autólogas. Além disso, as CTMs podem ser fenotipadas e cariotipadas antes da administração, de modo que as células com habilidade imunomodulatória e capacidade proliferativa desejável possam ser selecionadas para aplicações terapêuticas (CARRADE et al., 2011). Sendo assim, testes de imuno-reatividade das CTMs alogênicas são extremamente relevantes para garantirmos a

segurança da terapêutica e muitos estudos ainda precisam ser realizados para a compreensão do real comportamento das células tronco no local de aplicação.

A aplicação de CTMs alogênicas em um tecido hospedeiro íntegro possibilitaria a avaliação da reação inflamatória local após o transplante destas células sem que haja interação de outros fatores, demonstrando que as possíveis alterações foram realmente geradas pelo transplante celular (GALA et al., 2013).

REVISÃO DE LITERATURA

O tendão flexor digital superficial (TFDS) é uma estrutura importante para a espécie equina e para animais de alto desempenho atlético uma vez que transfere a força biomecânica dos músculos para os ossos, promovendo a movimentação do esqueleto. As lesões tendíneas constituem importantes enfermidades que acometem equinos atletas e podem resultar no afastamento desses animais das atividades esportivas por um longo período ou até mesmo no término precoce de sua carreira. O tempo de evolução é longo e a cicatrização é reparadora e não regeneradora. Essa característica resulta em prejuízos à resistência e elasticidade tendínea que possuem função reduzida, podendo ocorrer recidiva do processo (ALVES et al., 2013).

O tratamento comumente aplicado nas tendinopatias consta na aplicação de anti-inflamatórios sistêmicos e locais, crioterapia tópica (gelo e hidroterapia), diversos métodos fisioterapêuticos e terapia celular, em casos indicados. Com a descoberta do potencial de diferenciação das células tronco, tem-se explorado sua aplicação terapêutica em enfermidades complexas ou lesões de difícil cicatrização, como por exemplo, a tendinite. As CTMs são facilmente isoladas e expandidas *in vitro*, o que faz com que estas sejam alvos promissores para aplicação em ensaios clínicos, objetivando a medicina regenerativa, terapia celular e engenharia de tecidos (ALBERTS et al., 2004).

As fontes de CTMs disponíveis são: tecido adiposo, medula óssea, sangue periférico, sangue e matriz do cordão umbilical, tendão (ALVES et al., 2013). Dentre as possíveis fontes das CTMs, a medula óssea é considerada importante, todavia outras fontes como, por exemplo, o tecido adiposo, apresentam características interessantes como maior número de CTMs viáveis

com altas taxas de migração, proliferação e diferenciação celular, tornando-a assim uma conveniente fonte de células progenitoras (BURK et al., 2012; HONG et al. 2006).

Em estudo recente do nosso grupo de pesquisa em medicina regenerativa, onde utilizamos CTMs derivadas do tecido adiposo associado ao plasma rico em plaquetas para a terapia da tendinite experimentalmente induzida, após 14 dias da indução da lesão, observamos diminuição da inflamação e prevenção quanto à progressão da lesão tendínea nos animais tratados, demonstrado por Carvalho (2012) e Carvalho et al., (2013). Possivelmente esse resultado foi devido à ação imunomoduladora apresentada pela associação terapêutica. Anderson e Bluestone (2005); Seo et al., (2006) e Frassoni et al., (2008) relataram, em estudos com pacientes portadores de doenças auto-imunes, que as CTMs promovem imunossupressão local e estimulam os mecanismos de regeneração através de efeitos parácrinos que envolvem a produção de moléculas anti-inflamatórias, imuno-reguladoras e fatores de crescimento angiogênicos.

Em estudo piloto, Guest et al., (2008) avaliaram a aplicação de CTMs em lesões induzidas cirurgicamente no TFDS, no qual as células foram incubadas com proteína fluorescente e posteriormente aplicadas na lesão do TFDS sete dias após a cirurgia. Foi observada a presença das CTMs no tendão, independentemente do implante consistir em células alogênicas ou autólogas e o transplante destas não resultou em diferença entre os tratamentos quanto à densidade local de leucócitos.

Análises de amostras de TFDS equino submetidos a lesões de ocorrência natural demonstraram imunocoloração positiva para os mediadores pró-inflamatórios IL-1 alfa, IL-1 beta, TNF-alfa e interferon gama, embora o efeito da fase de lesão (aguda ou crônica) não tenha sido investigado. Pesquisas mais recentes têm mostrado que os componentes da inflamação são muito ativos durante a fase inicial da lesão do tendão equino (menos de 6 semanas pós-lesão), demonstrado pela presença de macrófagos polarizados que produzem os mediadores inflamatórios (DAKIN et al., 2013).

Em estudos realizados em camundongos com distrofia muscular constatou-se que o implante de CTMs influenciou diretamente o mecanismo que inicia a inflamação no músculo distrófico. Foi observado que os animais tratados

com CTMs apresentaram aumento da vascularização, redução de tecido fibroso, diminuição da inflamação e preservação da massa muscular. Ainda, com o intuito de avaliar a ação terapêutica dessas células em doenças crônico-inflamatórias, observou-se que nos músculos tratados, onde foram utilizados marcadores específicos para a avaliação de resposta imune, houve uma redução de citocinas pró-inflamatórias (como TNF e IL-6) e espécies reativas de oxigênio, aumento de citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10 e macrófagos (PINHEIRO, 2011).

O transplante imediato das CTMs na fase aguda, seria indicado já que essas células possuem notável potencial imunomodulador, sendo capazes de expressar moléculas anti-inflamatórias como a IL-10, o antagonista de IL-1 (IL-1ra), indolamina 2,3-dioxigenase (IDO), TGF- β e PGE₂ (YAMADA et al., 2013). De fato, o fenótipo imune das CTMs (descrito como MHC I+, MHC II-, CD40-, CD80-, CD86-) é avaliado como não imunogênico e, conseqüentemente, o transplante em um hospedeiro alogênico não requereria imunossupressão, já que não causaria reação indesejável (DI NICOLA, 2002; LE BLANC, 2008).

Os mecanismos que compõem os efeitos anti-inflamatórios das CTMs e favorecem o reparo tendíneo são: o aumento das quimiocinas, supressão de secreção de citocinas a partir de células dendríticas, redução dos efeitos dos linfócitos T e das células “natural killer” (NK), dados em conjunto que ressaltam seu potente efeito anti-inflamatório ou imunossupressor. Em função dos efeitos imunomoduladores das CTMs, essas células estão sendo utilizadas em estudos clínicos da doença do enxerto contra o hospedeiro, uma condição que pode ser fatal após o transplante de órgãos (NIXON et al., 2012).

Em estudos realizados com o transplante de células geneticamente modificadas, obteve-se resposta favorável em babuínos, observando ausência de rejeição. Em relatos na medicina humana com a utilização de CTMs alogênicas para enxertos, o mecanismo exato pelo qual as CTMs escapam do sistema imune ainda é pouco claro (SCHUSTER et al., 2008). Apesar do grande interesse pelas CTMs, suas características imunomoduladoras ainda precisam ser investigadas.

Yan et al., (2014) demonstraram que as CTMs contribuem para a capacidade imunomoduladora das células T reguladoras (Tregs) aumentando seu potencial supressor, ou seja, as CTMs elevam a produção de IL-10 e TGF beta-1 em co-culturas aumentando a regulação de células “Tregs” de superfície.

Como se sabe, IL-10 e TGF beta-1 são citocinas anti-inflamatórias que atuam ativamente no sistema imunossupressor e são potentes inibidores não apenas liberados a partir de CTMs, mas também a partir de “Tregs” e têm produção dependente do contato entre “Tregs” e CTMs.

O número de injeções que eventualmente podem desencadear uma resposta imune celular local é desconhecido, contudo o estudo realizado por Carrade et al., (2011) elucidou diversos aspectos. Eles avaliaram a aplicação de injeções intradérmicas de células alogênicas de equinos derivadas do cordão umbilical (CdCTMs) e observaram que essas injeções foram bem toleradas e não provocaram reações de hipersensibilidade imediatas ou retardadas. Os equinos não apresentaram evidências clínicas de resposta sistêmica, resposta negativa para múltiplas injeções intradérmicas de CTMs, evidenciado pela frequência cardíaca, temperatura e frequência respiratória, bem como não houve evidência de rejeição aguda às células em qualquer equino.

Carrade et al., (2011) também defenderam que a injeção intradérmica de células alogênicas, apesar da expressão de MHC I, não provoca a rejeição aguda do enxerto ou uma resposta de hipersensibilidade célula-mediada do tipo retardada. Observaram uma discreta resposta dérmica morfo-histopatológica para a injeção de células alogênicas em comparação com a solução salina, no entanto essa resposta foi limitada e de auto-resolução. Além disso, a administração de duas doses de CdCTMs alogênicas não estimularam ou suprimiram a proliferação de células T *ex vivo*. Esses dados sugerem que as CdCTMs alogênicas de um equino podem ser administradas em pelo menos duas ocasiões sem desencadear uma resposta imune celular mensurável.

Diversos experimentos clínicos com células alogênicas em animais e no homem estão sendo realizados baseados na premissa de que estas células são caracterizadas como sendo imunotolerantes. No entanto, evidências indicam que elas podem provocar reação imune local, principalmente quando implantadas em tecido inflamado, tal como infarto do miocárdio agudo. Análises histopatológicas mostraram a presença de reações inflamatórias linfocíticas no local do implante de células alogênicas (BUJA e VELA, 2010). Dhingra et al., (2010) explicaram que as lesões cardíacas ativam mecanismos imune inatos, iniciando uma reação inflamatória e levam ao recrutamento quimiotático de leucócitos inflamatórios. Dessa forma, as células implantadas

enfrentam respostas imunitárias do hospedeiro, inata e adaptativa, e a sua viabilidade depende da capacidade de evadir da rejeição das células imunitárias.

As CTMs autólogas têm se mostrado comprovadamente seguras na fase I e II de ensaios clínicos em pacientes que sofreram infarto do miocárdio, entretanto sua eficácia é limitada em pacientes idosos. A fase inicial I e II do estudo clínico usando CTMs alogênicas em pacientes com infarto do miocárdio agudo, por sua vez, foi segura e não foram observados efeitos colaterais. No entanto, a segurança e eficácia de células alogênicas em longo prazo ainda não está bem estabelecida (DHINGRA, et al. 2010).

O transplante alogênico de CTMs tem sido sugerido por ser seguro, mas pouco se sabe sobre a sua sobrevivência *in vivo*. Dados pré-clínicos mostraram que as CTMs alogênicas perdem sua vantagem imunológica seguindo a diferenciação, sugerindo que o transplante de CTMs pode ser rejeitado pelo tecido, limitando seu benefício a longo prazo. Abordar a questão da perda do privilégio imunitário das CTMs poderá permitir o uso bem sucedido das CTMs alogênicas para a regeneração cardíaca (DHINGRA, et al. 2010) e outros sistemas do organismo.

Autores entusiastas afirmam que a utilização de CTMs alogênicas pode ser uma terapia alternativa uma vez que não promove reação alérgica à resposta imunológica ou rejeição. Além disso, essa terapia ainda não foi associada com o desenvolvimento de tumores (DÍEZ-TEJEDOR et al., 2014).

As CTMs alogênicas oferecem vantagens em relação às autólogas, incluindo alto potencial regenerativo e disponibilidade para uso clínico sem o atraso requerido pela expansão dessas células. Em vários estudos pré-clínicos, as células alogênicas foram bem sucedidas na regeneração do miocárdio e o transplante de CTMs resultou na melhora da função cardíaca precoce. Contudo, a capacidade em longo prazo das CTMs alogênicas para preservarem a função cardíaca é limitada devido a uma transição de uma imunidade privilegiada a um fenótipo imunogênico após a diferenciação celular (DHINGRA, et al. 2010).

A justificativa para o uso do implante de CTMs alogênicas na tendinite equina é que se pode fazer o uso de células mantidas em cultura obtidas a partir de equinos doadores (tratamento alogênico), oferecendo a vantagem de um tratamento mais rápido com a utilização de uma população celular homogênea e com capacidade de diferenciação comprovada (BORJESSON et al., 2011).

Além disso, é possível o desenvolvimento de um banco de tecido alogênico de CTMs para aplicações terapêuticas, permitindo a utilização dessa terapia celular em lesões agudas ao invés de se limitar aos atrasos inerentes à cultura de CTMs autólogas, já que atualmente, o implante de CTMs é realizado na fase proliferativa da lesão tendínea (ao redor da terceira semana após o início da lesão), a fim de possibilitar o cultivo e expansão dessas células, necessários para atingir o efeito biológico esperado. Com um eventual uso de células alogênicas, poderíamos reduzir este tempo do transplante na lesão.

REFERÊNCIAS

Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Biologia Molecular da Célula*. 4ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

Anderson, M.S. e J.A. Bluestone. The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annu Rev Immunol*, v.23, p.447-85. 2005.

Borjesson, D.L.; Peroni, J.F. The Regenerative Medicine Laboratory: Facilitating Stem Cell Therapy for Equine Disease. *Clin Lab Med*, v.31, p. 109-123, 2011.

Buja, M.L. e Vela, D. Immunologic and Inflammatory Reactions to Exogenous Stem Cells. Implications for Experimental Studies and Clinical Trials for Myocardial Repair. *Journal of the American College of Cardiology*. JACC, 2010; 56; 1693-1700.

Burk, J.; Ribitsch, I.; Gittel, C.; Juelke, H.; Kasper, C.; Staszuk C. Growth and differentiation characteristics of equine mesenchymal stromal cells derived from different sources. *Vet J*, 2012 (In Press).

Carrade, D.D., Owens, S.D.; Galuppo, L.D.; Vidal, M.A.; Ferraro, G.L.; Librach, F.; Buerchler S.; Friedman M.S.; Walker, N.J.; Borjesson D.L. Clinicopathologic findings following intra-articular injection of autologous and allogeneic placentally derived equine mesenchymal stem cells in horses. *Cytotherapy*, v.13, p.419-430, 2011.

Carrade, D.D.; Affolter, V.K.; Outerbridge, C.A.; Watson, J.L.; Galuppo, L.D.; Buerchler, S.; Kumar, V.; Walker, N.J.; Borjesson, D.L. Intradermal injections of equine allogeneic umbilical cord-derived mesenchymal stem cells are well tolerated and do not elicit immediate or delayed hypersensitivity reactions. *Cytotherapy*, 2011; 13; 1180-1192.

Carvalho, A.M. Implante de células tronco mesenquimais autólogas, associadas ao plasma rico em plaquetas em tendinites experimentais de equinos. 2012. 89f. Tese (Doutorado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

Carvalho, A.M; Badial, P.; Álvarez, L.E.C.; Yamada, A.L.M; Borges, A.; Deffune, E.; Hussni, C.; Garcia Alves, A.L. Equine tendonitis therapy using mesenchymal stem cells and platelet concentrates: a randomized controlled trial. *STEM CELL RES THER.* v.4, p.85, 2013.

Dakin, S.G.; Dudhia, J.; Smith, R.K.W. Science in brief: Resolving tendon inflammation. A new perspective. *Equine Veterinary Journal* 45 (2013) 398-400.

Dhingra, S.; Huang, X.; Li, R. Challenges in allogeneic mesenchymal stem cell-mediated cardiac repair. *Trends Cardiovasc Med* 2010;20:263-268. Elsevier Inc.

Díez-Tejedor, E.; Gutiérrez-Fernández, M.; Martínez-Sánchez, P.; Rodríguez-Frutos, B.; Ruiz-Ares, G.; Lara, M.L.; Gimeno, B.F. Reparative therapy for acute ischemic stroke with allogeneic mesenchymal stem cells from adipose tissue: a safety assessment. A phase II randomized, double-blind, placebo-controlled, single-center, pilot clinical trial. *Journal of stroke and cerebrovascular diseases.* Vol. 23, n.10 (november-december), 2014: pp 2694-2700.

Di Nicola, M.; Carlo-Stella, C.; Magni M.; Milanese M.; Longoni P.D.; Matteucci, P.; Grisanti S.; Gianni, A.M. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 99: 3838–3843, 2002.

Frasconi, F.; Gualandri, F.; Podestà, M.; Raiola, A.M.; Ibatici, A.; Piaggio, G.; Sessarego, M.; Sessarego, N.; Gobbi, M.; Sacchi, N.; Labopin, M.; Bacigalupo, A. Direct intrabone transplant of unrelated cord-blood cells in acute leukaemia: a phase I/II study. *Lancet Oncol.* 2008 Sep;9(9):831-9. doi: 10.1016/S1470-2045(08)70180-3. Epub 2008 Aug 8.

Gala K, Burdzinska A, Idziak M, Wilczek E, Paczek L. Transplantation of mesenchymal stem cells into the skeletal muscle induces cytokine generation. *Cytokine.* 2013; 64: 243- 50.

Guest, D.J.; Smith, M.R.; Allen, W.R. Monitoring the fate of autologous and allogeneic mesenchymal progenitor cells injected into the superficial digital flexor tendon of horses: preliminary study. *Equine Vet J* 2008;40(2):178–81.

Le Blanc K.; Frassoni F.; Ball, L.; Locatelli, F.; Roelofs, H.; Lewis, I.; Lanino, E.; Sundberg, B.; Bernardo, M.E.; Remberger, M.; Dini, G.; Egeler, R.M.; Bacigalupo, A.; Fibbe, W.; Ringdén, O. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet.* 2008 May 10;371(9624):1579-86.

Nixon, A.J. et al. Cell- and gene-based approaches to tendon regeneration. *J Shoulder Elbow Surg*, v.21, n.2, p.278-294, 2012.

Schuster M.D.; Martens, T.P.; Itescu, S. Células-Tronco Mesenquimais para Reparo Cardíaco. *Rev Bras Cardiol Invas.* 2008;16(1):95-101.

Smith, R. e McIlwraith, W. Advances in the understanding of tendinopathies: A report on the Second Havemeyer Workshop on equine tendon disease. *Equine Veterinary Journal* 46 (2014) 4-9.

Seo, S.; Fujita, H.; Nakano, A.; Kang, M.; Duarte, A.; Kume, T. The forkhead transcription factors, Foxc1 and Foxc2 are required for arterial specification and lymphatic sprouting during vascular development. *Dev Biol.* 15 de junho de 2006;294(2):458-70.

Yamada, A.L.M.; Carvalho, A.M.; Moroz, A.; Deffune, E.; Watanabe, M.J.; Hussni, C. A.; Rodrigues, C.A.; Alves, A.L.G. Mesenchymal stem cell enhances chondral defects healing in horses. *Stem Cell Discovery*, 2013;3:4.

Yan, Z.; Zhuansun, Y.; Chen, R.; Li, J.; Ran, P. Immunomodulation of mesenchymal stromal cells on regulatory T cells and its possible mechanism. *Science Direct. Experimental cell research* 324 (2014) 65-74.