UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

INOCULAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS AUTÓLOGAS E ALOGÊNICAS, PROVENIENTES DA MEDULA ÓSSEA, EM TECIDO MUSCULAR DE EQUINOS.

NATÁLIA PEREIRA PAIVA FREITAS

Botucatu/SP

Agosto - 2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

INOCULAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS AUTÓLOGAS E ALOGÊNICAS, PROVENIENTES DA MEDULA ÓSSEA, EM TECIDO MUSCULAR DE EQUINOS.

NATÁLIA PEREIRA PAIVA FREITAS

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

Orientador: Prof. Dr. Rogério Martins Amorim

Co-Orientador:, Profa. Dra. Fernanda da Cruz Landim-Alvarenga

Nome do Autor: Natália Pereira Paiva Freitas

Título: INOCULAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS AUTÓLOGAS E ALOGÊNICAS, PROVENIENTES DA MEDULA ÓSSEA, EM TECIDO MUSCULAR DE EQUINOS.

COMISSÃO EXAMINADORA

_____

Prof.Dr. Rogério Martins Amorim

Presidente e Orientador

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ – UNESP - Botucatu

_____

Profª Drª Ana Liz Garcia Alves

Membro da Banca Examinadora

Departamento de Cirurgia Veterinária

FMVZ – UNESP - Botucatu

_____

Prof.Dr. Wilson Roberto Fernandes

Membro da banca Examinadora

Departamento de Clínica Médica

FMVZ – USP – São Paulo

Data da Defesa: 9 de Agosto de 2012.

DEDICATÓRIA

À Deus, aos meus pais, Elane Delgado Pereira Freitas e Francisco Marcus Martins Freitas, pelo apoio irrestrito e educação, proporcionando minha formação.

Aos meus irmãos, Edyr Pereira Paiva Freitas e Felipe Pereira Paiva Freitas, que sempre estiveram presentes em todos os momentos da minha vida.

"Não sou tão forte quanto eu previa, nem tão fraca quanto eu temia. Não tenho o passo rápido como eu gostaria, nem paraliso como poderia. Aprendi a me equilibrar nos extremos. Se não tenho o direito de escolher todos os acontecimentos, me posiciono de acordo com os fatos. No final, o que me move não é forte o suficiente para me derrubar, mas é intenso o bastante para me fazer ir além." (Fernanda Gaona)

AGRADECIMENTOS

À UNESP de Botucatu, por todo o aprendizado e possibilitar o desenvolvimento do trabalho.

À FAPESP pela bolsa de estudo concedida.

Ao orientador Rogério Martins Amorim, pelos ensinamentos, confiança e amizade, possibilitando o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada pela orientação, ajuda e ensinamentos.

À Co-orientadora Fernanda da Cruz Landim-Alvarenga, pelo acolhimento em seu Laboratório de Reprodução Avançada e Terapia Celular (LANÇA), proporcionando o desenvolvimento desta pesquisa. Obrigada pela sua disponibilidade e ensinamentos. Sua experiência e competência auxiliaram no meu aperfeiçoamento como profissional.

À Dra. Marjorie Assis Golim do laboratório de Citometria de Fluxo no Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu, por sua grande colaboração no desenvolvimento da dissertação de mestrado.

Ao Departamento de Radiologia, em especial à mestranda Roberta Valeriano dos Santos, pela realização dos exames ultrassonográficos, além da amizade construída desde o período da minha residência na Universidade Federal de Viçosa.

À Profa. Dra. Renée Laufer Amorim, pela cooperação para a avaliação dos histopatológicos.

À Profa. Dra. Ana Liz Garcia Alves, pelo grupo de pesquisa em Terapia Celular, possibilitando o aprimoramento dos conhecimentos na área.

Aos pós-graduandos Leandro Maia, Danielle Jaqueta Barberini, Marta Thomas Heckler, Ian Martin e Carlos Eduardo, pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Aos grandes amigos Gabriel Augusto Monteiro, Bruna de Vita, Bianca Andriolo Monteiro, Loreta Lemes Campos, Sabrina Sakashita, Yamê Fabres Robaina Sancler da Silva e Stephane Vexenat, que foram minha família em Botucatu durante esses anos do Mestrado, tornando minha estadia mais alegre.

À Ana Lúcia Miluzzi Yamada, com quem dividi a casa e pela amizade construída.

À todos que contribuíram direta e indiretamente na elaboração desse trabalho, agradeço!

LISTA DE QUADROS

		PÁGINA
Quadro 1	Caracterização imunofenotípica das CTMs no grupo 2 (autólogo) e grupo 3 (alogênico).	28

LISTA DE FIGURAS

		PÁGINA
Figura 1	Linha do tempo das diferentes etapas do experimento.	18
Figura 2	Punção de medula óssea no esterno de equino.	19
Figura 3	Isolamento de CTMs.	20
Figura 4	Pellet de células e garrafa de cultivo.	21
Figura 5	Procedimento de biópsia muscular.	26
Figura 6	CTMs em cultivo.	27
Figura 7	Citometria de fluxo para os marcadores CD34, CD44 e CD90.	28
Figura 8	Diferenciação adipogênica e osteogênica.	29
Figura 9	Diferenciação condrogenica.	30
Figura 10	CTMs em cultivo e marcadas com nanocristal Qtracker 655®	30
Figura 11	Aplicação de CTMs marcadas com nanocristal no tecido muscular.	31
Figura 12	Imagem ultrassonográfica de CTMs marcadas e não marcadas com nanocristal no tecido muscular.	32
Figura 13	Biópsia muscular guiada por ultrassom.	32

Figura 14 Análise da fluorescência do nanocristal Qtracker 655®, em tecido muscular, ao microscópio. 34

Figura 15 Avaliação histológica (HE e Gomori) e histoquímica (NADH-tr) do Grupo Controle. 36

Figura 16 Avaliação histológica (HE e Gomori) e histoquímica (NADH-tr) do Grupo Autólogo. 37

Figura 17 Avaliação histológica (HE e Gomori) e histoquímica (NADH-tr) do Grupo Alogênico. 38

LISTA DE ABREVIATURAS

CTMs	Células-tronco mesenquimais
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
ISCT	Sociedade Internacional de Terapia Celular
MO-CTMs	Células-tronco derivadas da medula óssea
GFP	Plasmídeo verde fluorescente
NADH-tr	Tetrazolium redutase
PAS	Ácido periódico de Schiff
FO	Fibras Tipo 1 altamente oxidativas de contração lenta
FOG	Fibras Tipo 2A altamente oxidativas de contração rápida
FG	Fibras Tipo 2X pouco oxidativas e de contração rápida
CTH	Células-tronco hematopoiéticas
MDX	Camundongos distróficos
LANÇA	Laboratório de Reprodução Avançada e Terapia Celular
US	Ultrassom
DMEM	Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium
F12	Nutrient Mixture
HE	Hematoxilina & Eosina

SUMÁRIO

PÁGINA

1. INTRODUÇÃO 01
2. REVISÃO DE LITERATURA 04
2.1.Características do músculo esquelético e fibras musculares..... 04
2.2. Tipos de fibras musculares 04
2.3. Miopatias em equinos 05
2.4. Células-satélites e Regeneração Muscular 06
2.5. Célula-tronco 08
2.5.1. Contribuição das MO-CTMs para a Regeneração muscular 10
2.7. Terapia Autóloga x Terapia Alogênica 12
2.8. Marcação celular 13
3. OBJETIVOS 15
3.1. Objetivo Geral 15
3.2. Objetivos Específicos 15
4. Material e Métodos 16
4.1. Seleção dos animais 16
4.2. Delineamento 16
4.2.1. Punção Aspirativa da Medula Óssea 18
4.2.2. Isolamento e Cultivo das CTMs 19
4.2.3. Citometria de fluxo 22
4.2.4. Diferenciação Celular 23
4.2.5. Marcação das CTMs com nanocristal Qtracker 655® 23
4.2.6. Aplicação das CTMs marcadas, no músculo *gluteus medius* 24
4.2.7. Biópsia muscular 24
4.2.8. Colorações histológicas 26
4.2.9. Coloração histoquímica 26
5. RESULTADOS 27
6. DISCUSSÃO 39
7. CONCLUSÃO 46
8. BIBLIOGRAFIA 47

PÁGINA

9. ANEXO 1 60
10. ANEXO 2 - TRABALHO CIENTÍFICO 64

FREITAS, N.P.P. **Inoculação de Células-Tronco Mesenquimais autólogas e alogênicas, provenientes da medula óssea, em tecido muscular de equinos.** Botucatu, 2012. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, São Paulo.

RESUMO

A utilização de células-tronco adultas autólogas surgiu como uma alternativa terapêutica no tratamento de equinos, com resultados bastante promissores. Adicionalmente, a terapia com células alogênicas viabiliza a manutenção de um banco de células, proporcionando assim seu uso imediato. O objetivo deste trabalho foi avaliar, morfologicamente, a resposta inflamatória e detectar as células-tronco mesenquimais (CTMs) marcadas, autólogas e alogênicas, após a inoculação no músculo *gluteus medius* de equinos. Para tal, foram utilizados 15 equinos, divididos igualmente em três grupos de cinco animais, sendo o grupo 1 (controle), grupo 2 (células autólogas), grupo 3 (células alogênicas). Os animais foram submetidos à punção de medula óssea e após o cultivo, essas células foram caracterizadas fenotipicamente por citometria de fluxo e submetidas à diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica, para caracterização da linhagem mesenquimal. Em seguida, as células autólogas e alogênicas foram marcadas com o nanocristal Qtracker 655® e inoculadas no músculo *gluteus medius* dos grupos 2 e 3, respectivamente. No grupo 1 foi inoculado PBS (solução salina tamponada com fosfato). Em cada grupo foi realizada uma biópsia 30 dias antes e outra 24h após o transplante das células e à inoculação do PBS. A análise dos resultados das biópsias demonstrou, por meio de colorações como Hematoxilina-Eosina, Gomori Modificado e NADH-tr, que a morfologia e o metabolismo das fibras foram mantidos tanto no grupo controle como nos grupos tratados. Além disso, foi possível detectar as CTMs marcadas no tecido muscular por meio de imunofluorescência. Portanto, concluiu-se que as CTMs autólogas e alogênicas transplantadas foram detectadas no tecido muscular de equinos e morfologicamente, não provocaram reação inflamatória 24h após o transplante.

Palavras-chave: Células-tronco mesenquimais, alogênica, nanocristal, músculo, equino.

FREITAS, N.P.P. **Autologous and allogeneic bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in equine muscle.** Botucatu, 2012. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, São Paulo.

ABSTRACT

The use of autologous adult stem cells appeared as therapeutic alternative in treatment of horses with promising results. Allogeneic cell therapy enables maintenance a bank of cells, thereby providing immediate use. The aim of this study was to evaluate the inflammatory response and tracker autologous and allogeneic, mesenchymal stem cell (MSCs) after *gluteus medius* muscle horse injection. In this research, we used fifteen horses that were divided equally into three groups of five animals each, with Group 1 (control), Group 2 (autologous cells) and Group 3 (allogeneic cells). The animals undergo bone marrow aspiration for culture and isolation of mesenchymal cells. These cells, after culture were phenotypically characterized by flow cytometry and differentiation for characterization of the mesenchymal lineage. Upon such identification, autologous and allogeneic cells were marked with Qtracker 655® and inoculated in the gluteus medius muscle of groups 2 and 3, respectively. In group 1 was inoculated an equal volume of PBS (phosphate buffered saline). In each group a biopsy was done thirty days before and 24h after inoculation of the cells and PBS. Biopsies results showed through stains such as hematoxylin-eosin, modified Gomori and NADH-tr, that the tissue integrity and fiber metabolism was maintained in both, control and treated groups. Additionally, was possible to detect MSCs tracked in muscle tissue through immunofluorescence. Therefore, we conclude that autologous and allogeneic BM-MSCs could be detected in muscle tissue and through morphology analysis, caused no inflammatory reaction, 24 hours after transplantation.

Key words: Mesenchymal stem cell, allogeneic, nanocrystal, muscle, horse.

1. INTRODUÇÃO

A atividade física intensa e estressante predispõe os equinos às afecções musculoesqueléticas. Terapias alternativas, que auxiliem na recuperação dessas lesões, são muito importantes, pois podem minimizar o tempo de tratamento e os custos, assim como garantir o retorno mais rápido às atividades normais (DOUAT, 2004)

A década de 90 foi marcada por importantes avanços nas pesquisas com terapia celular objetivando o tratamento de doenças hereditárias, auto-imunes, dentre outras com poucas perspectivas terapêuticas. Entretanto, até então, a terapia celular esteve restrita à utilização de células hematopoiéticas no tratamento de doenças hematológicas e onco-hematológicas (HERZOG et al., 2003; MEIRELLES et al., 2006). A partir do início do século XXI, com o advento de novos conhecimentos sobre a plasticidade das células-tronco e com o surgimento de estudos científicos que sugeriram a transdiferenciação direta ou indireta e diferenciação dessas células, estas passaram a ter seu emprego considerado na terapia celular (HERZOG et al., 2003; MEIRELLES et al., 2006). Atualmente, a possibilidade de tratamento com células-tronco conquistou notoriedade devido ao seu potencial, tornando-se a principal alternativa da terapia celular (LAI et al*.,* 2007).

A partir da descoberta do potencial de diferenciação destas células, sua aplicação terapêutica tem sido explorada, sob a forma de terapia celular ou da bioengenharia voltada para transplantes (LEVENBER et al., 2003).

A utilização de células-tronco proveniente de vários tecidos é uma técnica promissora no tratamento de doenças em equinos, no entanto, as propriedades e principais características das células-tronco permanecem desconhecidas apesar do seu grande uso empírico e comercial em cavalos (KOCH et al., 2008). A compreensão da biologia das células-tronco, assim como seu potencial uso terapêutico em equinos permanece ainda rudimentar (KOCH et al., 2009), necessitando assim de mais pesquisas na área.

Nos últimos anos, o isolamento de células-tronco mesenquimais (CTMs) tem sido proclamado a partir de vários tecidos equinos. Com base nos critérios da Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT), a maioria dessas células é designada, mais corretamente, como células mesenquimais estromais

multipotentes, a menos que existam provas de que elas demonstrem in vivo suas características fundamentais de pluripotencialidade e habilidade para auto-renovação (KOCH et al., 2009).

O crescimento e a reparação do músculo esquelético são normalmente mediados pelas células-tronco musculares ou células satélites, as quais circundam as fibras musculares (FERRARI et al., 1998). Na regeneração muscular, entretanto, o número de precursores miogênicos excede as células satélite residentes, implicando na migração e recrutamento de progenitores indiferenciados de outras fontes. A contribuição das células da medula óssea para a regeneração muscular foi inicialmente documentada por Ferrari et al. (1998), onde foi demonstrado que o transplante de medula óssea, em camundongos imunodeficientes, cursa com a migração de células derivadas da medula para as áreas de degeneração muscular induzida e sofrem diferenciação miogênica, além de participarem da regeneração das fibras lesadas.

Embora a contribuição das células-tronco derivadas da medula óssea (MO-CTMs) na regeneração do músculo esquelético venha sendo repetidamente documentada, ainda existem dúvidas em relação à incorporação dessas células. Não está esclarecido se o que ocorre é exclusivamente o resultado da fusão de células inflamatórias para a regeneração das miofibras ou se certas populações de MO-CTMs têm a capacidade de diferenciação em músculo (LUTH et al., 2008). Nesse sentido, se faz importante e viável a realização de pesquisas com CTMs marcadas a fim de elucidar o comportamento e os benefícios dessas células no tecido muscular conforme proposto no presente projeto de pesquisa.

Baseado nas dúvidas sobre a regeneração do músculo esquelético com a utilização de células-tronco, o estudo de marcadores celulares se faz necessário para o rastreamento dessas células no tecido. Li et al. (2009) utilizaram um marcador de membrana celular para rastreamento das células-tronco mesenquimais, assim como, Guest et al. (2008) utilizaram um plasmídeo verde fluorescente (GFP) como marcador citoplasmático dessas células para rastreamento no tendão de equinos. Adicionalmente, o nanocrsital Qtracker 655 tem sido descrito em vários trabalhos como marcador citoplasmático, com

capacidade para transferência por até seis gerações de células, sendo útil em diversos estudos como migração e morfologia (INVITROGEN, 2007).

Portanto, as pesquisas com células-tronco e engenharia tecidual mostram perspectivas que provavelmente irão beneficiar a saúde tanto dos eqüinos como dos humanos (KOCH et al., 2009). Dessa forma, os achados abrirão caminho para novos estudos, visando estabelecer terapias mais eficazes para o tratamento de animais com lesões musculares. Adicionalmente, a terapia com células mesenquimais alogênicas viabiliza o seu uso imediato, pela manutenção de bancos de células, podendo eliminar fatores como predisposição genética e diminuição da potencialidade dessas células devido ao envelhecimento natural.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Características do músculo esquelético e fibras musculares

Fibras musculares podem ser classificadas de acordo com reações histoquímicas. Essas características de coloração são úteis no campo da fisiologia de exercício e quando usadas em biópsias musculares, ajudam a diagnosticar doenças musculares clínicas em equinos. A contratilidade das fibras é determinada pela atividade miosina-adenosina-trifosfatase (ATPase) e as fibras musculares podem ser classificadas como fibras de contração lenta (Tipo 1) ou de contração rápida (Tipo 2). Fibras Tipo 2 podem ser divididas em subtipos 2A, 2B ou 2X (nos equinos) e 2C; fibras do Tipo 2C são encontradas somente em animais jovens. Fibras musculares podem também ser incubadas para determinar a atividade de succinato desidrogenase ou de diaforase dinucleotídeo de nicotinamida-adenina (NADH) para avaliar a capacidade oxidativa (agrupadas como tendo alta ou baixa atividade). O conteúdo de glicogênio de músculos pode ser determinado por de uma reação ao ácido periódico de Schiff (PAS), a qual revela que fibras Tipo 1 apresentam menos glicogênio que as do Tipo 2 (STASHAK, 2006).

2.2 Tipos de fibras musculares

Usando uma combinação de capacidade oxidativa e atividade de miosina-ATPase, três principais categorias de músculo esquelético equino podem ser identificadas, incluindo fibras Tipo 1 altamente oxidativas de contração lenta (FO), fibras Tipo 2A altamente oxidativas de contração rápida (FOG) e fibras Tipo 2X pouco oxidativas e de contração rápida (FG). As diferenças de fibras altamente oxidativas e pouco oxidativas são razoavelmente distintas no eqüino não treinado, mas tornam-se mais difíceis com o avanço do treinamento. Em humanos, a capacidade para atividade muscular (ou seja, comportamento atlético) pode ser relacionado ao perfil individual de fibras musculares. Estudos mostraram que corredores de longa distância normalmente apresentam uma proporção maior de fibras de contração lenta que a população em geral, enquanto corredores de curta distância apresentam uma predominância de fibras de contração rápida. Em equinos, as diferenças entre a distribuição dos tipos de fibras foram associadas com diferenças na resposta metabólica ao

exercício e quando a fadiga muscular terá maior probabilidade de acontecer (STASHAK, 2006).

Fibras Tipo 1 são fibras vermelhas de alta oxidação e lenta contração que apresentam menor capacidade de armazenar glicogênio que as do Tipo 2. Elas têm sistema de enzimas glicolíticas pouco desenvolvidos e apresentam baixa velocidade de contração. Mostram pouca ou nenhuma fadiga, são boas para velocidades baixas e estão equipadas para o metabolismo aeróbio; são as primeiras fibras formadas na miogênese no embrião e conservam sua capacidade aeróbia de contração lenta durante toda a vida do animal (STASHAK, 2006). Snow et al*.* (1981) mostraram que equinos com proporção mais alta dessas fibras normalmente têm o melhor recorde de desempenho em eventos de resistência.

Fibras Tipo 2X são fibras brancas de contração rápida que apresentam um caminho glicolítico bem desenvolvido, mas poucas mitocôndrias. Apresentam, com rapidez, fadiga, mas são utilizadas para atividades de fases altamente energéticas e de curta duração. Fibras Tipo A são fibras vermelhas de alta oxidação e rápida contração que apresenta grandes capacidades de armazenamento de glicogênio, uma seqüência glicolítica bem desenvolvida e muitas mitocôndrias. Essas resistem melhor à fadiga que as do Tipo 2B e são mais adequadas para atividade mantida de fase (STASHAK, 2006).

Em humanos se acredita que a proporção de fibras Tipo 1 em relação a fibras Tipo 2 nos músculos seja controlada geneticamente. Em equinos, a proporção de fibras no músculo glúteo médio pode ser relacionada à raça e ao tipo de trabalho para o qual a raça foi selecionada. É coerente aceitar que cavalos Quarto de Milha e Puros Sangues Ingleses, que são envolvidos em eventos de corrida, apresentam menos fibras Tipo 1 e mais do Tipo 2B e 2A que raças como o Árabe, mais utilizadas para eventos de resistência (STASHAK, 2006).

2.3. Miopatias em equinos

As miopatias são relativamente comuns na espécie equina e no passado receberam nomes como: “Mal da segunda-feira”, Azotúria, Mioglobinúria paralítica, Rabdomiólise e *Tying up*. Atualmente sabe-se que as mesmas

manifestações clínicas são comuns a diferentes enfermidades com diferentes etiologias (VALBERG, 2006; ALEMAN, 2008).

As miopatias em equinos foram classificadas por Aleman (2008) em três grandes grupos: não associadas ao exercício, associadas ao exercício e devido alteração da condução elétrica do sarcolema.

O grupo das miopatias não associadas ao exercício inclui as de causa nutricional (deficiência de vitamina E e Se) (LOFESTD, 1997), metabólica (deficiência da enzima ramificadora de glicogênio e por acúmulo de polissacarídeo) (WARD et al. 2004; VALBERG 2006) , tóxica (MARTIN et al. 1981; CASSART et al. 2007; BEZERRA et al. 2000), traumática, inflamatória (bacterianas, virais, parasitárias e imunomediadas) (SPONSELLER et al. 2005; PEEK et al. 2003; LEWIS et al. 2007; ALEMAN, 2008) e associada a anestesia (hipertermia maligna) (ALEMAN, 2008).

As miopatias associadas ao exercício podem ser esporadicamente causadas por perda do condicionamento físico, desequilíbrios hidroeletrolítico e nutricional, exaustão e insolação. Já de forma crônica estão associadas a causas genéticas (Rabdomiólise recorrente e miopatia mitocondrial) (DRANCHAK et al. 2005; VALBERG, 2006), traumáticas e metabólicas (por acúmulo de polissacarídeos) (VALBERG, 2006).

Por último, a miopatia que afeta a condução elétrica do sarcolema compreende a paralisia periódica hipercalêmica e a miotonia congênita (VALBERG, 2006).

A classificação das miopatias em equinos tende a se expandir rapidamente nos próximos anos, com o melhor reconhecimento das síndromes clínicas e o emprego de técnicas histológicas, bioquímicas e moleculares no diagnóstico. Para isso, a biópsia muscular é uma técnica fundamental para a avaliação das fibras musculares, auxiliando no diagnóstico da enfermidade.

2.4 Células-satélites e Regeneração Muscular

Músculos esqueléticos de mamíferos adultos exibem uma grande capacidade de se adaptarem a demandas, como crescimento e injúria. Os processos pelos quais essas adaptações ocorrem são atribuídos a uma pequena população de células que são residentes no músculo denominadas células satélites ou células precursoras miogênicas (HAWKE & GARRY, 2001).

As células satélite ou células-tronco musculares foram primeiramente descritas em músculos de sapos por Mauro (1961) baseado na sua morfologia e posição na miofibrila madura; e foram mais tarde identificadas em músculo adulto de aves e mamíferos (ARMAND et al., 1983; SCHULTZ, 1976; BISCHOFF, 1994). Essas células aderem à superfície dos miotubos para a formação da lâmina basal, de forma que essa última circunda a miofibrila, proporcionando assim, que as células satélites se disponham de forma contínua (ARMAND et al., 1983; BISCHOFF, 1994).

Células satélites no músculo esquelético adulto são normalmente mitoticamente quiescente, mas são ativadas em resposta ao estresse induzido, como exercício ou trauma (APPELL et al., 1988; ROSENBLATT et al., 1994; SCHULTZ et al., 1985; BISCHOFF, 1994; GROUNDS, 1998). Os descendentes das células satélites ativadas, chamados precursores miogênicos celulares (mpcs), sofrem múltiplas divisões para a fusão com miofibrilas novas ou preexistentes (APPELL et al., 1988; BISCHOFF, 1994; GROUNDS & YABLONKA-REUVENI, 1993).

O número de células satélites quiescentes no músculo adulto continua relativamente constante após passar por vários ciclos de degeneração e regeneração, demonstrando a sua capacidade para auto-renovação (GIBSON & SCHULTZ, 1983; SCHULTZ & JARYSZAK, 1985). No entanto, o número e o potencial de duplicação das células satélites tornam-se intensamente reduzidos nas enfermidades musculares, como na Distrofia Muscular de Duchenne, provavelmente devido aos altos níveis de regeneração exigidos (BULFIELD et al., 1984; EMERY, 1998; SCHULTZ & JARYSZAK, 1985; WEBSTER & BLAU, 1990).

O processo de regeneração é caracterizado por duas fases: a fase degenerativa e a fase regenerativa. A morte das fibras musculares ou de fragmentos de fibras seja por apoptose ou necrose, ocorre em conseqüência dos defeitos bioquímicos primários causados pela patogenia. A morte de células ativas varia dependendo do músculo que é examinado, da idade do paciente e da espécie que manifesta a doença. Esse evento é marcado pelo rompimento do sarcolema das miofibrilas, resultando em um aumento na permeabilidade refletido por uma elevação do nível sérico de proteínas musculares como a creatina quinase, que é geralmente restrita ao citosol da

célula muscular. Nessa fase ocorre a ativação de células mononucleares, principalmente células inflamatórias e células satélites. A regeneração muscular que segue a morte celular reflete as mudanças secundárias, caracterizadas pela substituição do músculo por tecido adiposo ou conectivo, logo após a perda de sua capacidade regenerativa (CHARGE & RUDNICKI, 2004).

2.5. Células-tronco

O termo célula-tronco foi criado no século XIX por Edmund Beecher Wilson, que descreveu o termo como um sinônimo para células germinativas primordiais mitoticamente quiescentes (WILSON, 1896).

Células-tronco são definidas como células que têm a capacidade de auto-renovação *in vivo*, proliferação extensiva e de diferenciação em um ou mais tipos celulares (THOMSON et al., 1998; ODORICO et al., 2001; PITTENGER et al., 1999). Nesse sentido, teoricamente, estas células poderiam ser multiplicadas no laboratório e induzidas a formar tipos celulares específicos, que quando transplantados, regenerariam o órgão lesado.

As células-tronco podem ser encontradas no embrião, no cordão umbilical, possivelmente na placenta e no indivíduo adulto. No adulto, localizam-se em maior concentração na medula óssea, mas também como células-satélite nos tecidos e em pequenas quantidades até no sangue periférico. Por questões éticas e pela facilidade de obtenção, há tendência de utilização destas células do próprio indivíduo enfermo ou lesado, através de punção de medula óssea (LEVENBER et al., 2003).

As células-tronco podem ser classificadas quanto à potencialidade, ou seja, a capacidade de uma célula originar novos tipos celulares como: totipotentes (capazes de gerar todos os tipos celulares embrionários e extra-embrionários), pluripotentes (capazes de diferenciação em células pertencentes aos três folhetos embrionários e também as células germinativas primordiais) (BENJAMIM et al., 2000), multipotentes (capacidade de diferenciação limitada a determinados tipos celulares) e unipotentes (capazes de gerar um único tipo de tecido) (FIBBE, 2002).

Por outro lado, as células-tronco também podem ser classificadas de acordo com a origem: embrionária (obtida nos estágios iniciais do

desenvolvimento embrionário) (GARGETT, 2004) e adultas (isoladas de órgãos e tecidos diferenciados, como a medula óssea) (GRINFELD & GOMES, 2004).

Em 1960, foi identificado pela primeira vez que células derivadas da medula óssea foram capazes de se diferenciar em células de origem mesenquimal (FRIEDENSTEIN & PETROKOVA, 1966). Nas últimas duas décadas, as células-tronco adultas multipotentes têm sido agrupadas em hematopoiéticas e mesenquimais, baseado no seu potencial de diferenciação. CTMs são algumas vezes referidas como células-tronco estromais ou células-tronco do estroma da medula óssea, uma vez que elas foram primeiramente isoladas e descritas em aspirados da medula óssea (MARION & MAO, 2006). Em equinos, a punção de medula óssea é realizada preferencialmente na região do esterno, aproximadamente na 5ª esternébra, conforme Barreira *et al*., (2008).

Células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea (MO-CTMs) são encontradas na fração não hematopoiética do estroma, a qual abrange uma população heterogênea de células incluindo adipócitos, macrófagos, células reticulares, osteogênicas, musculares e endoteliais (LEE & HUI 2006).

A habilidade dessas MO-CTMs de se diferenciar em células de linhagens diferentes (osteoblastos, condrócitos e adipócitos) atualmente está amplamente comprovado por vários estudos em camundongos e humanos (JOHNSTONE et al., 1998; PITTENGER et al., 1999; BARRY et al., 2001; JIANG et al., 2002) e em equinos (KOERNER et al., 2006; VIDAL et al., 2006).

As características mínimas apresentadas pelas CTMs devem ser apresentadas *in vitro*, para que as mesmas possam ser utilizadas em estudos, segundo as recomendações da ISCT. Segundo essa sociedade, para se reconhecer as CTMs em cultura, estas devem apresentar morfologia fibroblastóide, capacidade de diferenciação e expressar um conjunto de marcadores de superfície celular (DOMICINI et al., 2006).

A maioria dos marcadores utilizados para a caracterização das CTMs, ainda não foi desenvolvida especificamente para a espécie eqüina e há evidência de que alguns marcadores disponíveis para outras espécies não apresentam reação cruzada com as CTMs do cavalo (TAYLOR et al., 2007). Essa caracterização celular é realizada através de um aparelho denominado citômetro de fluxo. Através dele, vários estudos sobre CTMs demonstraram

reação positiva para: CD13, CD29, CD44,CD73, CD90, CD105, CD166 e negativa para: CD10, CD14, CD24, CD31, CD34, CD36,CD38, CD45 (ZUK et al., 2002; KERN et al., 2006).

Segundo Frisbie & Smith (2010), a grande atenção ou interesse no uso das células-tronco está relacionado ao seu potencial de regeneração, o qual poderia ser atribuído aos efeitos parácrinos, migratórios, imunomoduladores, antiinflamatórios e antiapoptóticos. Em medicina equina a terapia com CTMs ainda estão restritos ao tratamento de lesões tendíneas e osteoarticulares. Porém, alguns estudos já obtiveram resultados promissores para sua utilização na reparação de diversos tecidos, inclusive extra-mesenquimais.

2.5.1. Contribuição das MO-CTMs para a Regeneração muscular

O número de células satélite no músculo esquelético adulto é muito menor do que o número de células precursoras miogênicas enviadas para o tecido muscular logo após a lesão (GROUNDS et al., 1992). Muitas explicações para esse aparente paradoxo têm sido propostas, como a migração de células satélites de fibras adjacentes ou até mesmo de músculos vizinhos e recrutamento de progenitores indiferenciados de outras fontes (COSSU, 1997).

Embora os mioblastos ou células precursoras musculares (SMYTHE et al., 2001; PARTRIDGE, 2002; PRICE et al., 2007) tenham sido usados, nos primeiros estudos, como células doadoras, as MO-CTMs emergiram como uma alternativa atrativa de tratamento. Isso ocorreu devido à baixa sobrevivência dos mioblastos, a rejeição imune e baixa taxa de migração das células transplantadas. Além disso, os constantes ciclos de degeneração-regeneração levam a uma redução no pool de células-satélites, em diversas miopatias (HESLOP et al., 2000). Adicionalmente, SAmpaolesi et al., (2006) demonstraram que o transplante de células sadias do hospedeiro apresentavam melhores resultados quando comparados com o transplante de células geneticamente modificadas em modelos de cães distróficos.

Friedenstein et al., (1976) foram os primeiros pesquisadores a observar que a medula óssea continha células com formato de fibroblastos, denominadas CTMs, que eram capazes de se diferenciar em outros tipos celulares. A ativação espontânea para a diferenciação miogênica de células de origem mesodérmica, co-cultivadas com células musculares ou injetadas *in*

vivo em músculos em processo de regeneração, tem sido documentada por muitos anos (COSSU, 1997). Em 1998, Ferrari et al. descreveram pela primeira vez que as células da medula óssea contribuíam para a regeneração muscular através de um estudo onde o transplante de medula óssea, por via sistêmica, em camundongos imunodeficientes, cursava com a migração das MO-CTMs para as áreas de degeneração muscular induzida e sofriam diferenciação miogênica, além de participarem da regeneração das fibras lesadas.

Em estudos com camundongos foi observado que a medula óssea, mesmo quando com número reduzido de fibroblastos e outros componentes celulares, é capaz de dar origem a fibras musculares com alta eficiência. Em vez de conversão miogênica, esses experimentos sugeriram a existência de progenitores celulares, dotados de potencial miogênico, no interior da medula óssea (COSSU & MAVILIO, 2000).

Baseado nisso, a seleção de uma população de células-tronco com características de multipotencialidade, como as oriundas da medula óssea, surgiu como uma opção para o tratamento de miopatias primárias (COSSU & MAVILIO, 2000).

MO-CTMs são capazes não somente de suportar hematopoiese, mas também de autorenovação e diferenciação em células da camada mesodérmica como os osteoblastos, condrócitos, adipócitos e mioblastos. Portanto, a medula óssea tem sido considerada uma boa fonte tanto para células-tronco hematopoiéticas (CTH) como CTMs (SMYTHE et al., 2001; PARTRIDGE, 2002; PRICE et al., 2007).

Recentemente, segundo pesquisas de Ayub-Guerrieri (2008), utilizando modelos murinos *mdx* (camundongos distróficos), foi constatado que as CTMs, em cultura, possuem a capacidade de fusão e diferenciação espontânea em fibras musculares, independentemente de outros tipos celulares ou de indução *in vitro* à miogênese. Desde então, vários estudos têm avançado no entendimento do fenótipo, fisiologia, potencial de diferenciação e possíveis aplicações clínicas dessas células.

Conforme pesquisas de Bacou *et al*., (2004), foi descrito miogênese *in vivo* pela primeira vez, apesar do seu estudo utilizar CTMs provenientes do tecido adiposo. Nesse estudo, células-tronco derivadas de gordura foram injetadas no músculo tibial anterior de coelhos após lesão induzida com

cardiotoxina. Os resultados mostraram que o músculo tratado apresentou-se mais pesado, com fibras musculares significativamente maiores e mais fortes.

Mizuno (2010) também demonstrou que células-tronco derivadas do tecido adiposo possuem a capacidade de se diferenciarem em células musculares esqueléticas *in vitro*, tanto em co-cultura com mioblastos como quando cultivadas em meio suplementado com soro de eqüinos. Além disso, foi observada a fusão espontânea dessas células e subseqüente formação de estruturas semelhantes à miotubos em passagens iniciais, com alta densidade celular. Adicionalmente, utilizando camundongos *mdx,* essas células derivadas do tecido adiposo também demonstraram capacidade para diferenciação miogênica *in vivo.*

Devido ao fato das MO-CTMs serem atualmente aprovadas para o tratamento de inúmeras doenças humanas, incluindo anemia de fanconi (KOHLI-KUMAR et al., 1994), deficiências imunológicas (GATTI et al., 1968), doenças metabólicas (PARKMAN et al., 1995) e imperfeita osteogêneses (HORWITZ et al., 2001), investigações sobre a habilidade das MO-CTMs na contribuição para a regeneração de fibras musculares, têm sido intensificadas.

2.7 Terapia Autóloga x Terapia Alogênica

As primeiras aplicações terapêuticas de células-tronco ocorreram com o uso de células multipotentes derivadas de tecidos adultos, tanto em transplantes autólogos como alogênicos (Lottenberg & Moreira-Filho, 2004).

Entende-se por autólogo o material transplantado que foi colhido do próprio indivíduo; alogênico é aquele proveniente de um doador que não seja o próprio indivíduo transplantado (Ferreira *et al*., 2011).

A terapia celular em eqüinos tem sido realizada utilizando-se MO-CTMs autólogas, ou seja, derivadas do próprio animal. SMITH *et al.* (2003) relataram o transplante de MO-CTMs autólogas no tendão flexor digital superficial de eqüinos e esse método está sendo usado para tratar diversos casos clínicos.

Apesar da maior descrição na utilização de CTMs em equinos ser feita na forma de transplantes autólogos, a aplicação de células alogênicas é uma alternativa, pois propicia o seu uso imediato, pela manutenção de um banco de células, além de eliminar fatores como predisposição genética e diminuição do potencial em decorrência do envelhecimento (LEUNG et al., 2006).

Baseado na medicina regenerativa, que tem como objetivo substituir células lesadas, o processo imune natural de rejeição de tecido alogênico poderia impedir a realização dessas ambições. No entanto, de acordo com achados de co-cultura *in vitro*, foi demonstrado que as CTMs evitavam essa rejeição em humanos e modelos animais (RYAN et al., 2005).

Três mecanismos principais contribuem para esse efeito. Primeiro, as CTMs são hipoimunogênicas, frequentemente com pouca expressão de MHC II e moléculas co-estimulatórias. Segundo, essas células previnem indiretamente a resposta das células T através da modulação das células dendríticas e diretamente, pelo rompimento das células natural killer, assim como a função das células T CD8+ e CD4+. Terceiro, as CTMs induzem a uma supressão local através da produção de prostaglandinas e interleucina-10 (RYAN et al., 2005).

Recentemente Guest et al., (2008) demonstraram que as células-tronco autólogas e alogênicas de equinos poderiam ser utilizadas sem, no entanto, provocarem efeitos indesejáveis no receptor, como a resposta imune mediada por células, possibilitando dessa forma, que a terapia com células autólogas e alogênicas sejam utilizadas no tratamento.

2.8 Marcação celular

A busca por métodos fluorescentes capazes de detectar cada vez menores quantidades de biomoléculas sofreu muitos avanços nos últimos anos (GWINN & VALLYATHAN, 2006). No entanto, foi com o advento da nanotecnologia que as perspectivas para a utilização de nanopartículas em diagnósticos de doenças tornaram-se a principal promessa das pesquisas médicas, principalmente com os estudos que envolvem administração de medicamentos, terapia e investigação genética, marcação molecular e métodos de detecção óptica, desencadeando uma revolução molecular (BORM, 2006).

Portanto, os pontos quânticos coloidais (Quantum dots) são nanocristais fluorescentes e fotoestáveis que vêm sendo utilizados com sucesso para a marcação de células *in vitro* e posterior identificação destas *in vivo* (BRUCHEZ, 2005).

A utilização dos nanocristais como marcadores fluorescentes (SZENT-GYORGVI et al., 2008) só ocorre porque há comprometimento do marcador

com a permeabilidade do plasma da membrana celular, por endocitose e quimiotaxia, e não provoca efeitos deletérios na fisiologia normal endocítica (AZZAZY et al., 2006). Além do mais, a fluorescência do nanocristal pode ser detectada por pelo menos quatro gerações celulares, sendo que algumas células podem permanecer marcadas por até duas semanas. Esse tempo é suficiente para acompanhar até mesmo um vírus ou uma mitose celular ao longo de um processo biológico (DONALDSON et al., 2004).

Pesquisadores do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária de Santa Maria (UFSM) estão utilizando células-tronco adultas *in vivo* e cultivadas, colhidas da medula óssea na regeneração de lesões provocadas cirurgicamente em tecidos de cães (tendões e ossos) com variados graus de vascularização, em trabalhos experimentais e aperfeiçoando protocolos de transplantes destas nas lesões com finalidades terapêuticas. Portanto, os grupos de pesquisa estão utilizando nanomarcadores Qtracker 655 com objetivo de identificação e quantificação de céulas-tronco *in vivo* e *in vitro* precedendo o transplante tecidual e posteriormente durante as fases de cicatrização (OLSSON et al., 2011)

Recentemente, pesquisadores do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu (UNESP), também vêm desenvolvendo pesquisas utilizando CTMs, colhidas da medula óssea (OLIVEIRA, 2011 e CARMO, 2012) e tecido adiposo de equinos (CARVALHO, 2012), marcadas com o Qtracker 655 para o tratamento de tendinite induzida e posterior rastreamento dessas células.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar morfologicamente a resposta inflamatória do músculo *gluteus medius* sadio ao transplante autólogo e alogênico de células-tronco mesenquimais (CTMs), provenientes da medula óssea.

3.2 Objetivos específicos

- Comprovar a morfologia fibroblastóide e a aderência das CTMs;
- Caracterizar fenotipicamente as CTMs com os marcadores $CD44^{+}$, $CD90^{+}$ e $CD34^{-}$, por meio de citometria de fluxo.
- Avaliar a capacidade de diferenciação *in vitro* das CTMs nas linhagens condrogênica, osteogênica e adipogênica.
- Padronizar a marcação e a detecção das CTMs com nanocristal Qtracker 655®.
- Avaliar a possibilidade de detectar, por meio de ultrassonografia do músculo *gluteus medius*, as CTMs autólogas e alogênicas, marcadas com nanocristal Qtracker 655®.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção dos animais

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizados 15 eqüinos mestiços, adultos, fêmeas e machos, com idade entre 6 e 12 anos e peso corporal entre 300-500 kg. Os animais receberam capim picado, feno de *Coast Cross* e concentrado comercial, duas vezes ao dia. Adicionalmente, o fornecimento de água e sal mineral foi *ad libitum*.

Durante a fase experimental os animais foram mantidos em piquetes no Hospital Veterinário da Universidade Estadual Paulista-UNESP/Botucatu.

Duas semanas antes de iniciar o experimento, todos os equinos foram vermifugados, pesados e submetidos ao exame físico. Somente animais clinicamente sadios foram utilizados no experimento.

4.2 Delineamento

No estudo foram utilizados três grupos de cinco animais, sendo Grupo 1 (controle), Grupo 2 (CTMs autólogas) e Grupo 3 (CTMs alogênicas).

Os animais dos grupos 2 e 3 foram submetidos à punção de medula óssea na região do esterno no décimo quinto dia do experimento, de forma que cada animal do grupo 2 recebesse célula do próprio doador e os animais do grupo 3 recebessem células de doadores diferentes, escolhidos aleatoriamente dentro do grupo. Após a coleta, esse material foi encaminhado ao Laboratório de Reprodução Avançada e Terapia Celular (LANÇA) do Dep. de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da FMVZ/UNESP Botucatu, para isolamento, cultivo, diferenciação, caracterização e marcação das CTMs com nanocristal Qtracker 655®.

A linhagem de CTMs foi confirmada por marcadores de superfície, com leitura em citômetro de fluxo FACS Calibur no Hemocentro da Faculdade de Medicina – UNESP/Botucatu. Foi utilizado o protocolo padrão sugerido pelos fabricantes de cada um dos anticorpos primários (CD 34, CD 44 e CD 90) e secundários (goat anti-mouse IgG-FITC).

A diferenciação celular *in vitro* foi realizada após as células em cultivo atingirem uma confluência de aproximadamente 80%, sendo realizadas para as

linhagens adipogênica, osteogênica e condrogênica, seguindo metodologia do fabricante.

Para a marcação das CTMs foi utilizada uma garrafa de cultivo com aproximadamente 80% de confluência. O procedimento para marcação com o Qtracker® Cell Labeling Kit foi realizado conforme metodologia descrita pelo fabricante (Invitrogen®).

Foi utilizada uma média de 2 x 10^6 células, as quais foram marcadas, suspensas em PBS e inoculadas no músculo *in vivo*, sendo o grupo 1 (n=5) inoculado 100uL de PBS (solução salina tamponada com fosfato); grupo 2 (n=5) e grupo 3 (n=5), foi utilizado 100uL de CTMs autólogas e alogênicas, respectivamente, marcadas com o nanocristal.

O transplante celular foi realizado no trigésimo dia do experimento, no músculo *gluteus medius* direito, com o auxílio do US, para a determinação do local e profundidade do procedimento. A aplicação foi realizada utilizando uma agulha hipodérmica 40x12mm e uma seringa de 1mL, para que a biópsia fosse possível de ser realizada no mesmo ponto. O local e a profundidade foram marcados por meio da alteração na ecogenicidade, observada no local de aplicação das células, em relação às fibras musculares adjacentes.

Foram realizadas duas biópsias no músculo *gluteus medius* direito desses animais, sendo a primeira no dia zero e a segunda, 24h após o transplante das células, ou seja, no trigésimo primeiro dia do experimento (Figura 1). A segunda biópsia foi realizada próximo ao local da primeira biópsia. Portanto, baseado nas mensurações realizadas ao exame ultrassonográfico, vinte e quatro horas após o transplante, foi realizada uma biópsia muscular possibilitando a colheita do fragmento muscular no local onde as células foram implantadas.

As amostras musculares foram congeladas e avaliadas por meio de técnicas histológicas e histoquímicas.

As principias etapas, bem como os tempos de coleta realizados no presente estudo estão apresentadas na figura abaixo.

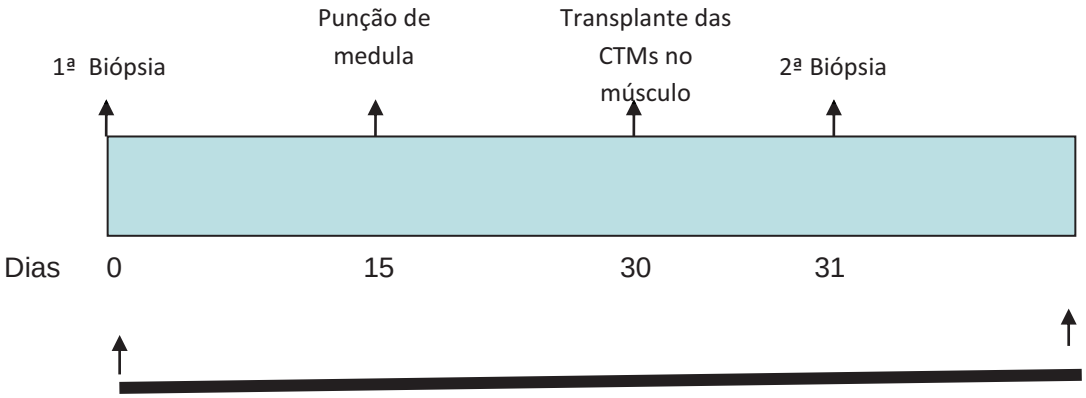


FIGURA 1 - Linha do tempo das diferentes etapas do experimento – Biópsias, punção de medula óssea e transplante de CTMs no músculo.

Adicionalmente, foi realizado o transplante de CTMs marcadas com nanocristal e células não marcadas, para a visualização por meio de ultrassonografia, da imagem obtida.

4.2.1 Punção Aspirativa da Medula Óssea

A punção aspirativa da medula óssea foi realizada conforme a metodologia descrita por Barreira et al. (2008) com modificações. Para isso, os animais foram mantidos em estação, contidos em brete e sedados com xilazina[1] (0,5 mg kg^{-1}). Em seguida, foi realizada a tricotomia de uma área de 5 x 20 cm na região referente ao osso esterno de cada equino, desde a região cranial do manúbrio até a cartilagem xifóide. Após a identificação da 5ª esternébra, foi realizada anti-sepsia[2] local e bloqueio anestésico[3]. Posteriormente foi introduzida a agulha de punção de medula óssea, modelo *Jamshidi*[4] 10 G, penetrando na musculatura por uma profundidade de 4-6 cm até chegar à superfície da esternebra. Após sentir essa superfície óssea na extremidade da agulha, uma pressão maior foi realizada a fim de permitir sua penetração por mais 4-5 cm, até a agulha ficar firme. Uma vez bem fixa a agulha dentro do esterno, o mandril foi retirado e se procedeu a aspiração das células da medula óssea com auxílio de uma seringa de 20mL contendo 1mL de heparina a 1000 UI/mL (Figura 2). A primeira alíquota foi colocada em placa

[1] Sedazine Fort Dodge - Rua Luiz Fernando Rodriguez, 1701, Campinas, SP. CEP:13065-858.
[2] Iodo povidine a 1% - Rioquimica Industria Farmacêutica. Av. Tarraf, 2590/2600. São José do Rio Preto, SP. CEP: 15057-430

[3] Hipolador®- Rododvia BR 262 km 123. Borges Sabará, MG. CEP: 31950-640
[4] Terumo Corp, Tokyo, Japan

de Petri para a verificação visual da presença de espículas e glóbulos de gordura, sugerindo assim a origem medular da amostra. Após este procedimento, foram coletadas duas seringas de 20mL, contendo 2mL de heparina e 2mL de PBS cada. Essas amostras foram identificadas, acondicionadas em gelo e encaminhadas ao laboratório LANÇA da FMVZ/UNESP Botucatu, o qual se encontra equipado adequadamente para a realização do isolamento e cultivo celular. Esse procedimento foi realizado sob a orientação da Profa. Dra. Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga.



FIGURA 2 – Punção de medula óssea no esterno de eqüino. (A) Agulha de punção sendo introduzida no esterno; (B) Aspiração de medula óssea.

4.2.2 Isolamento e Cultivo das CTMs

No LANÇA as amostras de medula óssea foram filtradas utilizando-se um filtro de equipo de transfusão[5] a fim de remover os coágulos que possam estar presentes. Em seguida foi procedida à primeira centrifugação[6] do material, sendo o sobrenadante (plasma e gordura) descartado e o material remanescente reservado. Ao material remanescente foi adicionado o meio de cultivo DMEM baixa glicose/F12[7] na proporção de 1:1. Posteriormente, a essa mistura foi adicionado lentamente Ficoll- paque[tm] premium 1073[8], seguido de uma nova centrifugação a 1500 rpm, por 40 minutos, para a obtenção da camada de células mononucleares, onde estão presentes as células

[5] Biosani Ind Com Prod Medicos Odontologicos Ltda. Av. Thereza de Souza Carneiro, Distrito industrial, Arapoti, PR. CEP: 84990-000
[6] Centrifuga Hermle Z200A. Gosheimer Strabe,56,5678564, Wehingen, Germany.

[7] Invitrogen Brasil Ltda. GIBCO®. Rua Breno Ferraz do Amaral, 408, São Paulo. SP. CEP: 04124-020.
[8] GE Healthcare Life Sciences. Rua : Domingos Marchetti, 192, Bairro do limão, São Paulo, SP. CEP: 02712-150

mesenquimais. A camada (halo) de células mononucleares (Figura 3), observada após centrifugação, foi aspirada cautelosamente e acondicionada em um novo tubo, acrescida do meio DMEM baixa glicose/F12 , na proporção de 1:1.

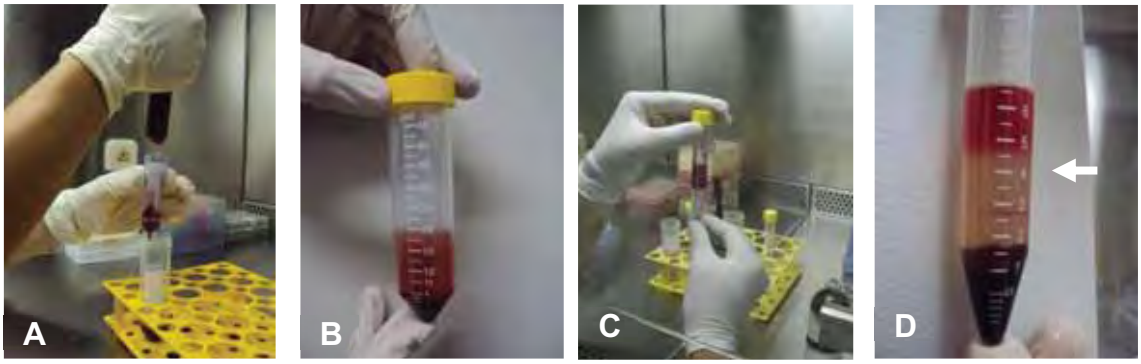


FIGURA 3 – Isolamento de CTMs. (A) Medula óssea sendo filtrada em laboratório; (B) Plasma resultante da primeira centrifugação; (C) Ficoll acrescido de medula; (D) Camada mononuclear (halo).

Em seguida, foi realizada uma centrifugação a 1500 rpm por 10 minutos para a remoção do de Ficoll- paque[tm] premium 1073 remanescente. O *pelet* de células resultantes foi resuspendido com o meio DMEM baixa glicose/F12 na proporção de 1:1. e submetido a uma nova centrifugação a 1500 rpm por 10 minutos. Após essa centrifugação o sobrenadante foi descartado e ao novo *pelet* formado foi acrescido 1 mL do meio contendo DMEM alta glicose/F12 na proporção de 1:1, 20% soro fetal bovino[9], penicilina/estreptomicina[10] (10 µl/mL) e anfotericina B[11] (3µg/mL). O volume dessa suspensão foi colocado em uma garrafa de cultivo[12], acrescida de 20 mL de meio contendo DMEN alta glicose/F12 na proporção de 1:1, 20% soro fetal bovino, penicilina/estreptomicina (10 µl/mL) e anfotericina B (3µg/mL) (Figura 4). As placas foram identificadas e incubadas em estufa[13] a 37ºC em atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% CO_2. Nas primeiras 48 horas, as placas não foram manipuladas para que houvesse a adesão celular. Entretanto, após esse período as garrafas foram monitoradas periodicamente e o meio de cultura foi trocado a cada 3 ou 4 dias.

[9] Invitrogen Brasil Ltda. GIBCO®. Rua Breno Ferraz do Amaral, 408, São Paulo. SP. CEP: 04124-020.
[10] Invitrogen Brasil Ltda. Rua Breno Ferraz do Amaral, 408, São Paulo. SP. CEP: 04124-020.
[11] Invitrogen Brasil Ltda. Rua Breno Ferraz do Amaral, 408, São Paulo. SP. CEP: 04124-020.
[12] Sarstedt Ltda. Alameda Ásia, 144, Polo Empresarial Tamboré, Santana do Parnaíba, SP. CEP: 06543-312
[13] Forma Scientific, Inc, USA.

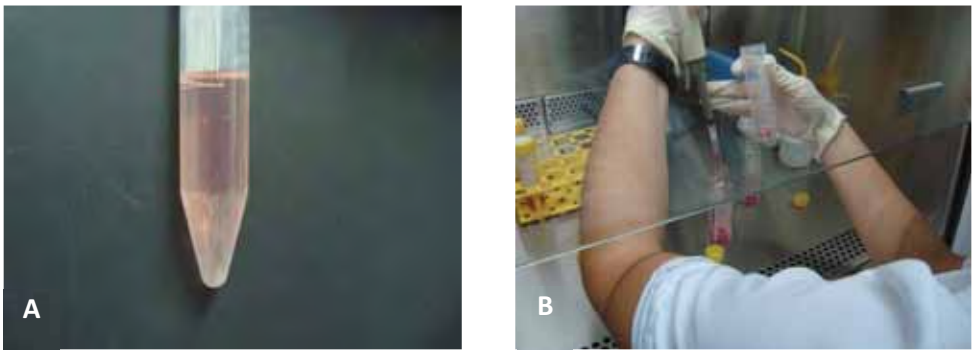


FIGURA 4 – (A) Pellet de células acrescido de DMEM; (B) Meio de cultivo contendo as células sendo depositado em garrafas de cultivo.

O repique das células foi realizado quando se atingiu uma confluência de aproximadamente 80%. Para isso, foi realizada a suspensão celular através do método enzimático que consiste da adição de tripsina, para que haja o rompimento das junções entre as células e estas se soltem do fundo da garrafa. O processo consiste em descartar o meio de cultivo das garrafas e adicionar uma solução de tripsina[14] a 0,25% a 37ºC. As garrafas foram então levadas para a estufa de cultivo por 5 minutos para que as células descolassem do fundo da garrafa. Com as células em suspensão, foram adicionados 2 ml de meio de cultura DMEM baixa glicose/F12 na proporção de 1:1, 20% soro fetal bovino, penicilina/estreptomicina (10 µl/mL) e anfotericina B (3µg/mL). Em seguida, se procedeu a centrifugação a 1500 rpm por 10 minutos para a remoção da tripsina que é tóxica às células. Posteriormente, o *pellet* resultante foi resuspendido e uma alíquota das células foi utilizada para o teste de viabilidade celular, com o objetivo de avaliar a percentagem de células viáveis para a aplicação. Para esse teste foi utilizado o corante azul de tripan[15]. As células não viáveis apresentam uma alteração na membrana a qual permite que o corante penetre no citoplasma. Portanto, as células viáveis e não viáveis foram observadas em microscópio com o auxílio de uma câmara de Neubauer.

[14] LGC Biotecnologia. Rua Pasadena, 235, Pq. Indústrial San Jose, Cotia , SP, CEP: 06715-864
[15] Interlab. Praça Isaac Oliver, 342, São Paulo, SP. CEP: 04330-030

4.2.3 Citometria de fluxo

A linhagem de células-tronco mesenquimais foi confirmada por marcadores de superfície, com leitura em citômetro de fluxo FACS Calibur[16] no Hemocentro da Faculdade de Medicina – UNESP/Botucatu. Foi utilizado o protocolo padrão sugerido pelos fabricantes de cada um dos anticorpos primários e secundários.

Marcadores Positivos: CD44[17], CD90[18] (anticorpos primários).

Marcadores Negativos: CD34[19] (anticorpo primário).

Para os marcadores de superfície celular foi utilizando o anticorpo secundário goat anti-mouse IgG-FITC[20].

Para o preparo das CTMs e análise em citômetro de fluxo, o primeiro passo é tripsinizar e ressuspender as células da garrafa em 1mL de PBS. Em seguida, filtrar esse conteúdo em um filtro de 70µc e dividir esse volume de 1mL em 5 tubos de citometria (200µL em cada).

É necessário o preparo de cinco tubos de citometria para cada animal, sendo esses: 200 µL de células somente, 200 µL de célula + anticorpo secundário, 200 µL de célula + 4 µL CD 34, 200 µL de célula + 2 µL CD 44, 200 µL célula + 2 µL CD 90. Incubar esse material por uma hora em temperatura ambiente e em local escuro.

Ao final desse período, adicionar 2 mL de PBS em cada tubo e centrifugar a 2500 rpm por 4 minutos. Retirar o PBS até a marca do tubo.

Nesse momento, os tubos com CD 34 e 90 estão prontos para análise.

O próximo passo é a diluição do anticorpo secundário em PBS e adicionar 20 µL dessa solução para cada tubo, contendo CD 44 e o anticorpo secundário com células, seguido de incubação por uma hora.

Ao final desse período, adicionar 2 mL de PBS em cada tubo, centrifugar a 2500 rpm por 4 minutos e retirar o PBS até a marca do tubo. Adicionar 2 mL de PBS novamente e centrifugar mais uma vez. Retirar o PBS até a marca do tubo, adicionar 200 µL de PBS em todos os tubos e levar para análise em citômetro de fluxo.

---

[16] Becton Dickinson Ind. Cirúrgicas Ltda. Rua Alexandre Dumas, 1976, Chácara Santo Antônio, São Paulo, SP. CEP: 04717-004.

[17] AbD serotec. MorphoSys UK Ltd, Endeavour House, Langford Business Park, Langford Lane, Kidlington, Oxford, OX5 1GE, UK.

[18] Caltag Laboratories. Bayshore Hwy Ste, 200, Burlingame, CA, USA. CEP: 94010-1210

[19] **Santa Cruz Biotechnology, Inc.** 2145 Delaware Avenue,95060, U.S.A.

[20] Molecular Probes® . Invitrogen Brasil Ltda. Rua Breno Ferraz do Amaral, 408, São Paulo. SP. CEP: 04124-020

4.2.4. Diferenciação Celular *in vitro*

Após confluência de 80% em cultivo primário, as CTMS foram resuspensas utilizando-se tripsina, como descrito anteriormente e acondicionadas em placas de seis Wells com meio DMEM/F12 (1:1), 20% soro fetal bovino, antibiótico e antifúngico. Quarenta e oito horas após a incubação, o meio de manutenção foi removido e o meio de diferenciação osteogenico e adipogênico STEMPRO® (Gibco) foi acrescido ao subcultivo. O meio foi trocado a cada dois a três dias e, a confirmação da diferenciação osteogenica e adipogenica foi realizada mediante a demonstração da deposição matriz cálcio utilizando o método de coloração histológico Alizarin red e da presença intracitoplasmatica de gotículas de gordura utilizando o corante Oil red.

Para a diferenciação condrogênica, as CTMs foram cultivadas em um pellet-3D em um tubo do tipo Falcon (15 ml) por 21 dias, sendo o meio de diferenciação condrogênico STEMPRO® (Gibco) trocado a cada três dias.

Para detectar a diferenciação condrogênica, as células foram coradas com a coloração de Alcian Blue pH 2,5 e Azul de Toluidina pH 1. Os aglomerados de células foram fixados com formol tamponado a 10% por 24 horas e incluído em parafina para realização dos cortes histologicos em seções de 5 mM de espessura para avaliação em microscopio de luz.

4.2.5. Marcação das CTMs com nanocristal Qtracker 655®

Para a marcação das CTMs foi utilizada uma garrafa de cultivo com 80% de confluência.

Conforme metodologia descrita pelo fabricante, Invitrogen®[21], as CTMS foram marcadas com o Qtracker® Cell Labeling Kit. Para esse procedimento, 1 µL do Componente A e 1 µL do Componente B Qtracker® foram adicionados, para cada $1x10^7$, em um eppendorf de 1.5mL e incubados em temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente, 200 µL de meio de cultivo completo: DMEN baixa glicose/F12 (1:1), 20% soro fetal bovino, penicilina/estreptomicina (10 µl/mL) e anfotericina B (3µg/mL), foram acrescidos ao eppendorf e agitado em vortex por 30 segundos.

[21] Invitrogen® : Qtracker 655 - Q25021MP - Rua Breno Ferraz do Amaral, nº 390/408 Jd. da Saúde, São Paulo/SP.

Segundo o fabricante, as células podem ser marcadas em suspensão ou aderentes à garrafa de cultivo. Decidimos utilizar a primeira opção. Para isso, as células foram resuspensas em tripsina, como descrito anteriormente e postas em um tubo falcon de 15mL. Uma alíquota dessas células foi utilizada para o teste de viabilidade e contagem celular. O restante foi acrescido da solução de marcação, previamente preparada, sendo então incubadas a 37º C, por 60 minutos. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes em meio de cultivo completo e visualizadas em microscópio de fluorescência.

4.2.6. Aplicação das CTMs marcadas, no músculo *gluteus medius.*

As células marcadas foram suspensas em 100 µL de PBS e inoculadas no músculo *in vivo*. A aplicação foi realizada com o auxílio de US, utilizando uma agulha hipodérmica 40x12mm e uma seringa de 1mL, para que a biópsia fosse possível de ser realizada no mesmo ponto. O local e a profundidade foram marcados através da alteração na ecogenicidade, observada no local de aplicação das células, em relação às fibras musculares adjacentes.

Baseado nas mensurações realizadas ao exame ultrasonográfico, vinte e quatro horas após o transplante, foi realizada uma biópsia muscular no local. A biópsia antes do transplante foi realizada com a agulha tipo Bergström 6,0 (6 mm) e após o transplante, foi realizada com um punch de 5mm.

4.2.7. Biópsia muscular

A biópsia foi realizada conforme Padilha et al., (2008). Para isso, o procedimento foi realizado no músculo *gluteus medius* e uma linha imaginária foi traçada da tuberosidade coxal até a crista ilíaca e numa distância em torno de 20 cm da primeira foi feita a tricotomia da área na região correspondente ao glúteo médio. Em seguida, foi feito um bloqueio anestésico subcutâneo com, aproximadamente 5 mL de Lidocaína 2% sem vasoconstritor. O anestésico não deve ser infiltrado no músculo. Após o bloqueio, uma incisão de 1,5 cm na pele, no subcutâneo e na fáscia muscular foi feita para que a agulha de biópsia penetre no local.

O aparelho de biópsia é uma agulha tipo Bergström 6,0 (6 mm), que consiste em uma agulha externa, um cilindro interno de corte e um mandril (estilete). A agulha contendo o cilindro de corte é empurrada através da incisão

para o músculo nas profundidades de 20mm e 60mm. O cilindro é parcialmente retirado para expor a janela lateral da agulha, que é então pressionada contra o músculo. Isso permite que um pequeno fragmento de músculo seja introduzido através da janela para o lúmen da agulha. O fragmento é então separado, inserindo-se completamente o cilindro de corte. Isso é repetido várias vezes até obter-se cerca de 200 mg de músculo. A agulha é então retirada, e o mandril é usado para empurrar a amostra para fora da agulha (Speirs, 1999). Uma sutura com ponto simples (Nylon 0,40 mm) pode ser realizada na pele após o término da biópsia.

Conforme descrito por Padilha et al., (2008), a amostra então retirada ficou por alguns segundos numa placa de Petri fechada com uma gaze embebida em soro fisiológico para que qualquer processo de contração muscular cessasse. Em seguida, foi envolta por talco neutro, que funciona como um crioprotetor com o intuito de se proteger a arquitetura muscular dos efeitos da congelação. O fragmento foi então armazenado em um cassete para enfim sofrer o processo da congelação em nitrogênio líquido ficando estocada em uma temperatura de -160ºC em um botijão apropriado.

Para que sejam realizados os cortes desse material e análises histológicas e histoquímicas, o fragmento muscular foi retirado do nitrogênio líquido e colocado em temperatura de -20ºC em um criostato (Figura 5).

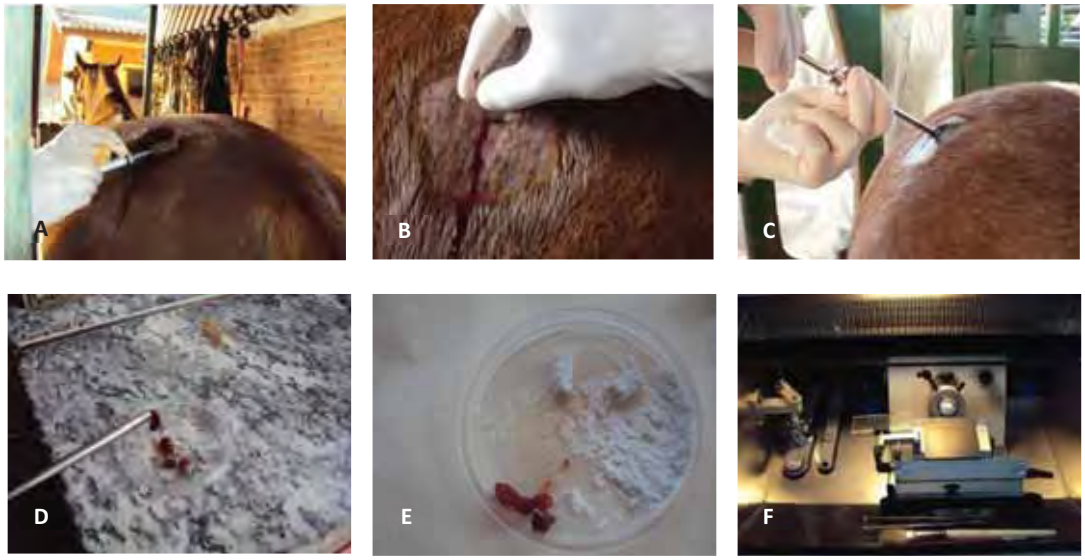


FIGURA 5 – Procedimento de biópsia muscular. (A) Bloqueio anestésico local na pele e subcutâneo; (B) Incisão da pele, subcutâneo e fáscia com lâmina de bisturi; (C) Agulha tipo Bergström sendo introduzida no músculo; (D) Mandril sendo utilizado para empurrar a amostra; (E) Músculo envolto em talco crioprotetor na placa de petri; (F) Amostra de músculo em criostato.

4.2.8. Colorações histológicas

Para observar a arquitetura de cada lâmina foram realizadas duas técnicas histológicas, Hematoxilina & Eosina (HE) e o tricrômio de Gomori Modificado.

Nessas colorações analisamos a morfologia das fibras musculares, dos elementos não contráteis, como nervos, vasos sanguíneos, tecido conjuntivo, tecido adiposo e núcleos (DUBOWITZ & SEWRY, 2007).

4.2.9. Coloração histoquímica

A técnica histoquímica realizada foi o NADH – tretrazolium redutase (NADH – tr) onde foi observada a capacidade oxidativa de cada célula (DUBOWITZ & SEWRY, 2007).

As lâminas que sofreram a reação pelo NADH-tr foram digitalizadas pelas imagens observadas à microscopia óptica, através do programa Leica Qwin, um analisador de imagens, para que se pudesse obter o resultado diferenciando os três tipos de fibras musculares (I, IIA e IIX).

5. RESULTADOS

A técnica de coleta de medula óssea na região do esterno demonstrou ser um método rápido e de fácil execução.

Em média obteve-se 40 mL de medula óssea em cada animal, sendo este volume obtido em duas seringas de 20mL (contendo PBS e heparina). Após o processamento e isolamento da camada mononuclear, as células foram colocadas em garrafas para o cultivo em laboratório.

No primeiro dia de observação, foram visualizadas inúmeras células mononucleares, com formato arredondado, em suspensão no meio de cultura, não sendo possível distinguir os tipos celulares. Após quatro a cinco dias, foi possível observar o início da aderência e morfologia fibroblastóide, característica das CTMs. Posteriormente, aproximadamente no sétimo dia de cultivo, já era possível observar a formação de colônias (Figura 6). As trocas do meio de cultura permitiram a remoção das células não aderentes e manutenção de um ambiente favorável ao desenvolvimento e expansão celular.

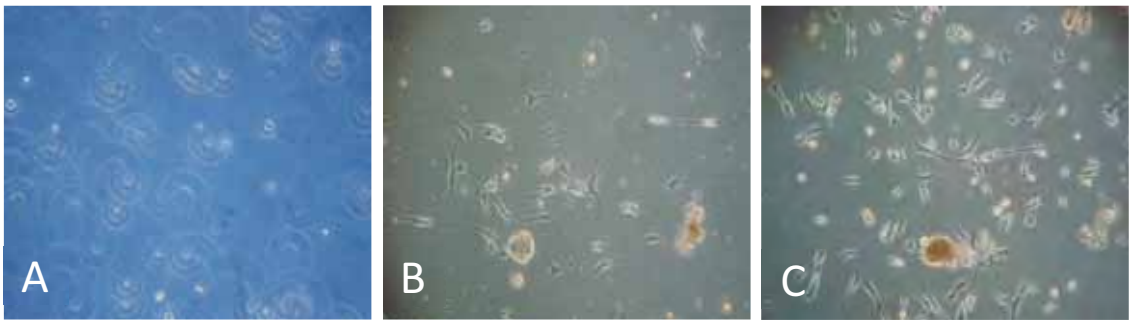


FIGURA 6 – CTMs em cultivo, aumento de 20x. (A) Células em suspensão na garrafa de cultivo; (B) Aderência e início de morfologia fibroblastóide após 4d de cultivo; (C) Formação de colônias após 7d de cultivo.

A avaliação das células após 20 dias de cultivo demonstrou a disposição das células em monocamada e a manutenção da morfologia alongada, semelhante a fibroblastos.

Uma amostra da cultura de cada animal foi destinada à caracterização imunofenotípica através de citometria de fluxo, utilizando os marcadores CD34, CD44 e CD90 (Figura 7). No grupo 2 (Autólogo), os resultados revelaram uma média de expressão negativa para CD34 (0,51%) e positiva para CD44 (81,68%) e CD90 (87,72%); No grupo 3 (Alogênico), os resultados revelaram

uma média de expressão negativa para CD34 (1,82%) e positiva para CD44 (92,10%) e CD90 (81,03%), caracterizando as células cultivadas como CTMs (Quadro 1).

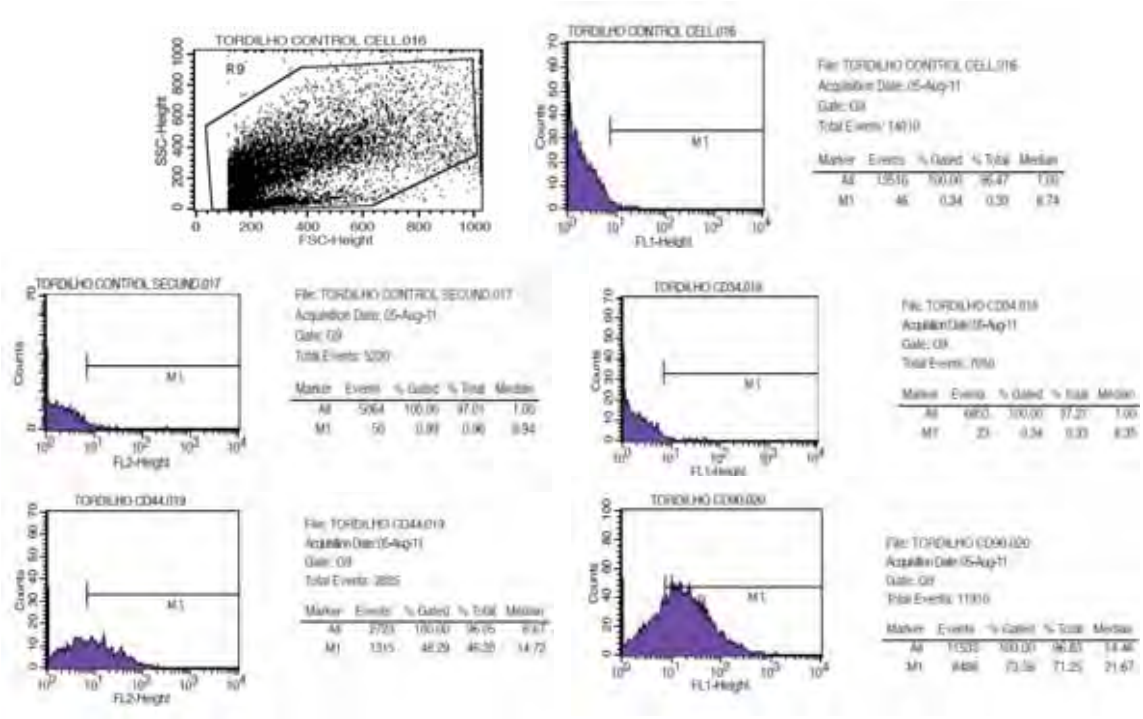


Figura 7 – Citometria de fluxo para os marcadores CD34, CD44 e CD90.

QUADRO 1: Caracterização imunofenotípica das CTMs no grupo 2 (autólogo) e grupo 3 (alogênico).

	Animal	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**Média**
G2	**CD34 (%)**	0,25	0,07	1,61	0,34	0,31	0,51
	CD44 (%)	85.57	73,64	83,85	96,05	81,68	81,68
	CD90 (%)	95.91	73,74	82,51	96,83	97,81	87,72
G3	**CD34 (%)**	1,95	1,78	2,34	2,05	1,00	1,82
	CD44 (%)	87,85	91,94	89,19	86,83	96,35	92,10
	CD90 (%)	97,52	69,58	94,75	93,96	64,54	81,03

Em média, observou-se uma viabilidade celular de 85%, com média de 2,37x10^7 células viáveis.

Uma amostra da cultura de cada animal foi destinada à diferenciação celular *in vitro* nas linhagens adipogênica, osteogênica e condrogênica.

Na diferenciação adipogênica, observou-se a presença de vacúolos de lipídios intracelular, corados com Oil Red (Figura 8a).

Na diferenciação osteogênica foi observada modificação morfológica e calcificação da matriz extracelular, além de aglomerados de células arredondadas, semelhantes a osteoblastos, corados com Alizarin Red (Figura 8b).

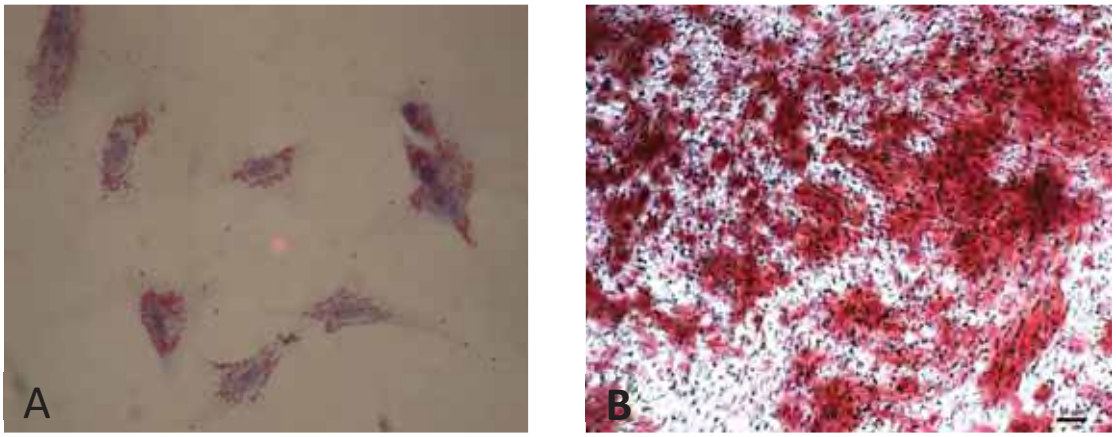


FIGURA 8 – Diferenciação celular. (A) Diferenciação adipogênica apresentando vacúolos de lipídios intracelular, corados com Oil Red, aumento de 40x; (B) Diferenciação osteogênica apresentando calcificação da matriz extracelular, corados com Alizarin Red, aumento de 20x.

Na diferenciação condrogênica foi observada a presença de áreas metacromaticas indicando a presença de matriz extracelular rica em proteoglicano (Figura 9).

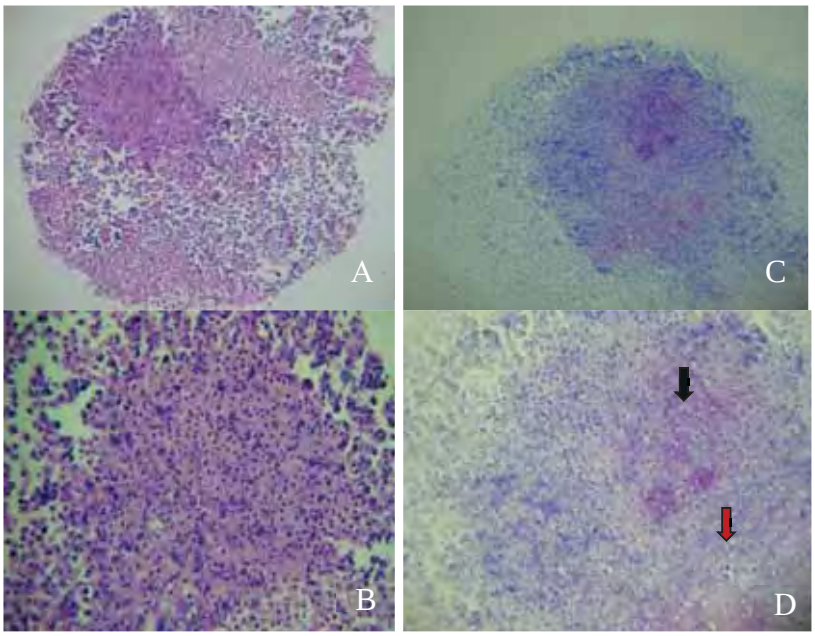


FIGURA 9 - Diferenciação condrogênica. A e B) Micro pellet corado com Hematoxilina e eosina. Nota-se uma região mais densa no corte histológico compatível com deposição de matriz. C e D) Micro pellet corado com azul de toluidina. Nota-se a presença de áreas metacromaticas em rósea (seta preta) indicando a presença de matriz extracelular rica em proteoglicano. Adicionalmente, nota-se a presença de lacunas (região da seta vermelha) possivelmente contendo condrocitos.

A marcação das CTMs com nanocristal Qtracker 655®, baseado no protocolo do fabricante, demonstrou ser uma técnica eficaz, sendo possível visualizar alta fluorescência citoplasmática (cor vermelha) nas células nanomarcadas (Figura 10).

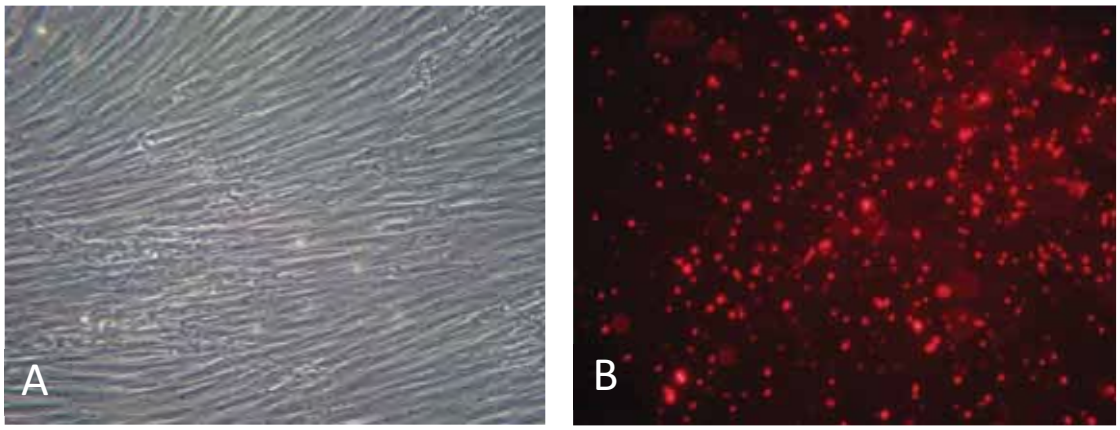


FIGURA 10 – CTMs em cultivo, aumento de 20x. (A) CTMs com aproximadamente 80% de confluência; (B) CTMs marcadas com o nanocristal Qtracker 655®.

A aplicação das CTMs marcadas foi realizada com o auxílio de uma agulha hipodérmica 40x12mm, no músculo glúteo médio dos equinos do Grupo

2 e Grupo 3. Após vários testes, padronizamos a suspensão das células utilizando 100µL de volume.

O momento da aplicação também foi guiado com o auxílio do Ultrassom MyLab 70, sendo possível mensurar a profundidade e o local onde as células foram transplantadas. A imagem ultrassonográfica revelou uma área hiperecóica em relação as fibras musculares adjacentes (Figura 11), facilitando a localizaçao das células no momento do transplante.

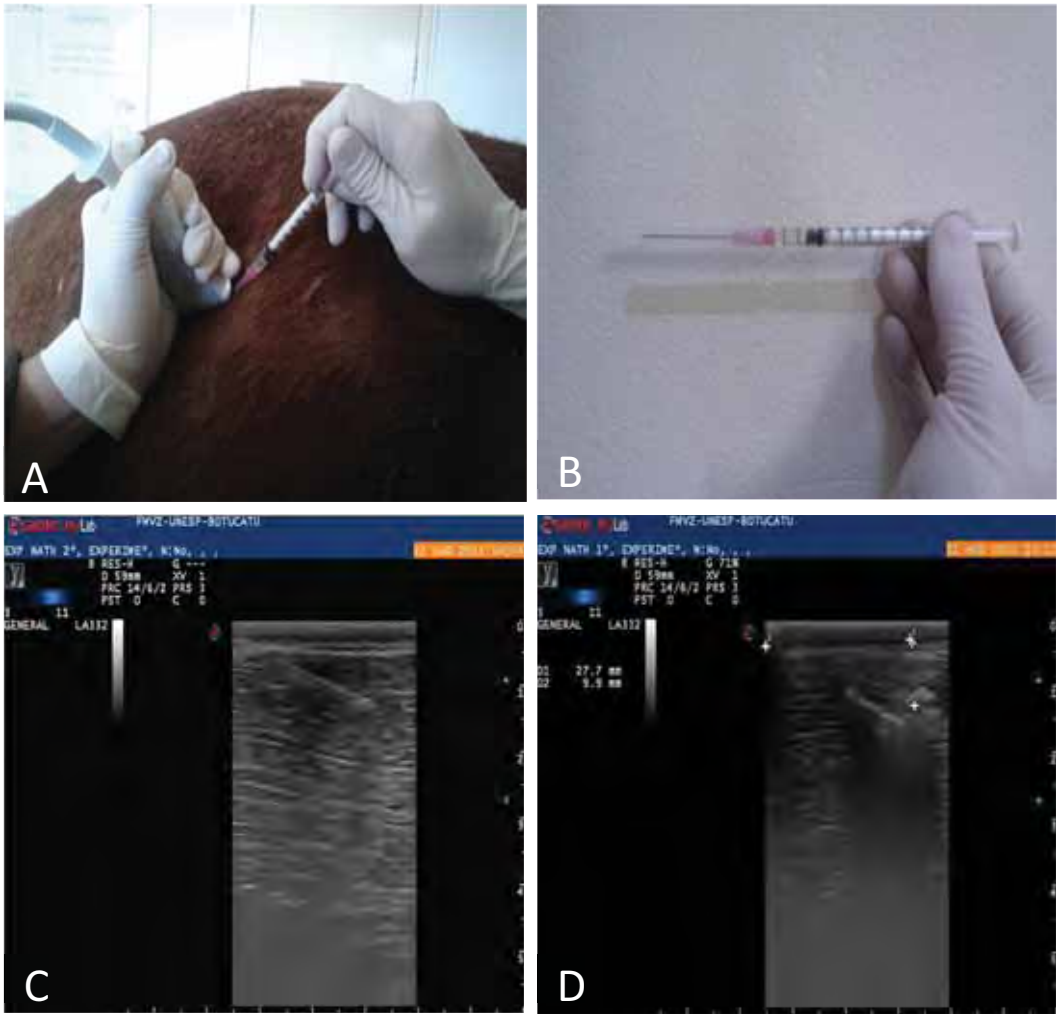


FIGURA 11 – Aplicação de CTMs marcadas com nanocristal no tecido muscular. (A) Aplicação guiada por US, utilizando agulha 40x12; (B) Suspensão das células em 100 µL; (C) Visualização da agulha penetrando no músculo no US; (D) Aplicação das células, exibindo uma imagem hiperecóica em relação ás fibras adjacentes.

Adicionalmente, foi observado ao US, que as CTMs marcadas apresentaram ecogenicidade diferente da imagem exibida com as células-tronco não marcadas com nanocristal, no momento do transplante (Figura 12).

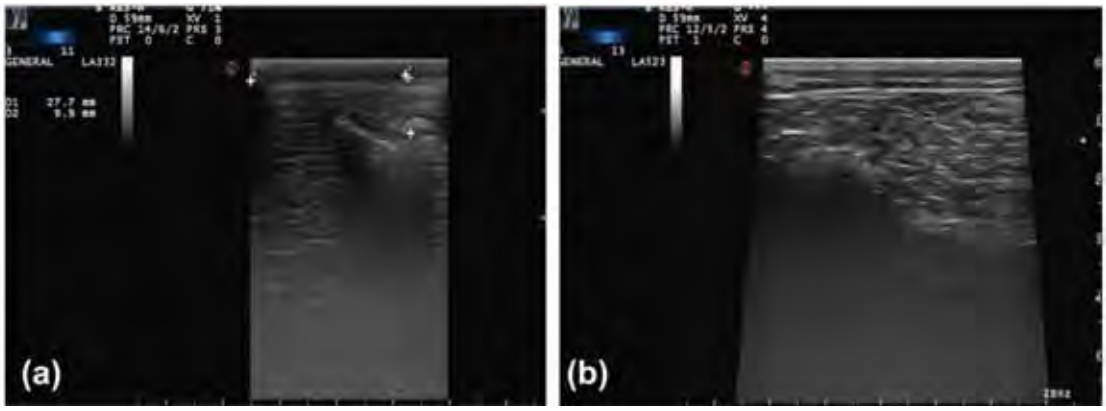


FIGURA 12 – (a) Imagem hiperecóica de CTMs marcadas no músculo; (b) Imagem hipoecóica à isoecóica de CTMs não marcadas.

A técnica de biópsia muscular demonstrou ser rápida e prática, no entanto, foi observado que a agulha de biópsia danifica bastante o músculo, tornando inferior a qualidade da amostra. Isso foi detectado no momento em que se realizava os cortes no criostato e posterior visualização em micrsocópio.

Baseado nisso, as biópsias antes do transplante foram realizadas com a agulha tipo Bergstrom e as biópsias realizadas pós-inoculação foram realizadas utilizando um punch (Figura 13). Dessa forma, a tentativa era manter ao máximo, a integridade do tecido.

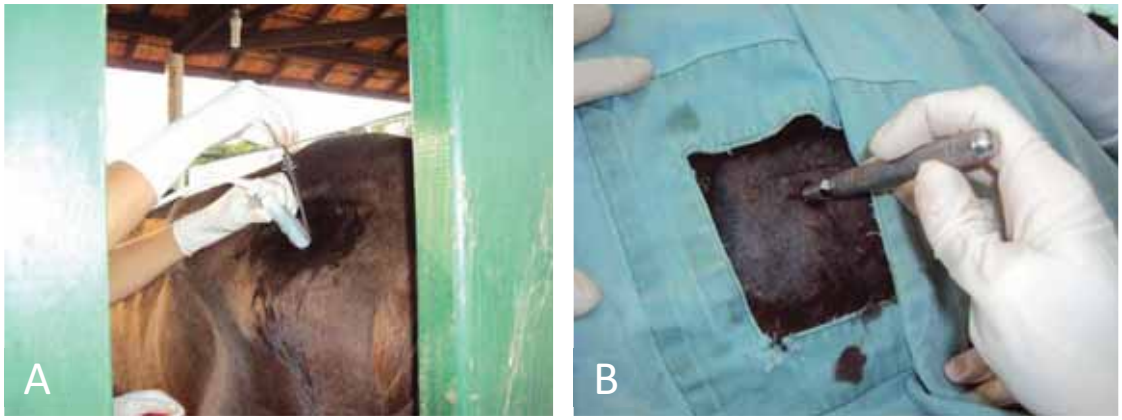


FIGURA 13 – Biópsia muscular guiada por US. (A) Biópsia, antes do implante celular, utilizando agulha tipo Bergstrom; (B) Biópsia, pós-inoculação, utilizando um punch.

Adicionalmente, é importante salientar que apesar das biópsias terem sido realizadas, ambas no *gluteus medius* direito, elas não foram realizadas no mesmo ponto, ou seja, a biópsia após o transplante foi realizada em uma região logo ao lado da primeira, uma vez que o local referente à primeira biópsia apresentou fibrose.

A biópsia muscular, após o transplante das CTMs marcadas, demonstrou imagens que sugeriram a presença das células no tecido.

Apesar da leitura do nanocristal ser feita no filtro vermelho (devido ao seu comprimento de onda 655), primeiramente as células foram lidas no filtro azul, pois facilitava a localização das mesmas, sendo possível visualizar as fibras musculares (Figura 14).

Dentre a dez lâminas analisadas para identificação de células-tronco por meio de nanocristais Qtracker 655®, todas apresentaram fluorescência quando examinadas por meio do microscópio fluorescente. Em contrapartida, o controle não apresentou fluorescência.

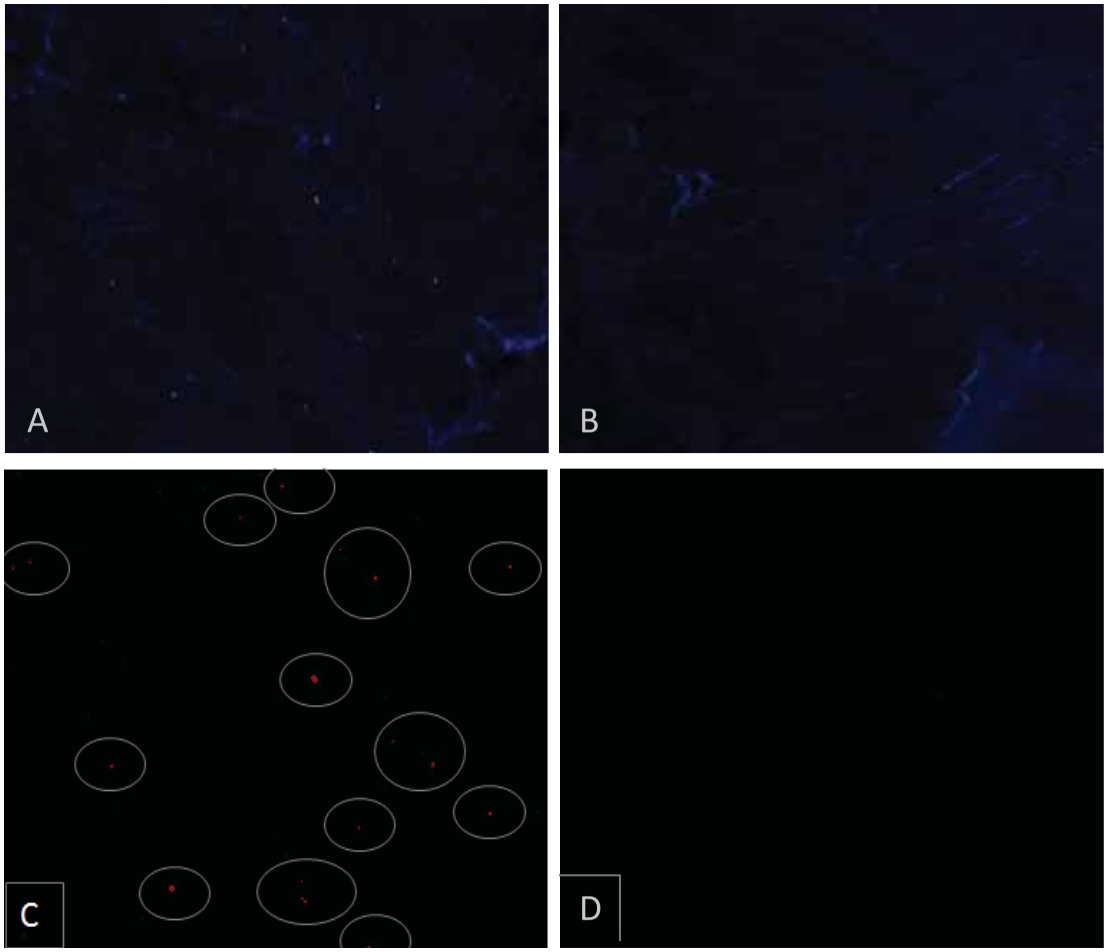


FIGURA 14 – Análise da fluorescência em microscópio, aumento de 20x. (A) CTMs marcadas, visualizadas em filtro azul; (B) Grupo controle visualizado em filtro azul; (C) Fluorescência de CTMs marcadas em filtro vermelho (detalhe); (D) Grupo controle analisado em filtro vermelho.

Do ponto de vista histológico, as lâminas foram avaliadas na coloração de hematoxilina-eosina e Gomori, utilizando uma classificação para fatores como aumento no número de vasos, desarranjo de fibras e aumento da celularidade.

Apesar de algumas lâminas apresentarem aumento no número de vasos, tanto no grupo controle como nos tratados, de maneira geral, não foram observadas alterações na morfologia de ambos os tecidos, que sugerissem reação inflamatória à inoculação das CTMs (Figuras 6, 7 e 8).

Grupo Controle

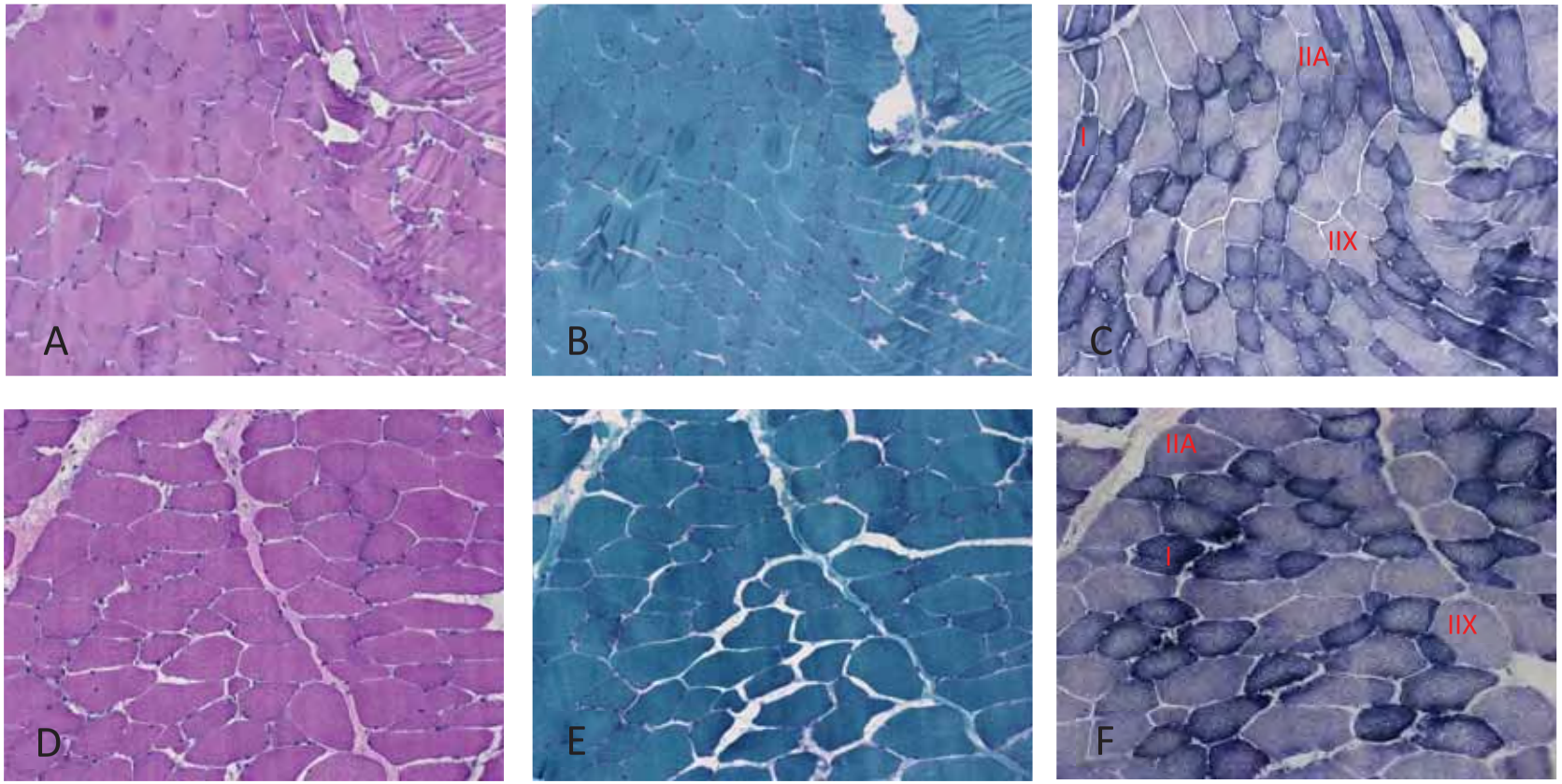


FIGURA 15 – Avaliação histológica (HE e Gomori) e histoquímica- NADH-tr (Destaque-Fibras tipo I, IIA e IIX) do Grupo Controle, aumento de 20x. (A,B,C) Biópsia antes do transplante das CTMs; (D,E,F) Biópsia após o transplante das CTMs.

Grupo Autólogo

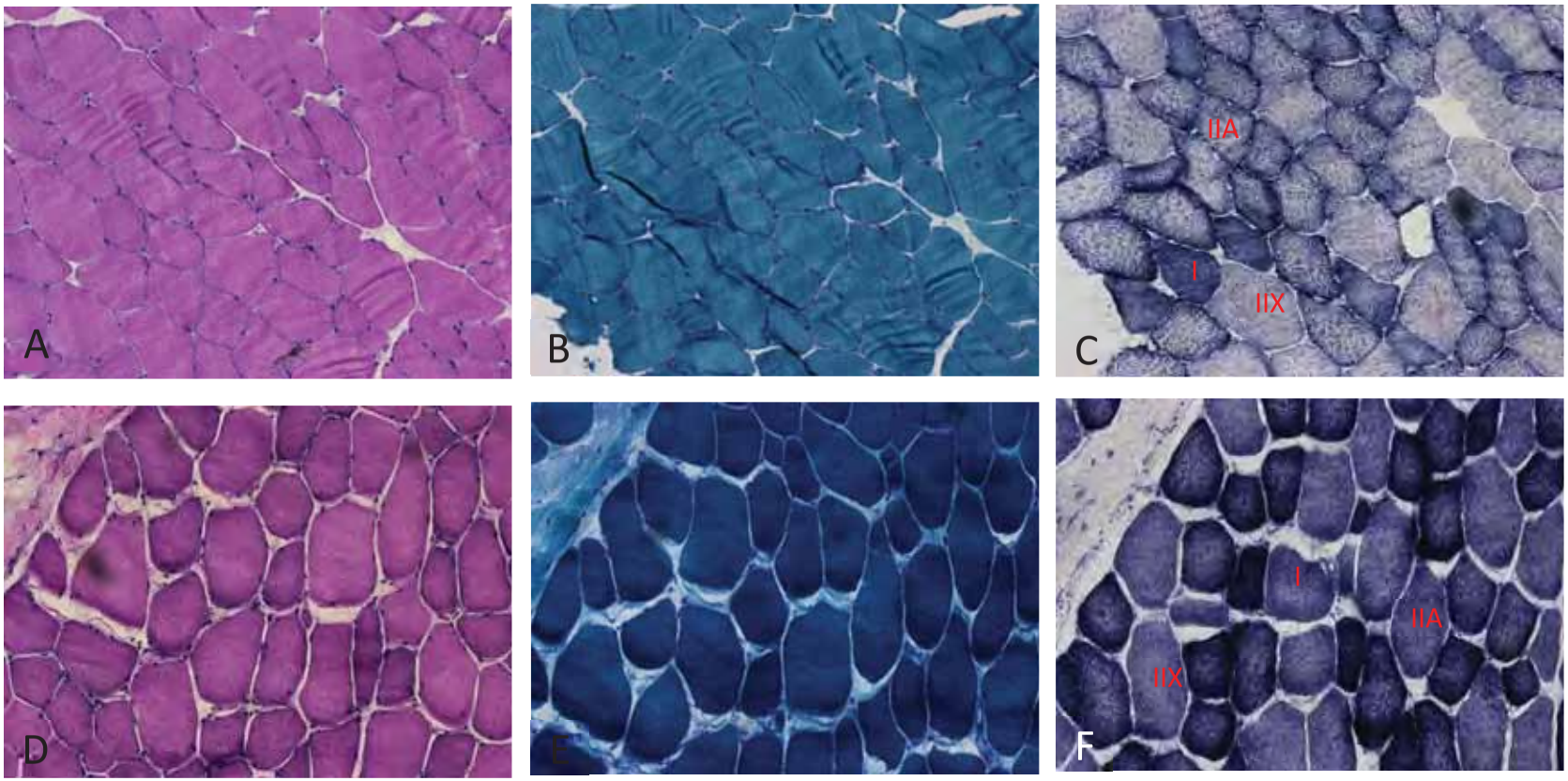


FIGURA 16 – Avaliação histológica (HE e Gomori) e histoquímica- NADH-tr (Destaque-Fibras tipo I, IIA e IIX) do Grupo Autólogo, aumento de 20x. (A,B,C) Biópsia antes do transplante das CTMs; (D,E,F) Biópsia após o transplante das CTMs.

Grupo Alogênico

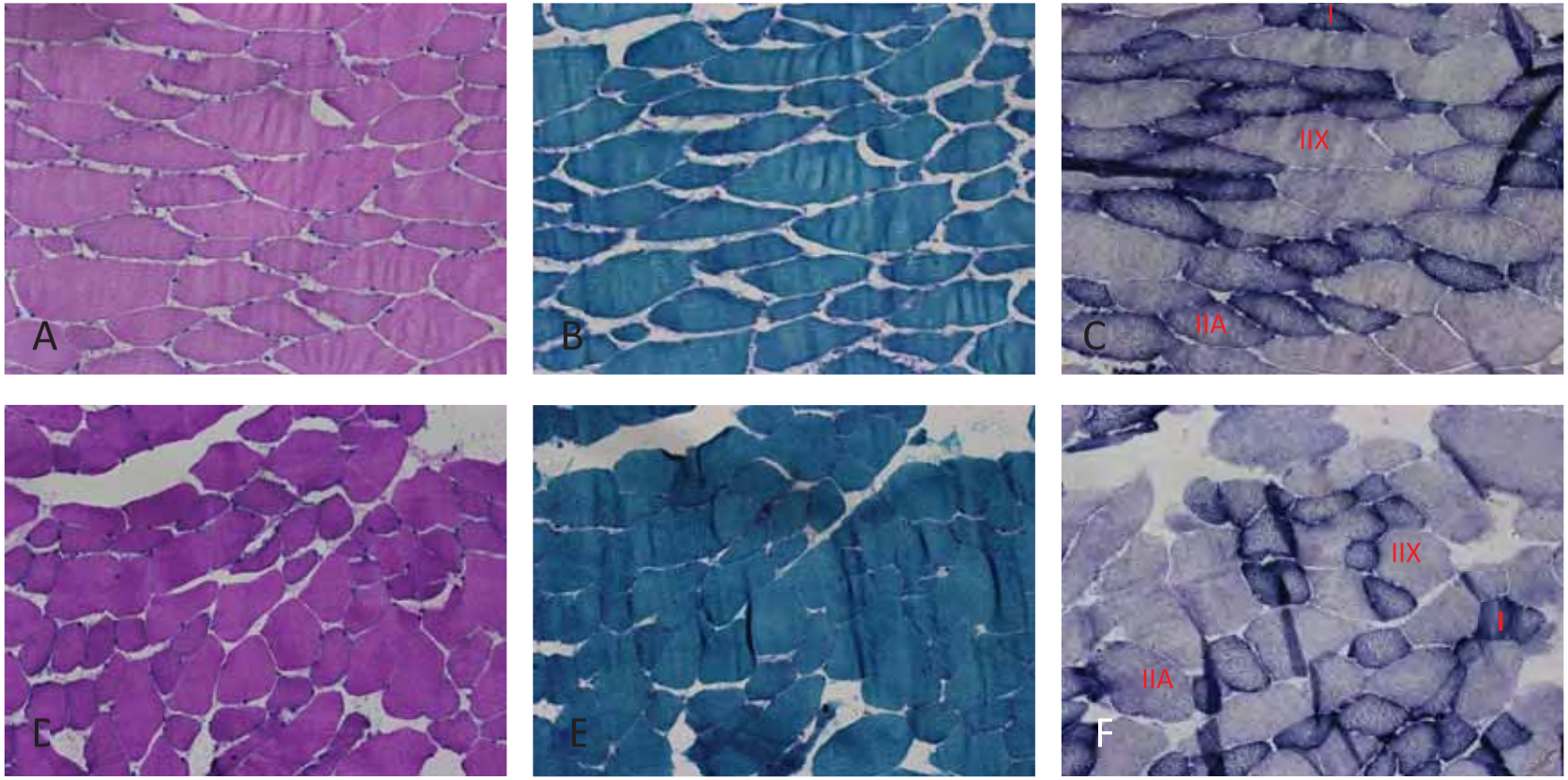


FIGURA 17 – Avaliação histológica (HE e Gomori) e histoquímica – NADH-tr (Destaque-Fibras tipo I, IIA e IIX) do Grupo Alogênico, aumento de 20x. (A,B,C) Biópsia antes do transplante das CTMs; (D,E,F) Biópsia após o transplante das CTMs.

6. DISCUSSÃO

O volume total de cada amostra medular foi de 30-40mL, sendo suficiente para obtenção de uma média aproximada de $2,37x10^6$ células, ocorrendo variações como $7,74x\ 10^6$ e $1,12x\ 10^6$, entre os animais. Woster et al., (2000) documentaram que, embora tenham utilizado um volume inicial de 30mL, em um estudo com o aspirado medular de três cavalos, obtiveram um número total de células bastante diferente entre os animais ($18,8x10^6$, $1,87x10^6$ e $4,85x10^6$). Segundo Vidal et al., (2007), a razão para a variabilidade individual ainda é desconhecida, mas é possível que a idade e a massa corporal possam interferir no número de células-tronco nos tecidos, o que pode explicar a variação no presente trabalho.

Apesar do uso constante de células cultivadas, alguns autores, como Barreira et al., (2008), citaram a possibilidade de utilização da fração mononuclear para o implante em equinos, no entanto, esta é uma mistura heterogênea de vários tipos celulares. De acordo com Barry e Murphy (2004), a população de CTMs presentes na medula óssea é uma pequena porção das células coletadas, por isso é necessário a utilização da técnica de cultivo celular para a sua expansão.

Segundo Smith et al., (2003), as CTMs obtidas a partir da medula óssea de equinos podem ser separadas utilizando-se técnicas semelhantes às utilizadas para outras espécies, no entanto, a técnica não foi descrita completamente. O método de isolamento empregado nesse trabalho, utilizando o gradiente de densidade Ficoll, assim como a determinação da viabilidade celular (utilizando Azul de Trypan e câmara de Neubauer), foram descritos anteriormente por Alves et al., (2009). Adicionalmente, ainda citaram a necessidade de adaptações no protocolo de isolamento destas células, nas técnicas já descritas para outras espécies, pois os cavalos apresentam rápida coagulação do sangue medular e formam agregados celulares, mesmo na presença de anticoagulantes, justificando assim a utilização do equipo de transfusão para filtrar a medula.

Baseado nos critérios da ISCT e segundo descrições de Koch et al., 2009, a propriedade das CTMs de aderência à placa de cultura não é suficiente para considerar a população celular purificada. Portanto, foi necessária a

caracterização celular através de citometria de fluxo e diferenciação celular nas linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica.

As análises no citômetro revelaram uma expressão negativa para CD34; positiva para CD44 e CD90. Os resultados encontrados para $CD34^-$ e $CD44^+$ estão de acordo com a descrição de Copland et al, (2008), que descreveram a reação cruzada entre os anticorpos específicos para a espécie canina com os epítopes de equinos. Já a marcação $CD90^+$, vem de encontro com a descrição de Ocarino et al., (2008) e Kode et al., (2009), os quais relataram que as células hematopoiéticas, que possam estar presentes no cultivo, não expressam esses marcadores.

Quanto ao critério de diferenciação celular, a presença de vacúolos ricos em lipídeos, corados com Oil-Red, foi utilizada para detectar a indução adipogênica, estando os resultados semelhantes aos encontrados por Maciel (2010).

A diferenciação osteogênica foi confirmada pela deposição de cálcio no meio extracelular através da coloração pelo Alizarin Red, observando-se modificação da morfologia celular de aspecto fusiforme (típico de MSC) para cubóide. Esta modificação é considerada um indicativo da ocorrência de diferenciação celular e está de acordo com o encontrado por Jaiswal et al. (1997.)

Portanto, a aderência em placa de cultura com morfologia fibroblastóide, imunofenotipagem e capacidade de diferenciação em cultura, sob estímulos específicos, caracterizam como CTMs as células cultivadas, na presente pesquisa, de acordo com o estabelecido pela ISCT.

Uma vez obtida a amostra de medula, seguidas de cultivo celular, uma alíquota foi separada para o teste de viabilidade, sendo importante por permitir saber o número de células viáveis a serem injetadas no músculo. O restante das células foi utilizado para a marcação com o nanocristal Qtracker 655®.

Os nanocristais fluorescentes utilizados no presente trabalho apresentaram excelente marcação celular, podendo ser observados no tecido muscular. O protocolo para marcação das células com o Qtracker 655® foi rápido, de fácil execução e proporcionou ótimos resultados, apresentando alta fluorescência. Esses resultados estão de acordo com a descrição de Oliveira et al., (2009), os quais descreveram que o atrativos dessa tecnologia são a

simplicidade da marcação e a fácil e indiscutível detecção do sinal fluorescente emitido.

Donaldson et al., (2004) e Garon et al., (2007) descreveram que a fluorescência do nanocristal poder ser detectada por pelo menos quatro gerações celulares, podendo ainda permanecerem marcadas por até duas semanas em algumas células. Portanto, o período de 24h, definido para biópsia e identificação das células marcadas, no tecido muscular, se mostrou satisfatório e de acordo com a literatura, uma vez que a fluorescência encontrada foi evidente e estava dentro do período descrito para visualização.

A grande dificuldade observada nesse projeto foi a recuperação dessas células no tecido. Uma das explicações para isso seria o fato de não estarmos realizando a biópsia no local exato do transplante e por isso, passamos a utilizar o US como auxílio. Portanto, analisando as descrições de Ayub-Guerrieri (2008), que relatou a visualização de células-tronco marcadas e inoculadas em músculo de camundongos em um período de até três dias, podemos dizer que a biópsia realizada vinte e quatro horas após o transplante das CTMs marcadas em nosso experimento está dentro de um período de visualização da fluorescência no músculo.

Apesar da alta fluorescência observada, poucas células marcadas foram encontradas no local. A detecção do local do transplante foi guiada por US, descartando a possibilidade de a biópsia ter sido realizada em local diferente de onde as células foram implantadas. Esse fato pode ser explicado baseado nas pesquisas de Oliveira et al., (2009), que realizaram um estudo utilizando CTMs de cordão umbilical humano, marcadas com o nanocristal Qtracker 655® em suínos com infarto do miocárdio induzido. Os animais foram sacrificados sete dias após o transplante e as análises dos cortes histológicos do coração mostraram que um número pequeno de CTMs ficou retido no local. Em média, observaram-se duas células marcadas em cada corte correspondente à região infartada. Adicionalmente, nesse estudo foram aplicadas dez milhões de células ($1x10^7$), quando comparadas à nossa pesquisa, onde foram transplantadas em média aproximadamente dois milhões de células ($2,37x10^6$). Portanto, a visualização de poucas células marcadas em nosso estudo está de acordo com os achados de Oliveira et al., (2009), ressaltando-se ainda a necessidade de identificação futura dessas células por meio de

imunoistoquímica para excluir, por exemplo, a possibilidade de visualização de macrófagos que fagocitaram células marcadas.

Adicionalmente, Olsson (2009), Oliveira et al. (2009) e Salbego (2010) obtiveram resultados similares. Em estudo, verificaram que o nanocristal Qtracker 655® é realmente eficiente na marcação celular, embora seu tempo de viabilidade como marcador seja relativamente curto, não permitindo o acompanhamento da atividade celular por períodos mais prolongados. Oliveira et al., (2010) e Olsson (2009) também concluíram que não se pode afirmar que as células marcadas emitem fluorescência após uma semana do transplante no foco da fratura. É possível que a fluorescência detectada à microscopia, após sete dias de observação, seja proveniente de células mortas localizadas no interior de fagócitos ou em atividade no foco de fratura, havendo a necessidade de uma análise mais profunda da fluorescência celular em microscopia multifocal.

A técnica de biópsia muscular foi realizada segundo Padilha et al., (2008), que descreveram a técnica como rápida, prática e de fácil realização, estando de acordo com o observado em nosso estudo. No entanto, percebemos que a agulha de biópsia tipo Bergstrom, apesar de ser bastante prática, tornava ruim a qualidade do material, pois o músculo apresentava-se muito danificado ao corte em criostato.

Dubowitz e Sewry (2007) relataram que, nas últimas duas décadas, as biópsias musculares, tanto para diagnóstico como para pesquisa, têm sido realizadas utilizando a agulha de biópsia. Descreveram a utilização da agulha como um procedimento seguro, livre de complicações e ainda promovendo uma cicatrização quase que imperceptível, estando de acordo com os achados no presente estudo. Adicionalmente, citaram a vantagem da biópsia cirúrgica possibilitar a obtenção de fragmentos maiores, no entanto, essa técnica promove diagnósticos semelhantes aos obtidos através das biópsias utilizando agulha. Portanto, apesar dessas descrições, partimos do pressuposto observado em nosso experimento e passamos a utilizar um punch para as biópsias realizadas no momento pós-inoculação, uma vez que o nosso interesse era observar a qualidade das fibras e a presença das CTMs marcadas, sendo necesário obter uma amostra maior e menos danificada.

De acordo com Dubowitz e Sewry (2007), a coloração de HE é utilizada rotineiramente para a visualização da estrutura e núcleo de fibras musculares, assim como fibrose, tecido adiposo e presença de células inflamatórias. Adicionalmente, esse autor descreveu a facilidade da observação de tecido conjuntivo, morfologia e núcleo das fibras através da coloração de Gomori. Portanto, as colorações utilizadas nesse estudo estão de acordo com a literatura, sendo possível avaliar a resposta inflamatória, uma vez que esse processo, segundo Zachary e McGavin (2012), provoca alterações no tamanho das fibras, na localização dos núcleos e presença de células inflamatórias no local.

Baseado nas descrições de Dubowitz e Sewry (2007), a coloração de NADH-tr é uma técnica histoquímica utilizada para avaliar o metabolismo oxidativo das fibras musculares, no entanto não foram observadas alterações nesse mecanismo, mostrando que não houve prejuízo ao metabolismo das fibras.

Do ponto de vista histológico, através de colorações como HE e Gomori, não foram observadas características de fase aguda, como necrose tecidual, edema e infiltrado inflamatório. Adicionalmente, a análise da morfologia das fibras musculares e tecidos adjacentes, assim como a localização dos núcleos, apresentaram-se com padrão muscular normal, estando de acordo com Zachary e McGavin (2012). Portanto, baseado nas descrições desses autores que descreveram o início da resposta inflamatória muscular à injúria como sendo o desaparecimento do núcleo nas fibras necróticas e o sarcoplasma tornando-se hialinizado, devido à perda de estrutura miofibrilar, não houve esse tipo de alteração nas lâminas analisadas. Tanto os grupos tratados como o grupo controle apresentaram os mesmos padrões, demonstrando que morfologicamente, as células não provocaram uma reação inflamatória local, em um período de 24h.

Segundo Zachary e McGavin (2012), dentro de um período de 24 a 48h os monócitos atravessam a parede dos capilares, transformando-se em macrófagos e chegam à porção necrótica da fibra muscular para executarem a fagocitose dos debris celulares. Concomitantemente, as células satélites são ativadas à multiplicação, dando origem aos mioblastos, que se fundem para a formação de novas fibras. Portanto, o período de 24h após o transplante de

CTMs marcadas, no qual foi realizada a segunda biópsia, é suficiente para observar o início de um processo inflamatório no tecido muscular. O aumento no número de vasos, observado em algumas lâminas, ocorreu de forma isolada, mostrando que a alteração observada não corresponde à uma resposta inflamatória, uma vez que as fibras apresentaram-se intactas e com os núcleos na periferia. Complementando esse fato, foi observado que esses vasos apresentaram-se mais alongados, justificando mais uma vez que as alterações, quando verificadas, tenham ocorrido pelo ângulo de corte do material. Adicionalmente, essa característica foi observada tanto em lâminas do grupo controle como dos grupos tratados, constatando-se que as CTMs não provocaram reação inflamatória no tecido muscular.

Baseado na literatura de Frisbie e Smith (2010), o grande interesse na utilização de CTMs está relacionado ao seu efeito imunomodulador, anti-inflamatório e antiapoptótico, estando de acordo com os resultados encontrados na presente pesquisa, onde não foram observadas características que sugerissem uma resposta inflamatória provocada em resposta à inoculação das células. Em relação à utilização de células alogênicas, segundo Ryan et al., (2005) três mecanismos principais contribuem para que essas células não provoquem resposta imune no hospedeiro. Primeiro, as CTMs são hipoimunogênicas, frequentemente com pouca expressão de MHC II e moléculas co-estimulatórias. Segundo, essas células previnem indiretamente a resposta das células T através da modulação das células dendríticas e diretamente, pelo rompimento das células natural killer, assim como a função das células T CD8+ e CD4+. Terceiro, as CTMs induzem a uma supressão local através da produção de prostaglandinas e interleucina-10. Portanto, essa literatura, juntamente com análise das lâminas do presente trabalho, funcionou como suporte para a discussão, uma vez que foi verificado padrão semelhante nas lâminas dos grupos tratados, demonstrando que a aplicação de células alogênicas também não provoca efeitos inflamatórios no tecido muscular.

Apesar do presente estudo ter sido realizado em tecido muscular de equinos, esses achados também estão de acordo com as descrições de Guest et al., (2008), que utilizaram células alogênicas no tecido tendíneo de cavalos e não observaram reações inflamatórias, confirmando os resultados obtidos nessa pesquisa.

Segundo pesquisas de Ayub-Guerrieri (2008), que utilizaram camundongos como estudo, um dos obstáculos encontrados no caso das terapias celular e gênica para doenças envolvendo células largamente distribuídas pelo corpo, como as células musculares, é o desafio de disseminar as células ou os genes transplantados para os tecidos ou órgãos afetados.

7. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos neste estudo podemos concluir que:

- O transplante autólogo e alogênico de CTMs provenientes da medula óssea não provocou, morfologicamente, alterações inflamatórias no músculo *gluteus medius* de equinos.

- As células coletadas, isoladas e cultivadas preencheram os critérios exigidos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular, sendo portanto classificadas como células-tronco mesenquimais, pois apresentaram aderência ao plástico, morfologia fibroblastóide, diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica, assim como a expressão de $CD34^{-}$, $CD44^{+}$, $CD90^{+}$.

- A marcação celular utilizando o nanocristal Qtracker 655® foi eficaz e possibilitou a detecção das CTMs marcadas no músculo *gluteus medius*, por meio de imunofluorescência, 24h após o transplante.

- A utilização do US proporcionou detectar as CTMs marcadas com o nanocristal Qtracker 655, no músculo *gluteus medius*, no momento do transplante.

Apesar dos resultados obtidos, mais pesquisas são necessárias para a melhor compreensão da biologia dessas células.

8. BIBLIOGRAFIA

ALEMAN, M. A review of equine muscle disorders. *Neuromuscular Disorders,* v. 18, p. 277–287, 2008.

ALVES, A.L.G.; VIEIRA, M.EM.; BARREIRA, A.P.B.; MOTA, L.S.L.S.; SAITO, M.E.; KOHAYAGAWA; HUSSNI, C.A.; WATANABE, M.J.; OLIVEIRA, P.G.G. Protocolo de isolamento de células mononucleares de medula óssea de equinos. *Vet. e Zootec*., v.16, n.4, p.650-655, out., 2009.

APPELL, H. J.; FORSBERG, S., AND HOLLMANN, W. Satellite cell activation in human skeletal muscle after training: Evidence for muscle fiber neoformation. *Int. J. Sports Med.* 9**,** p.297–299, 1988.

ARMAND, O.; BOUTINEAU, A. M.; MAUGER, A.; PAUTOU, M. P.; AND KIENY, M. Origin of satellite cells in avian skeletal muscles. *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp.* 72**,** p.163–181, 1983.

AYUB-GUERRIERI, D. Estudo do potencial miogênico das células-tronco mesenquimais e embrionárias no modelo murino da distrofia muscular de duchenne. 2008. 114f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Departamento de Genética e Bióloga Evolutiva. Universidade de São Paulo, São Paulo.

AZZAZY, H.M.E.; MANSOUR, M.M.H.; KAZMIERCZAK, S.C. Nanodiagnostics: a new frontier for clinical laboratory medicine. *Clinical Chemistry*, v.52, p.1238-1246, 2006.

BACOU, F.; EL ANDALOUSI, R.B.; DAUSSIN, P.A., *et al*. Transplantation of adipose tissue-derived stromal cells increases mass and functional capacity of damaged skeletal muscle. *Cell Transplant*. v.13, p.103-11, 2004.

BARREIRA, A.P.B.; BACELLAR, D.T.L.; KIFFER, R.G.; ALVES, A.L.G. Punção aspirativa de medula óssea em eqüinos adultos para obtenção de células-tronco. *R. bras. Ci. Vet*., v. 15, n. 1, p. 56-59, jan./abr, 2008.

BARRY, F.; BOYNTON, R.E.; LIU, B. & MURPHY, J.M. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: Differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Expt. Cell Res*. v.268, p.189-200, 2001.

BARRY, F.P. & MURPHY, J.M. Mesenchymal stem cell: clinical applications and biological characterization. *The Inter. J. Bioch. Cell Biol*., v.36, p.568-584, 2004.

BENJAMIN, E.R.; MARTIN, F.P.; CHUI-YEE, FONG.; ALAN, T.; ARIFF, B. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nature Biotechnology*, v.18, april , 2000.

BEZERRA, J.R.P.S.; ILHA, M.R.S; LANGOHR, I.M. & BARROS, C.S.L. Intoxicação experimental por monensina em eqüinos. *Pesq. Vet. Bras*. v.20, n.3, p.102-108, 2000.

BISCHOFF, R. The satellite cell and muscle regeneration. *In* “Myogenesis” (A. G. Engel and C. Franszini-Armstrong, Eds.), v.2, p.97–118. McGraw–Hill, New York, 1994.

BRUCHEZ, M.P. Turning all the lights on: quantum dots in cellular assays. *Curr Opin Chem Biol.* v.9, n.5, p.533-7, 2005.

BULFIELD, G.; SILLER, W.G.; WIGHT, P.A., AND MOORE, K.J.X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA v.*81**,** p.1189–1192, 1984.

CARMO, M.T. Uso de celulas tronco no tratamento da endometrie crônica em éguas. 2012. Pós-doutorado - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, São Paulo.

CARVALHO, A.M. Implante de células tronco mesenquimais autólogas, associadas ao plasma rico em plaquetas em tendinites experimentais de equinos. 2012. 149f. Dissertação (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, São Paulo.

CASSART, D.; BAISE, E..; CHEREL, Y.; DELGUSTE, C.; ANTOINE, N.; VOTION, D..; AMORY, H.; ROLLIN, F.; LINDEN, A.; COIGNOUL, F. & DESMECHT, D. Morphological alterations in oxidative muscles and mitochondrial structure associated with equine atypical myopathy. *Equine Vet. J.* v.39, p.26-32, 2007.

CHARGE, S.B.P.; RUDNICKI, M.A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiological Reviews*, v.84, p.209–38, 2004.

COPLAND, I.; SHARMA, K.; LEJEUNE, L.; ELIOPOULOS, N.; STEWART, D.; LIU, P.; LACHAPELLE, K.; GALIPEAU, J. CD34 expression on murine marrow-derived mesenchymal stromal cells: impact on neovascularization. *Experimental Hematology*, v. 36, p. 93-103, 2008.

COSSU, G. Unorthodox myogenesis: possible developmental significance and implications for tissue histogenesis and regeneration. *Histol. Histopathol. v.*12, p.755-760, 1997.

COSSU, G.; MAVILIO, F. Myogenic stem cells for the therapy of primary myopathies: wishful thinking or therapeutic perspective? *The Journal of Clinical Investigation.* v.105, n.12, p.1669-1674, 2000.

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

DONALDSON, K.; STONE, V.; TRAN, C.L.; KREYLING, W. & BORM, P.J.A. Nanotoxicology. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, v.61, n.9, p.727-728, 2004.

DOUAT, E.S.V. Estudo comparativo do efeito do ultrassomterapêutico de 1MHZ com frequência de repetição de pulso de 100MHZ e 16 HZ no reparo de osteotomia por escareação em tíbia de rato. 2004. 74f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, São Paulo.

DRANCHAK, P.K.; VALBERG, S.J.; ONAN, G.W.; GALLANT, E.M.; MACLEAY, J.M.; MCKENZIE, E.C.; DE LA CORTE, F.D; EKENSTEDT, K. & MICKELSON, J.R. Inheritance of recurrent exertional rhabdomyolysis in Thoroughbreds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* v.227, p.762-767, 2005.

DUBOWITZ, V. & SEWRY, C.A. Histological and Histochemical stains and reactions. In: *Muscle biopsy-a practical approach*. 3 ed. Inglaterra: Saunders, 2007, cap.2, p. 21-40.

EMERY, A. E. The muscular dystrophies. *BMJ.* v.317**,** p.991–995, 1998.

FERRARI, G.; CUSSELLA-DE ANGELIS, G.; COLETTA, M.; PAOLUCCI, E.; STORNAIUOLO, A.; COSSU, G. AND MAVILIO, F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science v.*279, p.1528-1530, 1998.

FERREIRA, C.R.; MENDONÇA, C.E.A.X; JUNIOR, E.D.C.; OLIVEIRA, S.F. O uso autólogo e alogênico de células de cordão umbilical e suas implicações bioéticas. www.bioetica.catedraunesco.unb.br/.../05_cordao_umbilical.pdf . Acessado em 20/06/2012.

FIBBE, W.E. Mesenchymal stem cells. A potential source for skeletal repair. *Ann Rheum Dis*, v.61(Suppl II), p.29–31, 2002.

FRIEDENSTEIN, A.J.; GORSKAJA, U. & KALUGINA, N.N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Experimental Hematolog.*, v.4**,** p.267–274, 1976.

FRIEDENSTEIN, A.J.P.; PETROKOVA, K.V. Osteogenesis in transplant of bone marrow cells. *Journal of Embryological Experimental Morphology*. v.16, p.381-390, 1966.

FRISBIE D.D. & SMITH R.K.W. Clinical update on the use of mesenchymal stem cells in equine orthopaedics. *Equine Vet. J*. v.42, p.86-89, 2010.

GARGETT, C.E. Stem cells in gynaecology. *Australian and Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*, v.44, p.380-386, 2004.

GARON, E. B. et al. Quantum dot labeling and tracking of human leukemic, bone marrow and cord blood cells. *Leukemia Research*, v.31, p.643-651, 2007.

GATTI, R. A.; MEUWISSEN, H. J.; ALLEN, H. D.; HONG, R. AND GOOD, R. A. Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. *Lancet.* v.2, p.1366-1369, 1968.

GIBSON, M. C., AND SCHULTZ, E. Age-related differences in absolute numbers of skeletal muscle satellite cells. *Muscle Nerve* v.6**,** p.574–580, 1983.

GRINFELD, S. & GOMES, R.G.C. Células tronco: um breve estudo. *International Journal Of Dentistry*, Recife, v.3, n.1, p. 324-329 Jan / Jun, 2004.

GROUNDS, M. D., AND YABLONKA-REUVENI, Z. Molecular and cell biology of skeletal muscle regeneration. *Mol. Cell. Biol. Hum. Dis. Ser. v.*3, p. 210–256, 1993.

GROUNDS, M.D. Age-associated changes in the response of skeletal muscle cells to exercise and regeneration. *Ann. N. Y. Acad. Sci. v.*854**,** p.78–91, 1998.

GROUNDS, M.D.; GARRETT, K.L.; LAI, M.C.; WRIGHT, W.E.; BEILHARZ, M.W. *Cell Tissue Res.* v.267, p.99, 1992.

GUEST, D.J.; SMITH, M.R.W.; ALLEN, W.R. Monitoring the fate of autologous and allogeneic mesenchymal progenitor cells injected into the superficial digital flexor tendon of horses: preliminary study. *Equine Veterinary Journal*. v.40, n.2, p.178-181, 2008.

GWINN, M.R.; VALLYATHAN, V. Nanoparticles: health effects - pros and cons. *Environmental Health Perspectives*, v.114, n.12, p.1818-1825, 2006.

HAWKE, T.J. & GARRY, D.J. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J. Appl. Physiol*., v.91, p. 534-551, 2001.

HERZOG, E.L.; CHAI, L.; KRAUSE, D.S. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood.* v.102, p.3483-3493, 2003.

HESLOP, L.; MORGAN, J.E.; PARTRIDGE, T.A. Evidence for a myogenic stemcell that is exhausted in dystrophic muscle. *J Cell Sci*. v.113 (Pt 12), p.2299-308, 2000.

HORWITZ, E.M.; PROCKOP, D.J.; GORDON, P.L.; KOO, W.W.; FITZPATRICK, L.A.; NEEL, M.D.; MCCARVILLE, M.E.; ORCHARD, P.J.; PYERITZ, R.E. AND BRENNER, M.K. Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta. *Blood.* v.97, p.1227-1231, 2001.

INVITROGEN. Cellular analysis. *Biology in context*. California, 634p, 2007.

JAISWAL, N.; HAYNESWORTH, S.E.; CAPLAN, A.I.; BRUDER, S.P. Osteogenic Differentiation of Purified, Culture-Expanded Human Mesenchymal Stem Cells In Vitro. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 64, p. 295–312, 1997.

JIANG, Y.; JAHAGIRDAR, B.N.; REINHARDT, R.L.; SCHWARTZ, R.E.; KEENE,C.D.; ORTIZ-GONZALEZ, X.R.; REYES, M.; LENVIK, T.; LUND, T.;

BLACKSTAD, M.; DU, J.; ALDRICH, S.; LISBERG, A.; LOW, W.C.; LARGAESPADA, D.A. E VERFAILLIE, C.M. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature.* v.418, p.41-49, 2002.

JOHNSTONE, B.; HERING, T.M.; CAPLAN, A.I.; GOLDBERG, V.M. E YOO, J.U. In vitro chondrogenesisnof bone marrow derived mesenchymal progenitor cells. *Expt. Cell Res*. v.238, p.265-272, 1998.

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

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

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

KODE, J.A.; MUKHERJEE, S.; JOGLEKAR, M.V.; HARDIKAR, A.A. Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration. *Cytotherapy*. v.11, n.4, p.377-91, 2009.

KOERNER, J.; NESIC, D.; ROMERO, J.D.; BREHM, W.; MAINIL-VARLET, P. E GROGAN, S.P. Equine Peripheral Blood-Derived Progenitors in Comparison to Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem cells* v.24, p.1613-1619, 2006.

KOHLI-KUMAR, M.; MORRIS, C.; DELAAT, C.; SAMBRANO, J.; MASTERSON, M.; MUELLER, R.; SHAHIDI, N.T.; YANIK, G.; DESANTES, K.; FRIEDMAN, D.J. Bone marrow transplantation in Fanconi anemia using matched sibling donors. *Blood.* v.84, p.2050-2054, 1994.

LAI, Y.; DROBINSKAYA, I.; KOLOSSOV, E.; CHEN, C.; LINN, T. Genetic modification of cells for transplantation. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2007.

LEE, E.H.; HUI, J.H.P. The potencial of stem cells in orthopaedic surgery. *J. Bone Joint Surg*. v.88-B, p.81-851, 2006.

LEUNG, V.Y; CHAN, D.; CHEUNG, K.M. Regeneration of intervertebral disc by mesenchymal stem cells: potentials, limitations, and future direction. *Eur Spine J* ,v.3, p.406–413, 2006.

LEVENBERG, S.; HUANG, N.F.; ROGERS, A.B.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; LANGER, R. Differentiation of human embryonic stem cells on threedimensional polymer scaffolds. *Proc. Nat. Acad. Sci*. USA, v.10, n.22, 2003.

LEWIS, S.S.; VALBERG, S.J. & NIELSEN, I.L. Suspected immune-mediated myositis in horses. *J. Vet. Intern. Med*. v.21, p.495-503, 2007.

LI, N.; LI, X.R.; YUAN, J.Q. Effects of bone-marrow mesenchymal stem cells transplanted into vitreous cavity of rat injured by ischemia/reperfusion. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology.* v.247, n.4, p.503-514, 2009.

LOFSTEDT, J. White muscle disease of foals. *Vet. Clin. North Am*. *Equine Pract*. v.13, p.169-185, 1997.

LOTTENBERG, C.L; MOREIRA-FILHO, C.A. Aplicações terapêuticas das células-tronco: perspectivas e desafios. http://www.comciencia.br . Atualizado em 20/06/2012.

LUTH, E.S.; JUN, S.J.; WESSEN, M.K.; LIADAKI, K.; GUSSONI, E.; KUNKEL, L.M. Bone marrow side population cells are enriched for progenitors capable of myogenic differentiation. *Journal of Cell Science*, v.121, p.1426-1434, 2008.

MACIEL, B.B. Isolamento, cultivo e caracterização de células tronco mesenquimais da medula óssea e do tecido adiposo de gato. 2010. 108f. Dissertação (Mestrado) – Ciências Veterinárias - Universidade Federal do Paraná.

MARION, N.W.; MAO, J.J. Mesenchymal stem cells and tissue engineering. *Methods Enzymol.* v.420, p.339–361, 2006.

MARTIN, W.M.C.; MCNALLY, N.J. & DE RONDE, J. Enhancement of the effect of cytotoxic drugs by radiosensitizers. *Brit. J. Cancer.* v. 43, p.756, 1981.

MAURO, A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* v.9**,** p.493–495, 1961.

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

MIZUNO, H. The Potential for Treatment of Skeletal Muscle Disorders with Adipose-Derived Stem Cells. *Current Stem Cell Research & Therapy,* v.5, n*.2,* 2010.

OCARINO, N.M.; BOELONI, J.N.; GOES, A.M.; SILVA, J.F.; MARUBAYASHI U & SERAKIDES, R. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from osteopenic rats subjected to physical activity with and without nitric oxide synthase inhibition*. Nitric Oxide. Biology and Chemistry*, v.19, p.320-325, 2008.

ODORICO, J.S.; KAUFMAN, D.S.; THOMSON, J.A. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells.* v.19, p.193–204, 2001.

OLIVEIRA, D.M.; ALMEIDA, B.O.; MARTI, L.C.; SIBOV, T.T.; PAVON, L.F.; MALHEIROS, D.M.A.C.; CAMPOS, A.H. A marcação de células-tronco mesenquimais humanas com *quantum dots* possibilita a identificação de células transplantadas enxertadas em corações de porcos após o infarto do miocárdio*. Einstein*. v.7(3 Pt 1), p.284-289, 2009.

OLIVEIRA, G.K.; RAISER, A.G.; OLSSON, D.; SALBEGO, F.Z.; MARTINS, D.B.; DEZENGRINE, R.; SANTOS JÚNIOR, E.B.; RAPPETI, J.; TRINDADE, L.B.; TOGNOLI, G.K.; PIPPI, N.L.; SAUSEN, L. Autologue mononuclear stem cells and morphogenetic bone protein in experimentally induced tibial defect

healing in dogs. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.62, n.1, p.72-79, 2010.

OLIVEIRA, P.G.G. Estudo do nanocristal Qtracker 655 como marcador de células tronco mesenquimais pré e pós implante em tendinites experimentais em equinos. 2011. Dissertação (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, São Paulo.

OLSSON, D.C. Transplante de células-tronco com a fração total de células mononucleares autógenas da medula óssea na reparação aguda primária de tendão calcâneo de cães. 2009. 175f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul.

OLSSON, D.C.; PIPPI, N.L.; RAISER, A.G.; OLIVEIRA, G.K.; TREICHEL, T.L.E.; SALBEGO, F.Z.; Marcadores fluorescentes coloidais: conceitos e aplicações Ciência Rural, Santa Maria, v.41, n.6, p.1043-1050, jun, 2011.

PADILHA, F.G.F.; SUMA, R.; AMORIM, R.M. Avaliação prática da biópsia muscular percutânea por agulha em equinos. *A Hora Veterinária*, v.28, p.29-32, 2008.

PARKMAN, R.; CROOKS, G.; KOHN, D.B.; LENARSKY, C. AND WEINBERG, K. Bone marrow transplantation for metabolic diseases. *Cancer Treat. Res. v.*76, p.87-96, 1995.

PARTRIDGE, T.A. Myoblast transplantation. *Neuromuscul. Disord.* v.12 Suppl. 1, S3-S6, 2002.

PEEK, S.J.; SEMRAD, S.D. & PERKINS, G.A. Clostridial myonecrosis in horses (37 cases 1985-2000). *Equine Vet. J.* v.35, p.86-92, 2003.

PITTENGER, M.F.; MACKAY, A.M.; BECK, S.C.; JAISWAL, R.K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J.D.; MOORMAN, M.A.; SIMONETTI, D.W.; CRAIG, S.;

MARSHAK, D.R.. Multilineage potencial of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. v.284, p.143-147, 1999.

PRICE, F.D.; KURODA, K. AND RUDNICKI, M.A. Stem cell based therapies to treat muscular dystrophy. *Biochim. Biophys. Acta v.*1772, p.272-283, 2007.

ROSENBLATT, J.D.; YONG, D.; PARRY, D.J. Satellite cell activity is required for hypertrophy of overloaded adult rat muscle. *Muscle Nerve.* v.17**,** p.608–613, 1994.

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

SALBEGO, F.Z. Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado ao transplante da fração de células mononucleares da medula óssea. 2010. 211f. Dissertação (Doutorado)- Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul.

SAMPAOLESI, M.; BLOT, S.; D'ANTONA, G.; GRANGER, N.; TONLORENZI, R.; INNOCENZI,A.; MOGNOL,P.; THIBAUD,J.L.; GALVEZ,B.G.; BARTHÉLÉM Y,I.; PERANI, L.; MANTERO, S.; GUTTINGER, M.; PANSARASA, O.; RINALDI, C.; CUSELLA DE ANGELIS,M.G.; TORRENTE,Y.; BORDIGNON, C.; BOTTINELLI, R.; COSSU, G. Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. *Nature.*v.444, p. 574-579, 2006.

SCHULTZ, E. Fine structure of satellite cells in growing skeletal muscle. *Am. J. Anat.* v.147, p.49–70, 1976.

SCHULTZ, E.; JARYSZAK, D.L. Effects of skeletal muscle regeneration on the proliferation potential of satellite cells. *Mech. Ageing Dev.* v.30, p.63–72, 1985.

SMITH, R.K.W.; KORDA, M.; BLUNN, G.W. AND GOODSHIP, A.E. Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone

marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. *Equine vet. J., v.* 35, p. 99-102, 2003.

SMYTHE, G.M., HODGETTS, S.I.; GROUNDS, M.D. Problems and solutions in myoblast transfer therapy. *J. Cell. Mol. Med. v.*5, p.33-47, 2001.

SNOW, D.H.; BAXTER, P.; ROSE, R.J.: Muscle fiber composition and glycogen depletion in horses completion endurance ride. *Vet. Rec*., v.108, p.374, 1981.

SPONSELLER, B.T.; VALBERG, S.J.; TENNENT-BROWN, B.S.; FOREMAN, J.H.; KUMAR, P.; TIMONEY, J.F. Severe acute rhabdomyolysis associated with *Streptococcus equi* infection in four horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc*. v.227, p.1800-1807, 2005.

STASHAK, T.S. Claudicação em eqüinos Segundo Adams. São Paulo. Editora Rocca, 5ª ed., 2006.

SZENT-GYORGYI, C.; SCHMIDT, B.F; CREEGER, Y.; FISHER, G.W.; ZAKEL, K.L; ADLER, S; FITZPATRICK, J.A.J; WOOLFORD, C.A.; YAN, QI.; VASILEV, K.V.; BERGET, P.B.; BRUCHEZ, M.P.; JARVIK, J.W. & WAGGONER, A. Fluorogen-activating single-chain antibodies for imaging cell surface proteins. Nature biotechnology, v.26, p.235-240, 2008.

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

THOMSON, J.A.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; SHAPIRO, S.S.; WAKNITZ, M.A.; SWIERGIEL, J.J; MARSHALL, V.S.; JONES, J.M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* v.282, p.1145–1147, 1998.

VALBERG, S.J. Diagnostic approach to muscle disorders. In: Proceedings of the Annual Convention of the AAEP, 2006, San Antonio. Proceedings San Antonio, v.52, p. 340-346, 2006.

VIDAL, M.A., KILROY, G.E., LOPEZ M.J., JOHNSON, J.R., MOORE, R.M., GIMBLE, J.M. Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow derived mesenchymal stromal cells. *Veterinary Surgery*. v.36, p.613-622, 2007.

VIDAL, M.A.; KILROY, G.E.; JOHNSON, J.R.; LOPEZ, M.J.; MOORE, R.M. and GIMBLE, J.M. Cell Growth Characteristics and Differentiation Frequency of Adherent Equine Bone Marrow–Derived Mesenchymal Stromal Cells: Adipogenic and Osteogenic Capacity. *Vet Surg*. v.35, p.601-610, 2006.

WARD, T.L.; VALBERG, S.J.; ADELSON, D.L.; ABBEY, C.A.; BINNS, M.M.; MICKELSON, J.R. Glycogen branching enzyme (GBE1) mutation causing equine glycogen storage disease IV. *Mamm Genome*, v.15, p.570–7, 2004.

WEBSTER, C.; AND BLAU, H.M. Accelerated age-related decline in replicative life-span of Duchenne muscular dystrophy myoblasts: Implications for cell and gene therapy. *Somatic Cell Mol. Genet.* v.16, p.557–565, 1990.

WILSON, E. The Cell in Development and Inheritence, MacMillan, London, 1896.

ZACHARY, J.F.; McGAVIN, M.D. Skeletal Muscle. In: *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. 5.ed. St. Louis, Missouri, 2012. cap.15, p.880-883.

ZUK, P.A.; ZUH, M.; ASHJIAN, P. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell*. v.13, p. 4279-4295, 2002.

ANEXO 1: Instruções aos autores artigos científicos.

Título: Em português e em inglês. Deve contemplar a essência do artigo e não ultrapassar 150 dígitos.

Autores e Filiação: Os nomes dos autores são colocados abaixo do título, com identificação da instituição a que pertencem. O autor para correspondência e seu e-mail devem ser indicados com asterisco.

Nota:

1. o texto do artigo em Word deve conter o nome dos autores e filiação;
2. o texto do artigo em pdf **não** deve conter o nome dos autores e filiação.

Resumo e Abstract: Deve ser o mesmo apresentado no cadastro contendo até 2000 dígitos incluindo os espaços, em um só parágrafo. Não repetir o título e incluir os principais resultados numéricos, citando-os sem explicá-los, quando for o caso. Cada frase deve conter uma informação. Atenção especial às conclusões.

Palavras-chave e Keywords: No máximo cinco.

Introdução: Explanação concisa, na qual são estabelecidos brevemente o problema, sua pertinência e relevância e os objetivos do trabalho. Deve conter poucas referências, suficientes para balizá-la.

Material e Métodos: Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Não usar subtítulos. Nos trabalhos que envolvam animais e organismos geneticamente modificados deverá constar, obrigatoriamente, o número do protocolo de aprovação do Comitê de Bioética e/ou de Biossegurança, quando for o caso.

Resultados: Apresentar clara e objetivamente os resultados encontrados.

Tabela: Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação dos cabeçalhos e no final da tabela. A legenda recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Tab., mesmo quando se referir a várias tabelas. Pode ser apresentada em espaçamento simples e fonte de tamanho menor que 12 (menor tamanho aceito é 8).

Figura: Qualquer ilustração que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema, etc. A legenda recebe inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Fig., mesmo se referir a mais de uma figura. As fotografias e desenhos com alta qualidade em formato jpg, devem ser também enviadas, em um arquivo zipado, no campo próprio de submissão.

Nota:

Toda tabela e/ou figura que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, informação sobre a fonte (autor, autorização de uso, data) e a correspondente referência deve figurar nas Referências;

As tabelas e figuras devem preferencialmente, ser inseridas no texto no parágrafo seguinte à sua primeira citação.

Discussão: Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. (Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto a juízo do autor, sem prejudicar qualquer das partes).

Conclusões: As conclusões devem apoiar-se nos resultados da pesquisa executada.

Agradecimentos: Não obrigatório. Devem ser concisamente expressados.

Referências: As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética. Evitar referenciar livros e teses. Dar preferência a artigos publicados em revistas nacionais e internacionais, indexadas. São adotadas as normas ABNT/NBR-6023 de 2002, adaptadas conforme exemplos:

strong>Como referenciar:

1. Citações no texto

Citações no texto deverão ser feitas de acordo com ABNT/NBR 10520 de 2002. A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:

- autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88)
- dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974)
- mais de dois autores: (Ferguson et al., 1979) ou Ferguson

et al. (1979)
- mais de um artigo citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson et al. (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson et al., 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para artigos do mesmo ano.

Citação de citação: Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão citado por e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Nas Referências, deve-se incluir apenas a fonte consultada.

Comunicação pessoal: Não fazem parte das Referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

2. Periódicos (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al*.):

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. *Not. Med. Vet.*, n.1, p.13-20, 1984.

3. Publicação avulsa (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al*.):

DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. *Anais*... São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.

SOUZA, C.F.A. *Produtividade, qualidade e rendimentos de*

carcaça e de carne em bovinos de corte. 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

4. Documentos eletrônicos (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores*et al*.):

QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <http://www. org/critca16.htm>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more cambative, organized. Miami Herald, 1994. Disponível em: <http://www.summit.fiu.edu/ MiamiHerld-Summit-RelatedArticles/>. Acessado em: 5 dez. 1994.

Nota:

- Artigos que não estejam rigorosamente dentro das normas acima não serão aceitos para avaliação.
- O Sistema reconhece, automaticamente, como "Desistência do Autor" artigos em diligência ou "Aguardando diligência do autor", que não tenha sido respondido no prazo dado pelo Sistema.

ANEXO 2 : Artigo a ser enviado para publicação

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

Transplante Autólogo e Alogênico de Células-Tronco Mesenquimais marcadas com nanocristal Qtracker® 655 **em Tecido Muscular de Equinos.**

Autologous and allogeneic transplantation in muscle: Tracking equine mesenchymal stem cell labeled with Qtracker®655**.**

N.P.P., Freitas*; R.V., Santos; D.J., Barberini; L., Maia; B.A., Monteiro; M.T., Heckler; L.L., Campos; I., Martin; F.C., Landim-Alvarenga; R.M., Amorim.

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP. Distrito de Rubião Júnior s/n - Caixa Postal 560 - 18618-000, Botucatu, SP. *netfreitas7@yahoo.com.br

RESUMO A utilização de células-tronco adultas autólogas surgiu como uma alternativa terapêutica no tratamento de equinos, com resultados bastante promissores. Adicionalmente, a terapia com células alogênicas viabiliza a manutenção de um banco de células, proporcionando assim seu uso imediato. O objetivo deste trabalho foi avaliar, morfologicamente, a resposta inflamatória e detectar as células-tronco mesenquimais (CTMs) marcadas, autólogas e alogênicas, após o transplante no músculo *gluteus medius* de equinos. Para tal, foram utilizados 15 equinos, divididos igualmente em três grupos de cinco animais, sendo o grupo 1 (controle), grupo 2 (células autólogas), grupo 3 (células alogênicas). Os animais foram submetidos à punção de medula óssea e após o cultivo, essas células foram caracterizadas fenotipicamente por citometria de fluxo e submetidas à diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica, para caracterização da linhagem mesenquimal. Em seguida, as células autólogas e alogênicas foram marcadas com o nanocristal Qtracker 655® e inoculadas no músculo *gluteus medius* dos grupos 2 e 3, respectivamente. No grupo 1 foi inoculado PBS (solução salina tamponada com fosfato). Em cada grupo foi realizada uma biópsia 30 dias antes e outra 24h após o transplante das células e à inoculação do PBS. A análise dos resultados das biópsias demonstrou, por meio de colorações como Hematoxilina-Eosina, Gomori Modificado e NADH-tr, que a morfologia e o metabolismo das fibras foram mantidos tanto no grupo controle como nos grupos tratados. Além disso, foi possível detectar as CTMs marcadas no tecido muscular por meio de imunofluorescência. Portanto, concluiu-se que, morfologicamente, as CTMs

autólogas e alogênicas transplantadas não provocaram reação inflamatória 24h após o transplante.

Palavras-chave: Células-tronco mesenquimais, alogênica, nanocristal, músculo, equino.

ABSTRACT The use of autologous adult stem cells appeared as therapeutic alternative in treatment of horses with promising results. Allogeneic cell therapy enables maintenance a bank of cells, thereby providing immediate use. The aim of this study was to evaluate the inflammatory response and tracker autologous and allogeneic, bone marrow mesenchymal stem cell (BM-MSCs) after *gluteus medius* muscle horse injection. In this research, we used fifteen horses that were divided equally into three groups of five animals each, with Group 1 (control), Group 2 (autologous cells) and Group 3 (allogeneic cells). The animals undergo bone marrow aspiration for culture and isolation of mesenchymal cells. These cells, after culture were phenotypically characterized by flow cytometry and differentiation for characterization of the mesenchymal lineage. Upon such identification, autologous and allogeneic cells were marked with Qtracker 655® and inoculated in the gluteus medius muscle of groups 2 and 3, respectively. In group 1 was inoculated an equal volume of PBS (phosphate buffered saline). In each group a biopsy was done thirty days before and 24h after inoculation of the cells and PBS. Biopsies results showed through stains such as hematoxylin-eosin, modified Gomori and NADH-tr, that the tissue integrity and fiber metabolism was maintained in both, control and treated groups. Additionally, was possible to detect BM-MSCs tracked in muscle tissue through immunofluorescence. Therefore, we conclude that, morphologically, autologous and allogeneic BM-MSCs caused no inflammatory reaction, 24 hours after transplantation.

Key words: Mesenchymal stem cell, allogeneic, nanocrystal, muscle, horse.

1. INTRODUÇÃO

A atividade física intensa e estressante predispõe os equinos às afecções musculoesqueléticas. Terapias alternativas, que auxiliem na recuperação dessas lesões, são muito importantes, pois podem minimizar o tempo de tratamento e os custos, assim como garantir o retorno mais rápido às atividades normais (Douat, 2004).

A década de 90 foi marcada por importantes avanços nas pesquisas com terapia celular objetivando o tratamento de doenças hereditárias, auto-imunes, dentre outras

com poucas perspectivas terapêuticas. Entretanto, até então, a terapia celular esteve restrita à utilização de células hematopoiéticas no tratamento de doenças hematológicas e onco-hematológicas (Herzog *et al*., 2003; Meirelles *et al*., 2006). A partir do início do século XXI, com o advento de novos conhecimentos sobre a plasticidade das células-tronco e com o surgimento de estudos científicos que sugeriram a transdiferenciação direta ou indireta e diferenciação dessas células, estas passaram a ter seu emprego considerado na terapia celular (Herzog *et al*., 2003; Meirelles *et al*., 2006). Atualmente, a possibilidade de tratamento com células-tronco conquistou notoriedade e devido ao seu potencial, tornou-se a principal alternativa da terapia celular (Lai *et al.*, 2007).

O crescimento e a reparação do músculo esquelético são normalmente mediados pelas células-tronco musculares ou células satélites, as quais circundam as fibras musculares (Ferrari *et al*., 1998). Na regeneração muscular, entretanto, o número de precursores miogênicos excede as células satélite residentes, implicando na migração e recrutamento de progenitores indiferenciados de outras fontes. A contribuição das células da medula óssea para a regeneração muscular foi inicialmente documentada por Ferrari *et al*. (1998), onde foi demonstrado que o transplante de medula óssea, em camundongos imunodeficientes, cursa com a migração de células derivadas da medula para as áreas de degeneração muscular induzida e sofrem diferenciação miogênica, além de participarem da regeneração das fibras lesadas.

O número de células satélite no músculo esquelético adulto é muito menor do que o número de células precursoras miogênicas enviadas para o tecido muscular logo após a lesão (Grounds *et al*., 1992). Muitas explicações para esse aparente paradoxo têm sido propostas, como a migração de células satélites de fibras adjacentes ou até mesmo de músculos vizinhos e recrutamento de progenitores indiferenciados de outras fontes (Cossu, 1997).

Embora os mioblastos ou células precursoras musculares (Smythe *et al*., 2001; Partridge, 2002; Price *et al*., 2007) tenham sido usados, nos primeiros estudos, como células doadoras, as CTMs derivadas da medula óssea emergiram como uma alternativa atrativa de tratamento. Isso ocorreu devido à baixa sobrevivência dos mioblastos, a rejeição imune e baixa taxa de migração das células transplantadas. Além disso, os constantes ciclos de degeneração-regeneração levam a uma redução no pool de células-satélites, em diversas miopatias (Heslop *et al*., 2000).

Em estudos com camundongos foi observado que a medula óssea, mesmo quando com número reduzido de fibroblastos e outros componentes celulares, é capaz de dar

origem a fibras musculares com alta eficiência. Em vez de conversão miogênica, esses experimentos sugeriram a existência de progenitores celulares, dotados de potencial miogênico, no interior da medula óssea (Cossu & Mavilio, 2000). Baseado nisso, a seleção de uma população de células-tronco com características de multipotencialidade, como as oriundas da medula óssea, surgiu como uma opção para o tratamento de miopatias primárias (Cossu & Mavilio, 2000).

Recentemente, segundo pesquisas de AYUB-GUERRIERI (2008), utilizando modelos murinos *mdx* (camundongos distróficos), foi constatado que as CTMs, em cultura, possuem a capacidade de fusão e diferenciação espontânea em fibras musculares, independentemente de outros tipos celulares ou de indução *in vitro* à miogênese. Desde então, vários estudos têm avançado no entendimento do fenótipo, fisiologia, potencial de diferenciação e possíveis aplicações clínicas dessas células.

Baseado nas dúvidas sobre a regeneração do músculo esquelético com a utilização de células-tronco, o estudo de marcadores celulares se faz necessário para o rastreamento dessas células no tecido. Li *et al*. (2009) utilizaram um marcador de membrana celular para rastreamento das células-tronco mesenquimais na cavidade vítrea de camundongos, assim como, Guest et al. (2008) utilizaram um plasmídeo verde fluorescente (GFP) como marcador citoplasmático dessas células para rastreamento no tendão de equinos. Adicionalmente, o nanocrsital Qtracker 655® tem sido descrito em vários trabalhos como marcador citoplasmático, com capacidade para transferência por até seis gerações de células, sendo útil em diversos estudos como migração e morfologia (Invitrogen, 2007).

Portanto, as pesquisas com células-tronco e engenharia tecidual mostram perspectivas que provavelmente irão beneficiar a saúde tanto dos equinos como dos humanos (Koch *et al*., 2009). Dessa forma, os achados abrirão caminho para novos estudos, visando estabelecer terapias mais eficazes para o tratamento de animais com lesões musculares.

O objetivo deste trabalho foi comprovar a morfologia fibroblastóide e a aderência das CTMs; caracterizar fenotipicamente as CTMs com os marcadores $CD44^{+}$, $CD90^{+}$ e $CD34^{-}$; avaliar a capacidade de diferenciação *in vitro* das CTMs nas linhagens condrogênica, osteogênica e adipogênica; padronizar a marcação e a detecção das CTMs com nanocristal Qtracker 655® e avaliar a possibilidade de detectar, por meio de ultrassonografia do músculo *gluteus medius*, as CTMs autólogas e alogênicas, marcadas com nanocristal Qtracker 655®.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizados 15 equinos adultos, divididos em três grupos de cinco animais, sendo Grupo 1 (controle), Grupo 2 (CTMs autólogas) e Grupo 3 (CTMs alogênicas).

Os animais dos grupos 2 e 3 foram submetidos à punção de medula óssea na região do esterno no décimo quinto dia do experimento, de forma que cada animal do grupo 2 recebesse célula do próprio doador e os animais do grupo 3 recebessem células de doadores diferentes, escolhidos aleatoriamente dentro do grupo..

A punção aspirativa da medula óssea foi realizada conforme a metodologia descrita por BARREIRA *et al*. (2008) com modificações, sendo os animais mantidos em estação, contidos em bretes e sob o uso de sedativos. A amostra coletada foi enviada ao Laboratório de Reprodução Avançada e Terapia Celular (LANÇA) do Dep. de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da FMVZ/UNESP Botucatu, para isolamento, cultivo, diferenciação, caracterização e marcação das CTMs com nanocristal Qtracker 655®.

A linhagem de CTMs foi confirmada por marcadores de superfície, com leitura em citômetro de fluxo FACS Calibur no Hemocentro da UNESP de Botucatu. Foi utilizado o protocolo padrão sugerido pelos fabricantes de cada um dos anticorpos primários (CD 34, CD 44 e CD 90) e secundários (goat anti-mouse IgG-FITC).

A diferenciação celular foi realizada após as células em cultivo atingirem uma confluência de aproximadamente 80%, sendo realizadas para as linhagens adipogênica, osteogênica e condrogênica, seguindo metodologia do fabricante.

Para a marcação das CTMs foi utilizada uma garrafa de cultivo com aproximadamente 80% de confluência. O procedimento para marcação com o Qtracker® Cell Labeling Kit foi realizado conforme metodologia descrita pelo fabricante (Invitrogen®).

Foi utilizada uma média de 2 x 10^6 células, as quais foram marcadas, suspensas em PBS e inoculadas no músculo *in vivo*, sendo o grupo 1 (n=5) inoculado 100uL de PBS (solução salina tamponada com fosfato); grupo 2 (n=5) e grupo 3 (n=5), foi utilizado 100uL de CTMs autólogas e alogênicas, respectivamente, marcadas com o nanocristal.

O transplante celular foi realizado no trigésimo dia do experimento, no músculo *gluteus medius* direito, com o auxílio do US, para a determinação do local e profundidade do procedimento. A aplicação foi realizada utilizando uma agulha

hipodérmica 40x12mm e uma seringa de 1mL, para que a biópsia fosse possível de ser realizada no mesmo ponto. O local e a profundidade foram marcados por meio da alteração na ecogenicidade, observada no local de aplicação das células, em relação às fibras musculares adjacentes.

Foram realizadas duas biópsias no músculo *gluteus medius* direito desses animais, sendo a primeira no dia zero e a segunda, 24h após o transplante das células, ou seja, no trigésimo primeiro dia do experimento. É importante salientar que a segunda biópsia foi realizada logo ao lado do local onde foi feita a primeira biópsia. Portanto, baseado nas mensurações realizadas ao exame ultrassonográfico, vinte e quatro horas após o transplante, foi realizada uma biópsia muscular possibilitando a colheita do fragmento muscular no local onde as células foram implantadas. As amostras musculares foram congeladas e avaliadas por meio de técnicas histológicas e histoquímicas.

A biópsia foi realizada no músculo *gluteus medius*, utilizando uma agulha tipo Bergström 6,0 (6 mm), conforme PADILHA *et al*., (2008). Para isso, uma linha imaginária foi traçada da tuberosidade coxal até a crista ilíaca e numa distância em torno de 20 cm da primeira foi feita a tricotomia e anestesia local para posterior introdução da agulha. Depois de obtido o fragmento muscular, esse material foi submetido ao corte em criostato (-20º C) e analisado através de colorações histológicas e histoquímicas.

3. RESULTADOS

No grupo 2 (Autólogo), os resultados revelaram uma média de expressão negativa para CD34 (0,51%) e positiva para CD44 (81,68%) e CD90 (87,72%); No grupo 3 (Alogênico), os resultados revelaram uma média de expressão negativa para CD34 (1,82%) e positiva para CD44 (92,10%) e CD90 (81,03%), caracterizando as células cultivadas como CTMs (Tab. 1).

Tabela 1: Caracterização imunofenotípica das CTMs no grupo 2 (autólogo) e grupo 3 (alogênico).

	Animal	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*	*Média*
G2	**CD34 (%)**	0,25	0,07	1,61	0,34	0,31	0,51
	CD44 (%)	85.57	73,64	83,85	96,05	81,68	81,68
	CD90 (%)	95.91	73,74	82,51	96,83	97,81	87,72
G3	**CD34 (%)**	1,95	1,78	2,34	2,05	1,00	1,82
	CD44 (%)	87,85	91,94	89,19	86,83	96,35	92,10
	CD90 (%)	97,52	69,58	94,75	93,96	64,54	81,03

Os resultados observados após a diferenciação celular demonstraram a presença de vacúolos de lipídios intracelular, corados com Oil Red, na diferenciação adipogênica (Fig. 1a); modificação morfológica e calcificação da matriz extracelular, além de aglomerados de células arredondadas, semelhantes a osteoblastos, corados com Alizarin Red, na diferenciação osteogênica (Fig. 1b) e a presença de áreas metacromáticas indicando a presença de matriz extracelular rica em proteoglicano, na diferenciação condrogênica (Fig. 2).

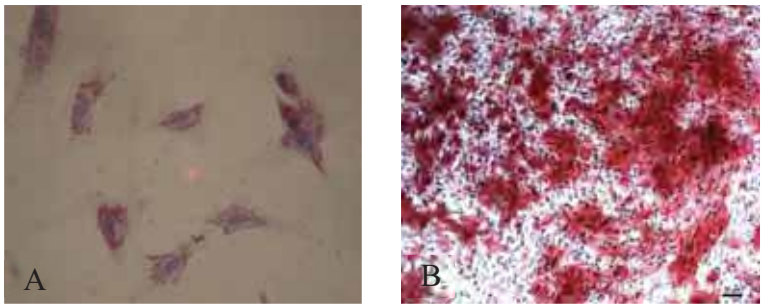


Figura 1 – Diferenciação celular. (A) Diferenciação adipogênica apresentando vacúolos de lipídios intracelular, corados com Oil Red, aumento de 40x; (B) Diferenciação osteogênica apresentando calcificação da matriz extracelular, corados com Alizarin Red, aumento de 20x.

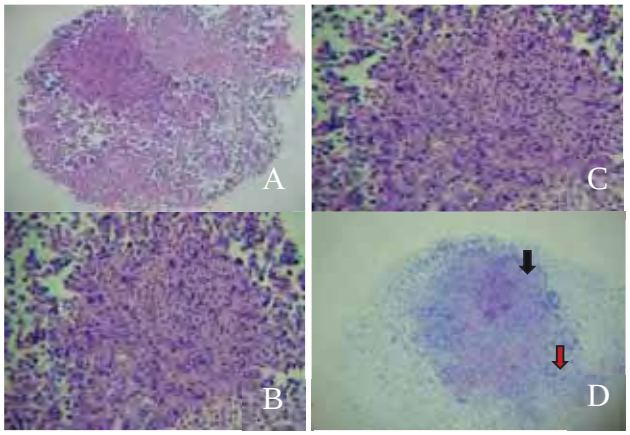


Figura 2 - Diferenciação condrogenica. A e B) Micro pellet corado com Hematoxilina e eosina. Nota-se uma região mais densa no corte histológico compatível com deposição de matriz. C e D) Micro pellet corado com azul de toluidina. Nota-se a presença de áreas metacromaticas em rósea (seta preta) indicando a presença de matriz extracelular rica em proteoglicano. Adicionalmente, nota-se a presença de lacunas (região da seta vermelha) possivelmente contendo condrocitos.

A marcação das CTMs com nanocristal Qtracker 655®, baseado no protocolo do fabricante, demonstrou ser uma técnica eficaz, sendo possível visualizar alta fluorescência citoplasmática (cor vermelha) nas células nanomarcadas (Fig. 3).

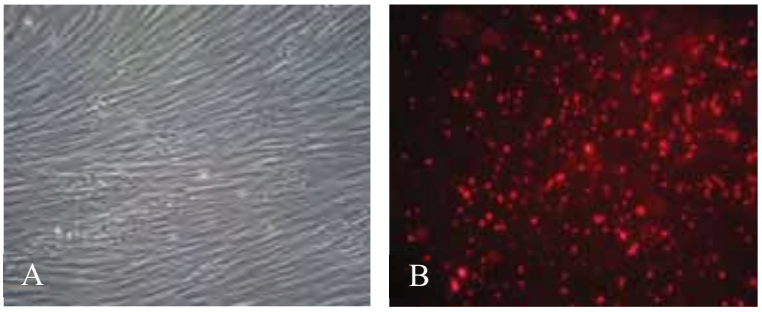


Figura 3 – CTMs em cultivo, aumento de 20x. (A) CTMs com aproximadamente 80% de confluência; (B) CTMs marcadas com o nanocristal Qtracker 655®.

Para a aplicação as CTMs foram marcadas com o nanocristal, suspensas em 100uL de PBS e inoculadas utilizando uma agulha hipodérmica 40x12mm. O momento da aplicação também foi guiado com o auxílio do Ultrassom MyLab 70, sendo possível mensurar a profundidade e o local onde as células foram transplantadas. A imagem ultrassonográfica revelou uma área hiperecóica em relação as fibras musculares adjacentes (Fig. 4), facilitando a localizaçao das células no momento do transplante.

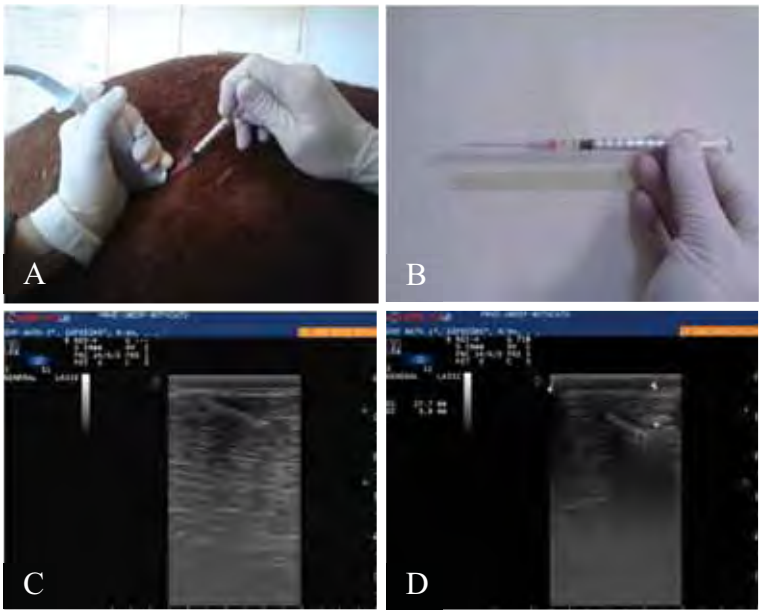


Figura 4 – Aplicação de CTMs marcadas com nanocristal no tecido muscular. (A) Aplicação guiada por US, utilizando agulha 40x12; (B) Suspensão das células em 100 µL; (C) Visualização da agulha penetrando no músculo no US; (D) Aplicação das células, exibindo uma imagem hiperecóica em relação ás fibras adjacentes.

Apesar da leitura do nanocristal ser feita no filtro vermelho (devido ao seu comprimento de onda 655), primeiramente as células foram lidas no filtro azul, pois facilitava a localização das mesmas, sendo possível visualizar as fibras musculares.

A avaliação histológica, por meio de Hematoxilina-eosina (HE), da região transplantada com CTMs mostrou que a integridade do tecido foi mantida e apresentou-se marcada quando visualizada em microscópio de fluorescência (Fig. 5).

Dentre as dez lâminas analisadas para identificação de células-tronco por meio de nanocristais Qtracker®, todas apresentaram fluorescência quando examinadas por meio do microscópio fluorescente. Em contrapartida, o controle não apresentou fluorescência (Fig. 6).

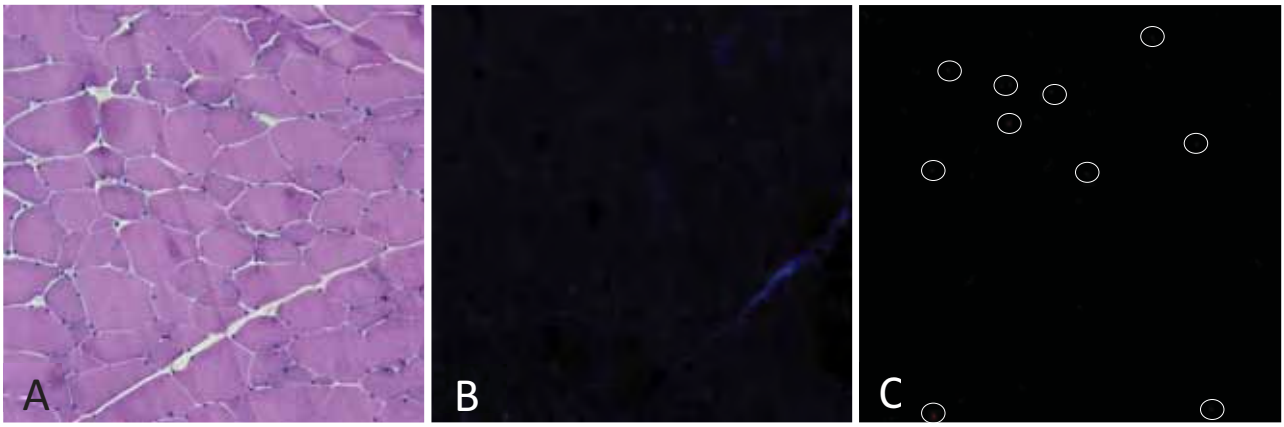


Figura 5 – Grupo tratado. (A) Coloração de HE na região transplantada com CTMs no músculo *gluteus medius.* Aumento de 20x; (B) CTMs marcadas, visualizadas em filtro azul; (C) Visualização de CTMs marcadas com Qtracker® 655 em filtro vermelho (detalhe).

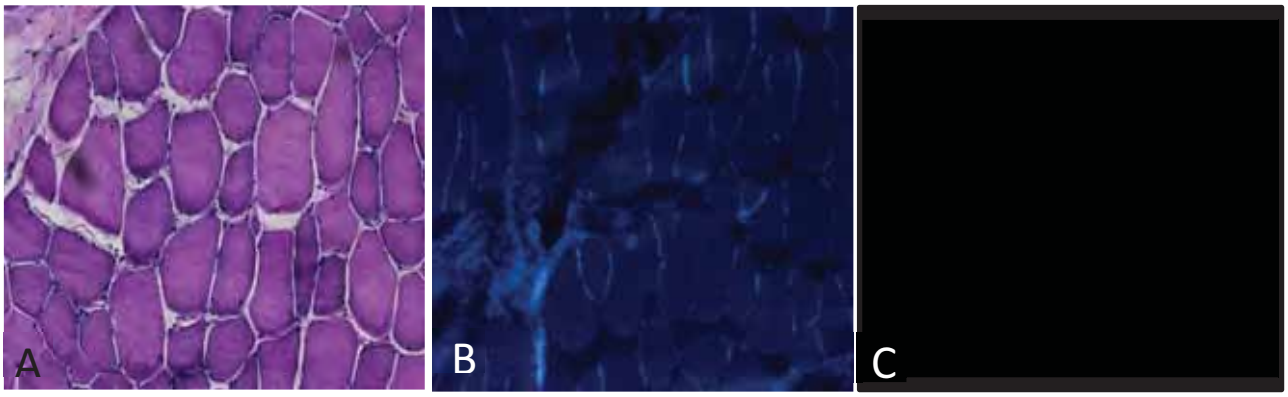


Figura 6 – Grupo controle. (A) Coloração de HE na região transplantada com PBS no músculo *gluteus medius.* Aumento de 20x; (B) Visualização em filtro azul; (C) Visualização em filtro vermelho.

4. DISCUSSÃO

Baseado nos critérios da ISCT e de acordo com as descrições de Koch et al., (2009), a propriedade das CTMs de aderência à placa de cultura não é suficiente para considerar a população celular purificada. Portanto, foi necessária a caracterização celular através de citometria de fluxo e diferenciação celular nas linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica.

As análises no citômetro revelaram uma expressão negativa para CD34; positiva para CD44 e CD90. Os resultados encontrados para $CD34^-$ e $CD44^+$ estão de acordo com a descrição de Copland et al, (2008), que descreveram a reação cruzada entre os anticorpos específicos para a espécie canina com os epítopes de equinos. Já a marcação $CD90^+$, vem de encontro com a descrição de Ocarino et al., (2008) e Kode et al., (2009), os quais relataram que as células hematopoiéticas e fibroblastos, que possam estar presentes no cultivo, não expressam esses marcadores.

Quanto ao critério de diferenciação celular, a presença de vacúolos ricos em lipídeos, corados com Oil-Red, foi utilizada para detectar a indução adipogênica, estando os resultados semelhantes aos encontrados por Maciel (2010). A diferenciação osteogênica foi confirmada pela deposição de cálcio no meio extracelular através da coloração pelo Alizarin Red, observando-se modificação da morfologia celular de aspecto fusiforme (típico de MSC) para cubóide. Esta modificação é considerada um indicativo da ocorrência de diferenciação celular e está de acordo com o encontrado por Jaiswal et al. (1997).

Os nanocristais fluorescentes utilizados no presente trabalho apresentaram excelente marcação celular, podendo ser observados no tecido muscular. O protocolo para marcação das células com Qtracker 655® foi rápido, de fácil execução e

proporcionou ótimos resultados, apresentando alta fluorescência. Esses resultados estão de acordo com a descrição de Oliveira et al., (2009), os quais descreveram que o atrativos dessa tecnologia são a simplicidade da marcação e a fácil e indiscutível detecção do sinal fluorescente emitido.

Donaldson et al., (2004) e Garon et al., (2007) descreveram que a fluorescência do nanocristal poder ser detectada por pelo menos quatro gerações celulares, podendo ainda permanecerem marcadas por até duas semanas em algumas células. Portanto, o período de 24h, definido para biópsia e identificação das células marcadas, no tecido muscular, se mostrou satisfatório e de acordo com a literatura, uma vez que a fluorescência encontrada foi evidente e estava dentro do período descrito para visualização.

A grande dificuldade observada nesse trabalho foi a recuperação dessas células no tecido. Uma das explicações para isso seria o fato de não estarmos realizando a biópsia no local exato do transplante e por isso, passamos a utilizar o US como auxílio. Portanto, analisando as descrições de Ayub-Guerrieri (2008), que relatou a visualização de células-tronco marcadas e inoculadas em músculo de camundongos em um período de até três dias, podemos dizer que a biópsia realizada vinte e quatro horas após o transplante das CTMs marcadas em nosso experimento está dentro de um período de visualização da fluorescência no músculo.

Apesar da alta fluorescência observada, poucas células marcadas foram encontradas no local. A detecção do local do transplante foi guiada por US, descartando a possibilidade de a biópsia ter sido realizada em local diferente de onde as células foram implantadas. Esse fato pode ser explicado baseado nas pesquisas de Oliveira et al., (2009), que realizaram um estudo utilizando CTMs de cordão umbilical humano, marcadas com o nanocristal Qtracker 655® em suínos com infarto do miocárdio induzido. Os animais foram sacrificados sete dias após o transplante e as análises dos cortes histológicos do coração mostraram que um número pequeno de CTMs ficou retido no local. Em média, observaram-se duas células marcadas em cada corte correspondente à região infartada. Adicionalmente, nesse estudo foram aplicadas dez milhões de células ($1x10^7$), quando comparadas à nossa pesquisa, onde foram transplantadas em média aproximadamente dois milhões de células ($2,37x10^6$). Portanto, a visualização de poucas células marcadas em nosso estudo está de acordo com as descrições de Oliveira et al., (2009), ressaltando-se ainda a necessidade de identificação futura dessas células por meio de imunohistoquímica para excluir, por

exemplo, a possibilidade de visualização de macrófagos que fagocitaram células marcadas.

Segundo pesquisas de Ayub-Guerrieri (2008), que utilizaram camundongos como estudo, um dos obstáculos encontrados no caso das terapias celular e gênica para doenças envolvendo células largamente distribuídas pelo corpo, como as células musculares, é o desafio de disseminar as células ou os genes transplantados para os tecidos ou órgãos afetados.

5. CONCLUSÃO

As células coletadas, isoladas e cultivadas preencheram os critérios exigidos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular, sendo portanto classificadas como células-tronco mesenquimais, pois apresentaram aderência ao plástico, morfologia fibroblastóide, expressão por meio de citometria de fluxo de $CD34^-$, $CD44^+$, $CD90^+$, assim como diferenciação nas linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica.

A marcação celular utilizando o nanocristal Qtracker 655® foi eficaz e possibilitou a detecção das CTMs marcadas no músculo *gluteus medius*, por meio de imunofluorescência, 24h após o transplante.

A utilização do US proporcionou detectar as CTMs marcadas com o nanocristal Qtracker 655®, no músculo *gluteus medius*, no momento do transplante quando comparado com o controle.

6. BIBLIOGRAFIA

AYUB-GUERRIERI, D. Estudo do potencial miogênico das células-tronco mesenquimais e embrionárias no modelo murino da distrofia muscular de duchenne. 2008. 114f. .Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Departamento de Genética e Bióloga Evolutiva. Universidade de São Paulo, São Paulo.

BARREIRA, A.P.B.; BACELLAR, D.T.L.; KIFFER, R.G.; ALVES, A.L.G. Punção aspirativa de medula óssea em eqüinos adultos para obtenção de células-tronco. *R. bras. Ci. Vet*., v. 15, n. 1, p. 56-59, jan./abr, 2008.

COPLAND, I.; SHARMA, K.; LEJEUNE, L.; ELIOPOULOS, N.; STEWART, D.; LIU, P.; LACHAPELLE, K.; GALIPEAU, J. CD34 expression on murine marrow-derived mesenchymal stromal cells: impact on neovascularization. *Experimental Hematology*, v. 36, p. 93-103, 2008.

COSSU, G. Unorthodox myogenesis: possible developmental significance and implications for tissue histogenesis and regeneration. *Histol. Histopathol.* 12, 755-760, 1997.

COSSU, G.; MAVILIO, F. Myogenic stem cells for the therapy of primary myopathies: wishful thinking or therapeutic perspective? *The Journal of Clinical Investigation.* v. 105, n. 12, 1669-1674, 2000.

DONALDSON, K.; STONE, V.; TRAN, C.L.; KREYLING, W. & BORM, P.J.A. Nanotoxicology Occupational and Environmental Medicine. *Nanotoxicology Journal of Occupational and Environmental Medicine*, v.61, n.9, p.727-728, 2004.

DUBOWITZ, V. & SEWRY, C.A. Histological and Histochemical stains and reactions. In: *Muscle biopsy-a practical approach*. 3 ed. Inglaterra: Saunders, 2007, cap.2, p. 21-40.

DOUAT, E.S.V. Estudo comparativo do efeito do ultrassomterapêutico de 1MHZ com frequência de repetição de pulso de 100MHZ e 16 HZ no reparo de osteotomia por escareação em tíbia de rato. 2004. 74f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, São Paulo.

FERRARI, G.; CUSSELLA-DE ANGELIS, G.; COLETTA, M.; PAOLUCCI, E.; STORNAIUOLO, A.; COSSU, G. AND MAVILIO, F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279, 1528-1530, 1998.

GARON, E. B. et al. Quantum dot labeling and tracking of human leukemic, bone marrow and cord blood cells. *Leukemia Research*, v. 31, p. 643-651, 2007.

GROUNDS, M.D.; GARRETT, K.L.; LAI, M.C.; WRIGHT, W.E.; BEILHARZ, M.W. *Cell Tissue Res.* 267, 99, 1992.

GUEST, D.J.; SMITH, M.R.W.; ALLEN, W.R. Monitoring the fate of autologous and allogeneic mesenchymal progenitor cells injected into the superficial digital flexor tendon of horses: preliminary study. *Equine Veterinary Journal*. 40(2)178-181, 2008.

HERZOG, E.L.; CHAI, L.; KRAUSE, D.S. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood.* v.102, p.3483-3493, 2003.

HESLOP, L.; MORGAN, J.E.; PARTRIDGE, T.A. Evidence for a myogenic stemcell that is exhausted in dystrophic muscle. *J Cell Sci*. 113 (Pt 12): 299-308, 2000.

INVITROGEN. Cellular analysis. Biology in context. California, 634p, 2007.

JAISWAL, N.; HAYNESWORTH, S.E.; CAPLAN, A.I.; BRUDER, S.P. Osteogenic Differentiation of Purified, Culture-Expanded Human Mesenchymal Stem Cells In Vitro. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 64, p. 295–312, 1997.

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

LAI, Y.; DROBINSKAYA, I.; KOLOSSOV, E.; CHEN, C.; LINN, T. Genetic modification of cells for transplantation. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2007.

LI, N.; LI, X.R.; YUAN, J.Q. Effects of bone-marrow mesenchymal stem cells transplanted into vitreous cavity of rat injured by ischemia/reperfusion. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology*. 247(4):503-514, 2009.

MACIEL, B.B. Isolamento, cultivo e caracterização de células tronco mesenquimais da medula óssea e do tecido adiposo de gato. 2010. Dissertação (Mestrado) – Ciências Veterinárias - Universidade Federal do Paraná.

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

MUKHERJEE, S.; JOGLEKAR, M.V.; HARDIKAR, A.A. Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration. *Cytotherapy*. 11(4):377-91. 2009.

OCARINO, N.M.; BOELONI, J.N.; GOES, A.M.; SILVA, J.F.; MARUBAYASHI U & SERAKIDES, R. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from osteopenic rats subjected to physical activity with and without nitric oxide synthase inhibition. *Nitric Oxide. Biology and Chemistry*, 19:320-325, 2008.

OLIVEIRA, D.M.; ALMEIDA, B.O.; MARTI, L.C.; SIBOV, T.T.; PAVON, L.F.; MALHEIROS, D.M.A.C.; CAMPOS, A.H. A marcação de células-tronco mesenquimais humanas com *quantum dots* possibilita a identificação de células transplantadas enxertadas em corações de porcos após o infarto do miocárdio. *Einstein*. 7(3 Pt 1):284-9, 2009.

PADILHA, F.G.F.; SUMA, R.; AMORIM, R.M. Avaliação prática da biópsia muscular percutânea por agulha em equinos. *A Hora Veterinária*, v. 28, p. 29-32, 2008.

PARTRIDGE, T.A. Myoblast transplantation. *Neuromuscul. Disord.* 12 Suppl. 1, S3-S6, 2002.

PRICE, F.D.; KURODA, K. AND RUDNICKI, M.A. Stem cell based therapies to treat muscular dystrophy. *Biochim. Biophys. Acta* 1772, 272-283, 2007.

SMYTHE, G.M., HODGETTS, S.I.; GROUNDS, M.D. Problems and solutions in myoblast transfer therapy. *J. Cell. Mol. Med.* 5, 33-47, 2001.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão de bolsa de mestrado.