

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**ESTUDO DA CAPACIDADE IMUNOMODULADORA *IN VIVO*
DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS OBTIDAS DA
MATRIZ DO CORDÃO UMBILICAL EQUINO**

MARIANNE CAMARGOS DIAS

BOTUCATU – SP
MAIO, 2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**ESTUDO DA CAPACIDADE IMUNOMODULADORA *IN VIVO*
DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS OBTIDAS DA
MATRIZ DO CORDÃO UMBILICAL EQUINO**

MARIANNE CAMARGOS DIAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda da Cruz Landim

Coorientador: Dr. Leandro Maia

BOTUCATU – SP

MAIO, 2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.

DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB
8/5651

Dias, Marianne Camargos. Estudo da capacidade imunomoduladora in vivo de células-tronco mesenquimais obtidas da matriz do cordão umbilical equino / Marianne Camargos Dias. - Botucatu, 2015

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

Orientador: Fernanda da Cruz Landim
Coorientador: Leandro Maia

Capes: 50504002

1. Células-Tronco. 2. Transplante de Células-Tronco. 3. Cordão umbilical. 4. Equino.

Palavras-chave: Células tronco mesenquimais; Imunomodulação; Matriz do cordão umbilical; Transplante.

Nome do autor: Marianne Camargos Dias

Título: ESTUDO DA CAPACIDADE IMUNOMODULADORA *IN VIVO* DE
CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS OBTIDAS DA MATRIZ DO CORDÃO
UMBILICAL EQUINO

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Fernanda da Cruz Landim

Presidente e Orientadora

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu

Dra. Bruna de Vita

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu

Profa. Dra. Betânia Souza Monteiro

Membro

Departamento de Veterinária

Universidade Vila Velha

Data da Defesa: 21 de maio de 2015.

DEDICATÓRIA

“À Deus, por me acompanhar e abençoar com sua luz.

À minha família, por ser minha motivação.

À minha orientadora Fernanda e coorientador Leandro por me
conduzirem com maestria.”

AGRADECIMENTOS

A Deus por se fazer presente e trazer calma e proteção. Sempre caminhando ao meu lado e iluminando os caminhos que devo seguir.

À minha família (mãe e irmãs), pela base e educação, pela mão estendida e acolhimento a cada fragilidade; pela presença nos bons momentos e nos momentos difíceis. Acima de tudo por ser a motivação da minha vida.

À minha mãe, por ser tão guerreira, nos dedicar a sua vida com tanto suor e sacrifício. Por ser responsável pelo que sou, por tudo o que há de bom em mim. E por me apoiar e incentivar sempre.

À minha irmã Julianna, pelo cuidado, preocupação e amizade. Por ser meu espelho, a pessoa que tenho tanto orgulho em chamar de irmã.

À minha irmã Marielle, minha metade, por se fazer presente a cada minuto pela sintonia, por se preocupar tanto e fazer o que for preciso de forma incondicional.

Ao meu sobrinho Lucas, por tanto amor demonstrado em cada sorriso longo e verdadeiro. Por ser carinhoso e companheiro. Por ser motivação em minha vida.

Ao meu pai, pelo carinho fraterno e sabedoria.

Às minhas queridas e amadas avó e tias, pelo apoio e carinho.

Ao meu amado, Leo, pelo companheirismo e respeito. Por caminhar ao meu lado e muitas vezes me acalmar e seguir comigo sempre. Por me trazer tanta paz, proteção e amor.

Aos meus cunhados Marcio e Henrique, pelo carinho por nossa família e o cuidado com as minhas irmãs.

À minha sogra Maria e cunhados Thiago e Alexandre, pelo acolhimento nessa família que tenho tanto carinho.

À minha orientadora Fernanda, pelos ensinamentos e exemplo profissional. Por sempre estar receptiva e disposta, por ser tão acolhedora fazendo-nos sentir como filhos.

Ao meu coorientador Leandro, por me orientar a cada passo dessa jornada e por participar ao meu lado de todas as etapas.

Aos professores do Departamento de Reprodução Animal: Fernanda, João, Nereu, Eunice, Sony, Denise e Papa pelos ensinamentos e agradável convivência desde a Residência.

Aos professores do Departamento de Clínica Veterinária, Ana Liz e Rogério, pela contribuição e ensinamentos durante o experimento.

Aos funcionários, Zé Luis, Valter, Edivaldo e Dona Raquel pelo bom convívio, prestatividade e amizade.

À Universidade Estadual Julio de Mesquita Filho, pelo acolhimento, estrutura e equipe de profissionais, proporcionando uma boa base para a execução da pesquisa e estudo.

Aos meus queridos amigos, minha “família” de Botucatu: Leandro, Carol e Carolzinha. Pela união e momentos divertidos no laboratório. Por tornar essa jornada mais leve e feliz. Por ser minha família do coração, me apoiando em todos os momentos com tanta amizade.

Aos meus amigos Talita, Juarez e Helô, pelos momentos juntos e por estarem dispostos sempre que precisei de alguém. À minha amiga Thati (minha gêmea de coração), que mesmo à distância, sempre trouxe alegria ao meu dia a dia com seu carinho e amizade verdadeira.

Aos amigos da pós-graduação, em especial à Celina e à Dani pela amizade dentro e fora do laboratório, à Bruna, Isa, Midyan, Bianca, Loreta e Amanda.

À FAPESP pela concessão da bolsa de mestrado (Proc.2013/01383-0).

“Demore na dúvida...e descubra a sabedoria que
insiste em se esconder na ausência de palavras.”

(Padre Fabio de Melo)

“Teu amor me faz vencer
Teu amor me faz dizer:
Sou filho do Céu!”

(Padre Fabio de Melo)

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Graduação e critérios utilizados para a avaliação semi-quantitativa dos parâmetros na histologia do músculo glúteo médio superficial de equinos, pelo método de Hematoxilina e Eosina.....	28
TABELA 2 - Valores do hemograma (eritrócitos, hemoglobina e hematócrito) e proteína plasmática total obtidos dos animais estudados em todos os momentos.....	31
TABELA 3 - Valores da contagem de leucócitos, fibrinogênio e plaquetas obtidos dos animais estudados em todos os momentos.....	31
TABELA 4 - Avaliação do processo inflamatório e os valores em mediana da intensidade dos achados histológicos no músculo glúteo médio superficial de equinos (infiltrado neutrofílico e infiltrado inflamatório), pelo método Hematoxilina e Eosina.....	34
TABELA 5 - Avaliação histológica representando os valores do parâmetro degeneração/necrose de miócitos em grau de intensidade na forma de mediana e o parâmetro fibrose pela presença ou ausência (0), por meio do método Hematoxilina e Eosina.....	35

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** - Esquema do transplante de CTMs-CU e biópsias musculares. (A) Localização dos transplante de CTMs e HBBS realizadas no D0. (B) Observam-se as biópsias realizadas nos pontos dos transplantes, sendo do lado esquerdo 2 dias após os transplantes e do lado direito 7 dias após os transplantes.....27
- FIGURA 2** - Sonogramas das éguas nos momentos D0, D2 e D7. (A) Imagem gerada no D0 referente à região a receber transplante de CTMs-CU. Observa-se a disposição das fibras musculares de um tecido íntegro. (B) Imagem da agulha (seta amarela) sendo guiada por ultrassom a uma profundidade de aproximadamente 2cm. (C) Imagem gerada no D2, musculatura com aspecto heterogêneo (elipse vermelha) e presença de regiões hipo a anecogênicas, com contornos pouco definidos e irregulares (seta amarela). (D) Imagem gerada no D7, musculatura com ecotextura heterogênea com relação ao D0, presença de discretas regiões hipoecogênicas em permeio às fibras musculares (elipse vermelha). Observa-se a reorganização das fibras musculares, indicando processo inflamatório em resolução.....33
- FIGURA 3** - Fotomicrografias de biópsias do músculo glúteo médio superficial de equinos sem alterações histológicas nos grupos tratado e controle. As fibras musculares histologicamente preservadas exibem-se justapostas, cada uma envolvida por um endomísio (seta), organizadas em fascículos delimitados pelo perimísio (cabeça de seta). Sustentados nesta membrana, observam-se capilares sanguíneos (círculo). Não são observadas células inflamatórias ou edema por entre as fibras nos diferentes momentos, tanto no grupo tratado quanto no grupo controle. A. Momento D-30 (HE, 400x). B. Momento D-30 (HE, 200x). C. Momento D2, tratado, (HE, 400x). D. Momento D2 controle (HE, 400x). E. Momento D7, tratado (HE, 400x). F. Momento D7, controle (HE, 400x). G e H. Mesmos cortes histológicos que E e F em menor aumento (HE, 200x).....36

FIGURA 4 - Fotomicrografias de biópsias do músculo glúteo médio superficial de equinos com processo inflamatório discreto nos grupos tratado e controle. A. Momento D2, tratado. Foco de infiltrado inflamatório composto majoritariamente por macrófagos, além de discretos neutrófilos. Nota-se degeneração (cabeça de seta) e necrose (seta) de fibras musculares, indicada pelo aumento da eosinofilia sarcoplasmática e picnose nuclear. Ainda, o edema é representado pelo espaçamento entre as fibras musculares lesionadas. HE, 400x. B. Momento D2, controle. Infiltrado inflamatório interfascicular composto por macrófagos e raros linfócitos. À direita, fibra muscular degenerada (cabeça de seta). HE, 400x. C. Momento D7, tratado. Foco inflamatório envolvendo o estroma colagenoso (perimísio). HE, 200x. D. Momento D7, controle. Fotomicrografia evidenciando infiltrado inflamatório perivascular discreto, composto por macrófagos e discretos linfócitos, associado à edema interfascicular. Os orifícios observados nas fibras musculares correspondem a formação de cristais de gelo (artefato de congelamento). HE, 200x.....37

FIGURA 5 - Amostra de cordão umbilical equino coletada para isolamento de CTMs. Nota-se a presença dos vasos sanguíneos e tecido intervascular (setas).....59

FIGURA 6 - Momento do transplante de CTMs-CU no músculo glúteo médio superficial equino. (A) Agulha sendo guiada por aparelho de ultrassonografia. (B) Aplicação da suspensão de CTMs-CU no local guiado pelo aparelho de ultrassom.....59

FIGURA 7 - Etapas da realização da biópsia muscular. (A) Introdução da agulha de biópsia na incisão feita. (B) Fragmento muscular colhido, no lúmen da agulha. (C) Fragmento do músculo sendo envolvido por talco neutro. (D) Criopreservação do fragmento em nitrogênio líquido.....60

FIGURA 8 - Histogramas representando o perfil imunofenotípico das CTMs-CU a fresco em cultivo primário. Foram avaliados, por citometria de

fluxo, os marcadores de superfície celular CD 34, MHC-II, CD 90 e CD 44 conjugados com FITC.....61

FIGURA 9 - Histogramas representando o perfil imunofenotípico das CTMs-CU em terceira passagem, após descongelação. Foram avaliados, por citometria de fluxo, os marcadores de superfície celular CD 34, MHC-II, CD 90 e CD 44 conjugados com FITC.....61

FIGURA 10 - Diferenciação das CTMs-CU em linhagens mesodermas. (A) Diferenciação osteogênica. Note a deposição de grande quantidade de matriz rica em cálcio marcada com Alizarin Red. (B) Diferenciação adipogênica. Note a presença de gotículas (seta amarela) intracelulares de gordura coradas com Oil Red.....62

FIGURA 11 - Ensaio de UFC-F. Colônia de CTMs-CU em placa de seis wells, coradas com Cristal Violeta.....62

SUMÁRIO

	Páginas
CAPÍTULO 1	1
INTRODUÇÃO	2
OBJETIVOS	3
HIPÓTESES	4
REVISÃO DE LITERATURA	4
1.1 Biologia das células-tronco	4
1.2 Células-tronco mesenquimais derivadas de cordão umbilical	7
1.2.1 Caracterização	9
1.3 Imunomodulação	11
1.4 Aplicação terapêutica	14
CAPÍTULO 2 Artigo científico submetido ao periódico Cytotherapy:	
Transplante alogênico intramuscular de células-tronco mesenquimais derivadas de cordão umbilical equino	17
Resumo	19
2.1 Introdução	20
2.2 Materiais e métodos	22
2.2.1 Seleção e manejo dos animais	22
2.2.2 Colheita do cordão umbilical para isolamento e cultivo das CTMs	23
2.2.3 Isolamento e cultivo das CTMs	23
2.2.4 Ensaio de diferenciação celular em linhagens mesodermas	24
2.2.5 Análise por citometria de fluxo	24
2.2.6 Ensaio de unidades formadoras de colônias fibroblásticas (UFC-F)	24
2.2.7 Criopreservação das amostras	25
2.2.8 Exames hematológicos e ultrassonográficos	25
2.2.9 Transplante celular	26
2.2.10 Biópsias musculares	28
2.2.11 Análise estatística	29
2.3 Resultados	29

2.3.1 Colheita, isolamento e cultivo das CTMs	29
2.3.2 Potencial de diferenciação em linhagens mesodermis.....	29
2.3.3 Caracterização imunofenotípica	30
2.3.4 Unidades formadoras de colônias fibroblásticas	30
2.3.5 Criopreservação	30
2.3.6 Transplante das CTMs	30
2.3.7 Avaliação hematológica	30
2.3.8 Avaliação ultrassonográfica	32
2.3.9 Biópsias musculares	33
2.3.10 Demais resultados.....	34
2.4 Discussão	37
2.5 Conclusão	42
2.6 Referências	43
CONCLUSÕES GERAIS.....	48
REFERÊNCIAS	49
ANEXO 1 (figuras)	59
ANEXO 2 (normas da revista científica)	63

RESUMO

DIAS, M.C. Estudo da capacidade imunomoduladora *in vivo* de células-tronco mesenquimais obtidas das matriz do cordão umbilical equino. 2015. 66p. Dissertação (Mestrado) – Curso de PG em Biotecnologia Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2015.

Células tronco mesenquimais (CTMs) possuem potencial terapêutico regulando a inflamação, prevenindo a formação de feridas e regenerando tecidos. Por sua propriedade imunomoduladora, tem sido estudadas no transplante alogênico. As CTMs derivadas de anexos fetais são destaque por serem de fácil obtenção, de tecidos geralmente descartados e com grande possibilidade de formação de bancos. O presente trabalho objetiva avaliara resposta inflamatória *in vivo* do músculo glúteo médio à inoculação alogênica de CTMs derivadas de cordão umbilical equino. As CTMs foram cultivadas e caracterizadas por meio de imunofenotipagem e diferenciação em linhagens mesodermas e então, criopreservadas. Após descongelação e expansão as CTMs foram transplantadas no dia 0 no músculo glúteo médio direito e esquerdo, em duas regiões diferentes, em seis éguas híbridas. Como controle foram realizadas injeções de Solução Balanceada de Hank's caudalmente às regiões onde foram transplantadas as CTMs. As biópsias musculares foram realizadas 30 dias antes do transplante de CTMs, bem como dois dias depois do transplante e 7 dias após o transplante. Todos os transplantes e biópsias foram precedidos pelo exame ultrassonográfico além de coleta de sangue para os parâmetros hematológicos. As CTMs foram bem caracterizadas, apresentaram alta clonicidade e não provocaram alteração nos parâmetros hematológicos. O exame ultrassonográfico revelou aspecto sugestivo de reação inflamatória 48 horas após os transplantes em ambos os grupos, controle e tratado. Na avaliação histológica não foram encontradas diferenças entre os grupos tratado e controle em nenhum dos momentos estudados. Uma discreta diferença no parâmetro de infiltrado neutrofílico foi encontrada entre D30 e D2 apenas no grupo tratado ($P < 0,05$), entretanto não houveram diferenças em D7. Desta forma, podemos concluir a terapia celular não incitou resposta inflamatória sistêmica e local aos receptores, demonstrando pela primeira vez, que o uso alogênico de CTMs do cordão umbilical equino pode ser realizado com segurança em lesões no músculo glúteo médio de equinos.

Palavras-chave: células tronco mesenquimais, imunomodulação, matriz do cordão umbilical, transplante.

ABSTRACT

DIAS, M.C. Study of the immunomodulatory *in vivo* capacity of equine umbilical cord mesenchymal stem cells 2015. 66p. Dissertation (Magister scientiae) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, campus Botucatu, São Paulo State University.

Mesenchymal stem cells (MSCs) have therapeutic potential regulating inflammation, preventing the formation of wounds and regenerating tissues. MSCs derived from fetal membranes are highlighted because they are easy to obtain, from tissues usually discarded and with great possibility of bank formation. This study evaluated the *in vivo* inflammatory response of the gluteus medius muscle to the inoculation of allogeneic MSCs derived from equine umbilical cord. MSCs were cultured and characterized by immunophenotyping and differentiation into mesodermal lineages, and next cryopreserved. After thawing and expansion of MSCs transplantation was performed on day 0 in the right and left middle gluteal muscle at two different regions in six healthy mares. Likewise, for the control group, an injection of Hank's-Balanced Solution was performed caudally to the regions where MSCs were transplanted. Muscle biopsies were performed 30 days before the transplantation of MSCs, 2 days and 7 days after transplantation. All biopsies and transplants were preceded by ultrasonographic examination, and blood samples retrieval for hematological parameters. The biopsies were analyzed by histological techniques. The MSCs were well characterized, and possessed high clonogenicity causing no changes in the hematological parameters evaluated. Ultrasound examination was suggestive of inflammation 48 hours after transplantation in both groups, control (C) and treated (T). Histological evaluation found no differences between C and T groups in any of the time points studied. A discrete temporal inflammation was found between D30 and D2 ($P < 0.05$) only in the T group, however no differences were found in D7. Thus, we conclude that the cellular therapy did not incite systemic inflammatory response to recipients, demonstrating, for the first time, that the allogeneic use of MSCs from equine umbilical cord are safe for use in horse gluteus medius injury.

Keywords: mesenchymal stem cells, immunomodulation, umbilical cord matrix, transplant.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Os estudos relacionados às células-tronco são de grande importância e estão em constante ascensão devido a sua capacidade de regenerar tecidos e órgãos lesados e a sua aplicabilidade no campo terapêutico. Esse assunto é destaque tanto na medicina humana quanto na veterinária, tendo sido nesta última, desenvolvidas terapias celulares principalmente com células-tronco mesenquimais (CTMs) (RIBITSCH et al., 2010). As CTMs possuem potencial terapêutico devido à sua capacidade de diferenciação em multilinhagens, bem como atuação no reparo tecidual secretando fatores de crescimento, modulando a inflamação e regenerando tecidos (VOSWINKEL et al., 2013).

A terapia com células-tronco é uma alternativa assistencial na reparação das lesões musculoesqueléticas frequentemente apresentadas por equinos. Isso é de grande significância por reduzir custos e tempo de tratamento (DOUAT, 2004). A alta incidência de recidivas deve-se ao tipo e intensidade de exercícios, muitas vezes incorretos, a que esses animais são submetidos; uma vez que apresentam boa capacidade e resistência para realizar atividades físicas (RESENDE, 2005).

Apesar das CTMs serem encontradas em grande quantidade na medula óssea (MO), outras fontes vem sendo estudadas, pois o número de células-tronco presentes na MO, assim como sua capacidade de diferenciação, diminui com a idade. Desta forma, os anexos fetais são fontes ricas de CTMs e com grande potencial terapêutico, pois se diferenciam e se expandem com maior competência que as células colhidas de um organismo adulto (CARRADE et al., 2011b).

Uma característica fundamental das CTMs, que as tornam foco de atenção terapêutica é sua capacidade imunomoduladora (WAN et al., 2008). Apesar disso, os mecanismos envolvidos nessa propriedade não estão totalmente elucidados. Diante de sua interação com o tecido ao serem transplantadas, as CTMs desencadeiam a liberação de citocinas anti-inflamatórias e fatores de crescimento, os quais promovem a modulação da reação inflamatória e a reparação tecidual (MONTEIRO et al., 2010). Adicionalmente, as CTMs expressam moléculas do complexo de histocompatibilidade maior (MHC) classe I, mas não da classe II (TYNDAL et al.,

2007). Isso contribui para a não rejeição das células indiferenciadas (WAN et al., 2008).

CTMs derivadas de tecidos adultos geralmente fornecem células para terapias autólogas, tornando o tratamento oneroso e sem garantia de seu efeito já que não é possível a padronização da amostra e a realização do tratamento durante a fase aguda da doença. As CTMs derivadas de anexos fetais superam essa desvantagem. Por ser uma fonte não invasiva de CTMs, os anexos fetais permitem a criação de bancos, permitindo sua padronização e disponibilizando CTMs de forma imediata (HASS et al., 2011; DYSON, 2013).

Pesquisas sugerem que CTMs equinas derivadas de anexos fetais, incluindo tecido do cordão umbilical, não causam rejeição pelo hospedeiro quando administradas por via intra-articular e intradérmica (CARRADE et al., 2011a; CARRADE et al., 2011b). Pode-se, ainda, inferir que as CTMs derivadas de anexos fetais tem um maior poder imunomodulador quando comparadas às derivadas de fontes equinas adultas (SCHNABEL et al., 2013).

Freitas (2012) avaliou morfológicamente a resposta inflamatória de CTMs marcadas após transplante autólogo e alogênico em tecido muscular de equinos derivadas de medula óssea. Para a análise da imunogenicidade das CTMs foram realizadas biópsias musculares após 24 horas no local do transplante e as alterações morfológicas encontradas não sugeriram reação inflamatória.

Apesar de promissor, o tratamento alternativo ou complementar das afecções em equinos utilizando células-tronco ainda necessita de pesquisas que estudem densamente as propriedades e características dessas células (PIGOTT et al., 2013).

OBJETIVOS

Objetivos Gerais

Avaliar a resposta sistêmica e tecidual do músculo glúteo médio superficial *in vivo*, sem lesão prévia ao transplante alogênico de células-tronco mesenquimais provenientes da matriz intervascular do cordão umbilical de equinos.

Objetivos Específicos

Avaliar a expressão dos marcadores de superfície celular (CD44, CD90, CD34, MHC-II, potencial de diferenciação e clonicidade das CTMs-CU.

Avaliar a imunogenicidade das CTMs-CU mediante a análise da expressão do MHC-II.

Detectar, através de exame hematológico, ultrassonográfico e biópsia muscular seriada, a resposta sistêmica e tecidual do músculo glúteo médio superficial sem lesão prévia ao transplante alogênico de células-tronco mesenquimais provenientes da matriz intervascular do cordão umbilical de equinos.

HIPÓTESES

As CTMs-CU apresentam uma boa expansão in vitro, potencial de diferenciação, clonicidade e expressão de marcadores imunofenotípicos característicos de outros tipos de CTMs (como as do tecido adiposo e medula óssea).

As CTMs-CU produzem citocinas pró e anti-inflamatórias durante o cultivo primário e subcultivos in vitro.

As CTMs-CU transplantadas para o músculo glúteo médio de equinos não irão induzir a resposta sistêmica e tecidual de modo a causar sua inviabilidade para uso terapêutico.

REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Biologia das células-tronco

As células-tronco podem ser definidas por duas propriedades fundamentais: a capacidade de autorrenovação, permitindo que elas se multipliquem por um longo período em células idênticas às originais e a de diferenciação em outras linhagens celulares, produzindo células específicas de um determinado tecido (BECKER et al., 1963).

Essas células classificam-se quanto ao seu potencial de diferenciação, sendo divididas em totipotentes, pluripotentes, multipotentes ou unipotentes; e considerando sua origem, em células-tronco embrionárias (CTEs) e não embrionárias ou adultas (CTAs) (BJORNSEN et al., 1999; CLARKE et al., 2000). As CTEs derivadas dos blastômeros de embriões de até oito células são consideradas totipotentes por serem capazes de se diferenciar nas três camadas clássicas do embrião (ectoderme, endoderme e mesoderme) e também em células do folheto extraembrionário formadores da placenta. Quando originadas da massa celular interna do embrião (blastocisto) são consideradas pluripotentes, sendo também capazes de se diferenciar nas camadas citadas, com exceção dos anexos fetais (ROSLER et al., 2004). Por sua capacidade de diferenciação em todos os tipos celulares de um organismo, as mesmas podem seguir um programa desorganizado de diferenciação e originar tumores (teratomas). Ainda há muito debate ético sobre a derivação de linhagens de CTEs na medicina humana (HELMY et al., 2010). No Brasil, a lei de Biossegurança (Lei 11.105) regulamenta o uso do embrião humano (VARANDA, 2012).

As CTAs apresentam um potencial de diferenciação limitado se comparadas às CTEs, quando multipotentes podem formar diversos tipos celulares e suas fontes são inúmeras, incluindo líquido amniótico, cordão umbilical, tecido adiposo, sistema nervoso central e medula óssea. Já quando unipotentes geram apenas um tipo celular, sendo responsáveis pela regeneração de tecidos particulares como a pele ou pela formação dos gametas (BAJADA et al., 2008).

Ainda sobre as CTAs, é seguro afirmar sobre a existência de uma grande variedade de tipos. Dentre as quais, existem as células-tronco hematopoiéticas (CTHs), conhecidas há mais tempo e formadoras de todos os tipos de células sanguíneas; e as CTMs, caracterizadas por elevada plasticidade, o que lhes permite se diferenciar em diversos tipos celulares como osteoblastos, adipócitos, condrócitos e outros. Ademais, podemos citar como CTAs as de origem epiteliais, musculares e neuronais (NARDI, 2007).

A medula óssea é a maior fonte de CTHs e uma importante fonte de CTMs, contribuindo para a regeneração de tecidos como osso, cartilagem,

músculo, ligamento, tendão e tecido adiposo (ARAÚJO, 2005). No entanto, a localização exata das células-tronco *in situ* ainda não está bem definida. Estudos com CTMs revelaram que essas células residem próximas a vasos sanguíneos (CRISAN et al., 2008; CORSELLI et al., 2010). CTMs estão envolvidas em diversos processos fisiológicos e patológicos no organismo, incluindo a manutenção da homeostase, envelhecimento, lesão tecidual e doenças inflamatórias (CHIDGEY et al., 2008; UCCELLI et al., 2008; SHI et al., 2010).

A injúria tecidual está sempre acompanhada da ativação de células do sistema imune, como macrófagos, neutrófilos, linfócitos T (EMING et al., 2007), assim como os mediadores inflamatórios fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina 1 (IL-1), quimiocinas e outros (LUSTER et al., 2005). Apesar do mecanismo não estar elucidado, células endoteliais e fibroblastos, associados a produção dessas moléculas, promovem mudanças no microambiente que provocam a mobilização e diferenciação de CTMs locais ou recrutadas da medula óssea. Muitos fatores incluindo citocinas como TNF- α , IL-1, interferon gama (IFN- γ), toxinas de agentes infecciosos e hipóxia estimulam a produção de inúmeros fatores de crescimento pelas CTMs, com os quais promovem o desenvolvimento de fibroblastos, células endoteliais e células progenitoras, resultando em regeneração e reparação tecidual (HUNG et al., 2013).

Dentre os fatores parácrinos produzidos pelas CTMs, destacam-se aqueles responsáveis pela manutenção da integridade endotelial e promotores da angiogênese, como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e o fator de transformação de crescimento beta (TGF- β), devido à habilidade deles de regular a proliferação de células endoteliais e produção de matriz extracelular, reduzir permeabilidade endotelial e prevenir interações entre leucócitos e células endoteliais (LEE et al., 2011; GIACCA & ZACCHIGNA, 2012).

A recuperação funcional do tecido danificado provavelmente depende da diferenciação de células progenitoras ou células-tronco do próprio tecido ou organismo. Apesar de células-tronco transplantadas poderem se diferenciar em células do tecido, elas, especialmente, produzem fatores de crescimento e muitas quimiocinas que estimulam a reparação tecidual (MARRIOTT et al., 2008; SHI et al., 2012).

Como consequência lógica, acreditava-se que as CTMs ao serem expandidas em cultura e administradas no organismo, iriam se diferenciar em células funcionais. Alguns dos primeiros testes com CTMs foram baseados nessa ideia (HORWITZ et al., 1999). Descobriu-se, porém, que as CTMs expandidas em cultura pouco exercem essa função, propondo que a base de seu efeito terapêutico é a secreção de fatores solúveis, quimiocinas e citocinas imunomoduladoras pelas CTMs (OTSURU et al., 2012). Entretanto, o acúmulo de CTMs nos pulmões após infusão intravenosa, o curto tempo de sobrevivência e a distribuição limitadas a outros locais sugerem que as CTMs passam rapidamente o seu efeito a células residentes que poderão posteriormente mediar o efeito imunomodulador e regenerativo induzido pelas CTMs administradas (EGGENHOFER et al., 2014).

1.2 Células-tronco mesenquimais derivadas de cordão umbilical (CTMs-CU)

O menor questionamento ético-religioso no uso de CTMs em detrimento às CTEs é uma maior limitação em seu potencial de diferenciação, evitando a formação de tumores em sua aplicação (HELMY et al., 2010), tem incentivado a pesquisa, de base e clínica, com células-tronco mesenquimais. As fontes de obtenção de CTMs mais presentes na pesquisa científica e prática clínica são a medula óssea e o tecido adiposo. Porém, fontes alternativas estão sendo cada vez mais estudadas para transpor limitações relacionadas à facilidade de isolamento, características de expansão e complicações locais em doadores (EGGENHOFER et al., 2014).

As CTMs obtidas da medula óssea são geralmente autólogas e para isso o animal é submetido à aspiração de medula óssea, um procedimento invasivo e com riscos potencialmente graves como o de pneumopericárdio além de ser doloroso e incômodo ao animal (DURANDO et al., 2010). Ademais, CTMs derivadas de medula óssea demoram cerca de quatro semanas para serem expandidas, o que impossibilita tratamento de enfermidades agudas no pico inflamatório inicial (PATERSON et al., 2014).

O uso do tecido adiposo para o isolamento de CTMs tem tido apoio por serem obtidas em grande quantidade e por meio de procedimento menos

invasivo e doloroso, além de ter menor taxa de morbidade quando comparada à aspiração de medula óssea (KISIDAY et al., 2008; PASCUCCI et al., 2010).

CTMs obtidas de outros tecidos estão sendo estudadas, com destaque, em aplicações clínicas de modo a comparar as CTMs isoladas de diferentes fontes (PENNY et al., 2012).

Destacam-se, assim, as CTMs derivadas de anexos fetais (líquido amniótico, membrana amniótica, cordão umbilical e placenta) por serem de obtenção fácil e não invasiva, de tecidos geralmente descartados e com grande possibilidade de armazenamento para a criação de bancos. As CTMs originadas da matriz extravascular do CU, mesmo sendo consideradas CTAs, mantêm características dos tecidos embrionários que os deram origem e de CTEs, como a expressão do marcador Oct-4, um importante fator de transcrição envolvido na manutenção da pluripotencialidade das CTEs, além da capacidade de diferenciação em variados tecidos e grande proliferação, não demonstrando imunogenicidade e tumorigenicidade (CREMONESI et al., 2011).

Foi demonstrado em estudo a diferenciação de CTMs derivadas da matriz extravascular de CU em células do tipo neuronais (HOYNOWSKI et al., 2007) e a diferenciação em hepatócitos de CTMs derivadas do sangue do CU (REED & JOHNSON, 2008). Sendo assim, esse potencial de diferenciação seria maior que as células classificadas como multipotentes, mas não tão grande como o de células pluripotentes (CREMONESI et al., 2011; HOYNOWSKI et al., 2007).

São inúmeros os estudos relatados com CTMs coletadas do sangue de cordão umbilical, assim como da matriz extravascular (CREMONESI et al., 2011; DE VITA et al., 2012; IACONO et al., 2012; KANG et al., 2013; BARBERINI et al., 2014; LOON et al., 2014). O cordão umbilical é composto pela gelatina de *Wharton* e três importantes vasos, sendo recoberto pelo epitélio amniótico. A gelatina de *Wharton* é uma matriz gelatinosa e elástica de mucopolissacarídeos (ácido hialurônico e sulfato de condroitina) que protege a artéria e as duas veias (FORRAZ & MCGUCKIN, 2010).

1.2.1 Caracterização

Existem critérios básicos para a definição de uma célula como célula-tronco mesenquimal. Na medicina humana, a ISCT (*International Society for Cellular Therapy*) definiu as CTMs como células plástico-aderentes que expressam os marcadores de superfície CD73, CD90 e CD105 e não expressam CD14 ou CD11b, CD34, CD45, CD79 ou CD19 e MHC-II (DOMINICI et al., 2006).

O termo CD (*Cluster designation*: denominação de grupamento) é empregado para denominar anticorpos monoclonais contra os antígenos leucocitários humanos (ROITT, 1999).

Além dos marcadores definidos pela ISCT, foram relatadas proteínas de superfície adicionais expressas pelas CTMs humanas, incluindo CD29, CD44, CD106 e CD166 (BARRY & MURPHY, 2004). Portanto, a imunofenotipagem é necessária e essas células devem ainda serem capazes de se diferenciar em osteoblastos, adipócitos e condroblastos (DOMINICI et al., 2006).

Em contraste com as CTMs humanas (DOMINICI et al., 2006), nenhum dos critérios de caracterização uniforme estão disponíveis até o momento para CTMs de origem equina. A disponibilidade de anticorpos monoclonais espécie-específicos ou por reação cruzada é limitada e isso dificulta a adequada imunofenotipagem das CTMs equinas (ROZEMULLER et al., 2010). Para equinos, bem como para os ovinos, a caracterização completa de CTMs não é possível, uma vez que não há a disponibilidade de anticorpos que reconheçam epítomos das diferentes espécies (DE SCHAUWER et al., 2011).

De Schauwer et al. (2011), com base no conhecimento atual das pesquisas com CTMs de equinos, propuseram um painel uniforme para assegurar que estão sendo utilizadas CTMs nessa espécie. Além das características de serem aderentes ao plástico e apresentarem morfologia fibroblastoide quando mantidas sob condições de cultura padrão seguindo os critérios da ISCT, elas devem se diferenciar nas linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica como demonstrado em diversos grupos de pesquisa com células equinas. As CTMs equinas necessitam, ainda, expressar CD29, CD44 e CD90 e não expressar CD14, CD79 e MHC II uma vez que a presença ou a ausência desses marcadores foram relatadas por vários autores.

Demonstra-se então, a importância do desenvolvimento de produtos espécie-específicos para equinos, uma vez que poucos anticorpos atualmente vendidos comercialmente reconhecem epítomos, sendo apenas encontrados o CD13, CD44 e MHC II.

Em CTMs indiferenciadas de equinos, a análise de expressão de gene é realizada principalmente para estudar a presença ou ausência de marcadores de pluripotência que são normalmente utilizadas para caracterizar CTEs. Os marcadores de pluripotência analisados até a presente data incluem os fatores de transcrição Oct-4, Sox-2 e Nanog (VIOLINI et al., 2009). Esses fatores de transcrição são proteínas reguladoras que asseguram a supressão de genes que levariam CTEs a se diferenciarem. O Oct-4 é essencial para a formação de células-tronco pluripotentes no embrião em fase inicial, por ser necessário no processo de autorrenovação e diferenciação em multilinhagens (REED & JOHNSON, 2008).

Um estudo recente realizado por Paebst et al. (2014) analisou a expressão dos marcadores de superfície padronizados em humanos pela ISCT em CTMs equinas derivadas de diferentes fontes, incluindo tecido adiposo (TA), medula óssea, tendão, sangue do cordão umbilical (SC) e tecido do cordão umbilical (TC). Foi demonstrado um diversificado padrão de expressão dos marcadores de superfície de acordo com a fonte de CTMs utilizada. Os marcadores de expressão positiva considerados pelo estudo como consistentemente detectados em todas as fontes estudadas foram o CD29 e CD44, concordando com trabalhos anteriores (RADCLIFFE et al., 2010; IACONO et al., 2012; DE SCHAUWER et al., 2012).

Ainda neste estudo, uma alta porcentagem de células positivas para CD44 foi encontrada em CTMs-TA ($97,18 \pm 1,57\%$) e uma grande variação foi relatada em CTMs-TC e CTMs-SC evidenciado pelo valor do desvio padrão das amostras ($46,08 \pm 46,1\%$ em CTMs-SC e $32,2 \pm 42,6\%$ em CTMs-TC). Com relação ao CD90, apenas CTMs-TA tiveram expressão consistente ($24,4 \pm 14,43\%$) quando comparada às outras fontes, que responderam de forma variada contradizendo outros estudos (RADCLIFFE et al., 2010; CORRADETTI et al., 2011; RANERA et al., 2011; IACONO et al., 2012; DE SCHAUWER et al., 2012). Em CTMs-TC a expressão de CD90 foi ausente. Este trabalho confirmou a rara expressão de

CD73 assim como outros já haviam relatado (RADCLIFFE et al., 2010; BRAUN et al., 2010; RANERA et al., 2011; DE SCHAUWER et al., 2012). Há grande divergência entre autores que analisaram o marcador CD105, que relataram a ausência de expressão (CORRADETTI et al., 2011; RANERA et al., 2011), baixa expressão (DE SCHAUWER et al., 2012) e expressão em altos valores (IACONO et al., 2012).

A respeito dos marcadores de exclusão padronizados pela ISCT, o estudo citado, demonstrou que as CTMs de equinos tiveram ausência de expressão assim como já demonstrado anteriormente (RADCLIFFE et al., 2010; BRAUN et al., 2010; CORRADETTI et al., 2011; RANERA et al., 2011; DE SCHAUWER et al., 2012).

O CD44, apesar de não ser específico para CTMs, demonstrado pela sua positividade de expressão em diversas células, mostra ser um marcador mais confiável uma vez que sua expressão foi correlacionada com todos os marcadores positivos estudados nesse trabalho com exceção do CD73. Nenhuma das fontes de CTMs equinas estudadas puderam satisfazer a definição de CTMs humanas definida pela ISCT. Os autores também reportaram neste estudo, diferenças individuais entre os doadores, evidenciadas pela expressão heterogênea dos marcadores de superfície entre as células da mesma fonte.

1.3 Imunomodulação

Atualmente, existem centenas de trabalhos para avaliar a terapia com CTMs em todo o mundo. O crescente interesse na terapia com essas células se deve às suas funções na reparação de tecidos e na imunomodulação do hospedeiro sem provocar respostas imunológicas de células T alorreativas ou outras células efetoras (VOSWINKEL et al., 2013). Essa característica é devido à ausência de MHC de classe II e de ativadores de linfócitos T. CTMs possuem algum nível de expressão de MCH de classe I que podem ativar células T, mas que concomitante à falta de moléculas coestimulatórias, não conseguem provocar uma resposta imune (TSE et al., 2003). Assim, como descrito por Lee et al. (2011), evidências emergentes sugerem que a maioria dos efeitos

benéficos dessas células pode ser explicada pela secreção de fatores terapêuticos que tem múltiplos efeitos.

Rossignol et al. (2009) explicam essa característica das CTMs, em parte, pela sua produção de citocinas como o fator estimulante de colônias de macrófagos, IL-6, IL-8, IL-12, fator de crescimento de hepatócitos, TNF- α e as interleucinas imunossupressoras 10 (NÉMETH et al., 2009) e TGF- β .

CTMs são potentes inibidoras da proliferação e ativação de células T (CASTILLO et al., 2008), da maturação de células dendríticas (NAUTA et al., 2007, JIANG et al., 2005) e da proliferação e toxicidade das células assassinas naturais por meio de fatores solúveis como o TGF- β e prostaglandina E2 (SPAGGIARI et al., 2006; SOTIROPOULOU et al., 2006). Além disso, estimulam a proliferação de células T reguladoras (SVOBODOVA et al., 2012) e podem diminuir a proliferação de células B (CORCIONE et al., 2006).

Portanto, as CTMs medeiam efeitos imunorreguladores na imunidade inata e adaptativa pela modulação da ativação e proliferação de células T (KRAMPERA et al., 2003), indiretamente através de fatores solúveis (DI NICOLA, et al., 2002; LE BLANC et al., 2003) ou por contato físico direto (KRAMPERA et al., 2003) independentemente do reconhecimento pelo MHC. Isso têm provocado muito interesse clínico nas CTMs como "doador universal de células", particularmente na medicina regenerativa e para indução de tolerância em transplantes alogênicos (LE BLANC et al, 2004).

As CTMs transplantadas tem um período de duração curto no organismo, por isso é importante que elas exerçam seus efeitos e ative células com fenótipo de regulação rapidamente. As células T reguladoras podem perdurar os efeitos das CTMs. Tem a possibilidade das CTMs incitar respostas de outras células apenas com a sua presença (EGGENHOFER et al., 2014).

Devido a estas potentes características, as CTMs têm sido amplamente exploradas para aplicações em medicina regenerativa. Como relatado por Helmy et al. (2010), as CTMs foram testadas em humanos, com resultados satisfatórios, para o tratamento de enfermidades diversas, tais como transtornos musculoesqueléticos, problemas cardíacos, doenças neurológicas, hepatopatias como cirrose, diabetes do tipo I e II, dentre outras. O efeito imunomodulador está sendo testado como adjuvantes no transplante alogênico para evitar a doença

do enxerto versus hospedeiro (LE BLANC et al., 2004; LAZARUS et al., 2005), durante o transplante de órgãos de modo a evitar rejeição pelo hospedeiro (BARTHOLOMEW et al., 2002; INOUE et al., 2006; WAN et al., 2008; CROP et al., 2009) e em doenças inflamatórias como a doença do Crohn (LE BLANC et al., 2008; NEWMAN et al., 2009).

A propriedade imunomoduladora apresentadas pelas CTMs varia de acordo com a fonte de obtenção das CTMs, com o número de passagens em cultura, com a dosagem de administração e condição patológica do paciente (MA et al., 2014).

No estudo descrito por Zhang et al. (2007), demonstrou-se que CTMs coletadas da medula óssea de ratos regularam a resposta imune, reduziram a produção de mediadores inflamatórios, preservaram enxertos no estágio inicial após transplante e prolongaram a vida do animal.

Estudos realizados com equinos, mostraram que as CTMs obtidas desses animais não alteraram de forma significativa os níveis basais de células T não ativadas, mas diminuíram a proliferação das células T ativadas (CARRADE et al., 2012). CTMs em cocultura com as células T ativadas, aumentou a produção, pelas células T, de IL-6 e diminuiu a de TNF- α e IFN- γ . Ainda em equinos, foi demonstrado a supressão de células T por meio da secreção de prostaglandina E2 mediada pelas CTMs (CARRADE-HOLT et al., 2014).

Carrade et al. (2011) estudaram CTMs derivadas de tecido do CU para avaliar a resposta imune em equinos após injeção intradérmica de CTMs autólogas e alogênicas. Os achados indicaram ausência de diferença significativa no tipo ou grau de inflamação ao comparar o transplante autólogo e alogênico dessas CTMs, indicando o transplante alogênico como opção segura e prática no tratamento de lesões em equinos.

Pigott et al. (2013) também avaliaram a resposta inflamatória após transplante de CTMs em equinos. Nesse trabalho foi comparada a resposta clínica e inflamatória após injeção intra-articular de CTMs autólogas, autólogas modificadas geneticamente, alogênicas e xenogênicas (humana), todas derivadas da medula óssea. Após avaliação clínica e do líquido sinovial, observou-se que todos os tipos celulares geraram um modesto grau de inflamação com pico nas primeiras 24 horas, mas as CTMs alogênicas e xenogênicas produziram um pico maior de inflamação quando comparadas com

as CTMs autólogas e autólogas modificadas. Porém a resposta inflamatória foi transitória, tendo sua resolução no intervalo de 7 a 28 dias sem intervenção medicamentosa.

1.4 Aplicação terapêutica

Apesar da biologia das CTMs não ser totalmente compreendida (FIGUEIREDO et al., 2009), a terapia celular com CTMs para o tratamento de tendinopatias em equinos se tornou popular e teve boa receptividade na última década (PATERSON et al., 2014).

O tendão lesionado forma um tecido cicatricial no seu longo período de cura afetando sua função que não volta a ser como a de um tendão não agredido. Os equinos são forçados ao exercício até seu limite funcional e à medida que envelhecem, seus tendões iniciam um processo de degeneração até que começam a falhar (RICHARDSON, L. E. et al., 2007; VIOLINI et al., 2009).

Outra doença do sistema osteomuscular mais frequente em equinos e também responsável pela aposentadoria antecipada e eutanásia é a osteoartrite (ARNHOLD et al., 2007). A osteoartrite espontânea deve sua importância ao fato de poder ocorrer tanto em cavalos atletas quanto em cavalos mais velhos e os tratamentos atuais não são competentes em interromper a progressão da doença, apenas reduzir a dor e inflamação (FELSON, 2009).

O mesmo ocorre com a doença do disco intervertebral, maior causadora da dor lombar em humanos (RICHARDSON, et al., 2007). O tratamento dessas doenças com CTMs é promissor, pois elas podem gerar tecidos *in vitro* que podem ser transplantadas no paciente, além dos fatores tróficos destacados no estudo da biologia das CTMs (BUHRMANN et al., 2010). Esses efeitos tróficos sobre células endógenas são importantes uma vez que a sobrevivência das CTMs após o transplante é baixa, sugerindo que os efeitos benéficos não são provocados apenas por meio da sua diferenciação direta em células do tecido (PATERSON et al., 2014).

A maioria das terapias utiliza CTMs autólogas, mas devido à sua capacidade imunomoduladora, parece ser perfeitamente viável o uso de CTMs alogênicas (KODE et al., 2009). Devido a essa qualidade, o potencial terapêutico das CTMs estão sendo estudadas em artrite reumatoide (LIU et al., 2010).

Um estudo realizado em humanos, mostrou que CTMs de cordão umbilical inibiu a proliferação de sinoviócitos semelhantes a fibroblastos que são estimulados pela citocina inflamatória TNF- α , além de regular negativamente a produção de linfócitos T (CSAKI et al., 2009) e induzirem a produção de células T reguladoras (LIU et al., 2010). As terapias com células-tronco devem ser seguras, isso significa que além de não causarem rejeição no hospedeiro, não podem formar tumores, devendo ser facilmente colhidas e expandidas (SOHNI & VERFAILLIE, 2013). Diversos trabalhos vem testando a imunogenicidade das CTMs e mostrando sua segurança em transplantes autólogos e alogênicos por diversas vias, como intradermal (CARRADE et al., 2011), intra-articular (PIGOTT et al., 2013) e intratecal (MAIA et al., 2015).

Considerando os estudos concluídos até o momento, é pouco compreendido o funcionamento da terapia com CTMs. Novos estudos objetivam elucidar as propriedades e o destino das CTMs após administração em um hospedeiro a fim de criar uma terapia eficaz com esse tipo celular (EGGENHOFER et al., 2014).

A revisão produzida por Schnabel et al. (2013) fornece informações atuais sobre o panorama das terapias com CTMs destacando o conhecimento e as recomendações nas diversas áreas e enfermidades equinas.

Alguns pesquisadores testaram o transplante de CTMs como terapias em equinos e obtiveram resultados animadores. Em um estudo retrospectivo feito por Loon et al. (2014), 52 equinos com lesões tendíneas foram tratados com CTMs derivadas do sangue de CU e 77% dos animais retornaram ao trabalho com desempenho igual ou superior em um prazo de 6 meses. Smith et al. (2013) tratou tendinites de ocorrência natural com CTMs coletadas de medula óssea e observou melhora significativa nos principais parâmetros de avaliação utilizados quando comparados ao grupo não tratado. Varanda (2012) coletou as CTMs de medula óssea para a reparação de falhas ósseas induzidas experimentalmente e notou aumento da osteogênese no osso tratado quando comparado ao controle (sem transplante de CTMs).

Trabalhos diversos tem mostrado os efeitos benéficos das CTMs no tratamento de enfermidades de modo a elucidar o real e completo mecanismo de atuação dessas células. Estudos in vivo para a avaliação da seguridade no

transplante das CTMs alogênicas possuem grande relevância e apesar de ainda pouco explorados, tem se tornado foco na pesquisa científica atual.

CAPÍTULO 2

Artigo científico nas normas submetido ao periódico “Cytotherapy”:**Transplante alogênico intramuscular de células-tronco mesenquimais derivadas de cordão umbilical equino.**

Marianne Camargos Dias¹, Fernanda da Cruz Landim¹, Carolina Nogueira Moraes¹, Leonardo Dourado da Costa², Caroline Medeiros Geraldini¹, Vânia Maria de Vasconcelos Machado¹, Leandro Maia^{1§}

¹Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology, College of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University, UNESP, Botucatu, SP, Brazil

²Department of Veterinary Pathology, College of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University, UNESP, Botucatu, SP, Brazil

§Corresponding author: Leandro Maia

Email addresses:

MCD: marianne.vet07@gmail.com

FCL: fernanda@fmvz.unesp.br

CNM: carolmoraes@hotmail.com

LDC: leonardomvet@gmail.com

CMG: cmgeraldini@gmail.com

VMVM: vaniamvm@fmvz.unesp.br

LM: leandromvet@hotmail.com

Resumo

Introdução

As células-tronco mesenquimais (CTMs) possuem grande potencial terapêutico, particularmente devido à sua ação no processo de reparação tecidual mediante a secreção de biomoléculas tais como: fatores de crescimento, anti-inflamatórios, antiapoptóticos e antifibróticos, fundamentais no processo de regeneração tecidual. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a hipótese de que o transplante intramuscular de CTMs alogênicas do cordão umbilical (CTMs-CU) utilizando modelo experimental equino é seguro, demonstrando esta como uma fonte adequada para obtenção de células para uso terapêutico, inclusive com possibilidade de extrapolação dos resultados e benefícios para outras espécies.

Material e métodos

As CTMs-CU foram cultivadas, caracterizadas e criopreservadas para posterior transplante em seis éguas híbridas. No dia 0 foi realizado transplante de três milhões de CTMs-CU em Solução Balanceada de Hank's (HBSS) no músculo dos lados direito e esquerdo. Como controle, foram realizadas injeções de HBSS caudalmente às regiões tratadas com CTMs-CU. Foram realizadas biópsias musculares em cada animal 30 dias antes do transplante, no dia 2 e no dia 7. Todos os procedimentos foram precedidos por ultrassonografia e colheita de sangue. As biópsias foram analisadas histologicamente.

Resultados

As avaliações hematológicas se mantiveram dentro do padrão de normalidade e não foram observadas diferenças nos momentos estudados ($P>0,05$). O exame ultrassonográfico revelou aspecto sugestivo de reação inflamatória 48 horas após os transplantes em ambos os grupos (controle e tratado). Na avaliação histológica, foi encontrada apenas inflamação discreta temporal (D30 *versus* D2; $P<0,05$) somente no grupo tratado, sem diferenças ($P>0,05$) entre os grupos estudados nos diferentes momentos de avaliação.

Conclusão

As CTMs-CU, nas condições experimentais, não provocam inflamação que cause lesão tecidual ou que leve a sua rejeição pelo organismo do hospedeiro e portanto tem um bom potencial para utilização clínica.

Palavras-chave: células tronco mesenquimais, alogênicas, transplante, músculo, cordão umbilical

2.1 Introdução

O estudo de células-tronco é destaque tanto na medicina humana quanto na veterinária, tendo sido, nesta última, desenvolvidas terapias celulares principalmente com células-tronco mesenquimais (CTMs) [1]. As CTMs possuem potencial terapêutico devido à sua capacidade de diferenciação em multilinhagens, bem como atuação na reparação tecidual secretando fatores de crescimento, modulando e suprimindo a inflamação e regenerando tecidos [2]. A terapia com CTMs é uma alternativa assistencial na reparação das lesões musculoesqueléticas frequentemente apresentadas por equinos. Isso é de grande significância por reduzir custos e tempo de tratamento [3].

As fontes de obtenção de CTMs mais presentes na pesquisa científica e prática clínica é a medula óssea e o tecido adiposo. Fontes alternativas, tais como as de anexos fetais, estão sendo cada vez mais estudadas para transpor limitações relacionadas à facilidade de isolamento, características de expansão e complicações locais em doadores [4,5]. As CTMs obtidas da medula óssea são geralmente autólogas e para isso o animal é submetido à aspiração de medula óssea, um procedimento invasivo e com riscos potencialmente graves como o de pneumopericárdio além de ser doloroso e incômodo ao animal [6]. Ademais, CTMs derivadas de medula óssea demoram cerca de quatro semanas para serem expandidas, o que impossibilita tratamento de enfermidades agudas no pico inflamatório inicial [7].

CTMs quando utilizadas em terapias autólogas, tornam o tratamento oneroso e sem garantia de seu efeito já que não é possível a realização do tratamento durante a fase aguda da enfermidade e a padronização da amostra como no uso de CTMs alogênicas em que pode ser feita a seleção de animais jovens, saudáveis e o descarte de amostras com crescimento lento ou atípico. As CTMs derivadas de anexos fetais superam as desvantagens das demais fontes. Por ser uma fonte não invasiva de CTMs, os anexos fetais são mais indicados para a criação de bancos, permitindo sua padronização e disponibilizando CTMs de forma imediata [8]. As CTMs originadas da matriz intervascular do CU, mesmo sendo consideradas células-tronco adultas, mantêm características dos tecidos embrionários que os deram origem e de células-tronco embrionárias, como a expressão do marcador Oct-4, um importante fator de transcrição envolvido na manutenção da pluripotencialidade das células-tronco embrionárias, além da capacidade de diferenciação em variados tecidos e grande proliferação, não demonstrando imunogenicidade e tumorigenicidade [9].

O equino é um bom modelo experimental para extrapolação de resultados para medicina humana, onde geralmente são utilizados pequenos mamíferos devido ao baixo custo, padronização e purificação das linhagens. Apesar do equino ser uma espécie com alto custo de manutenção, é o animal que possui mais semelhanças com a espécie humana quando se refere à doenças musculoesqueléticas. Ao atingir maturidade física, o processo de envelhecimento e o trabalho a que são submetidos os levam a doenças similares às dos humanos. Devido às menores restrições no campo da medicina veterinária, o estudo clínico com células-tronco é, por vezes, mais adiantado que a terapia humana [10].

Atualmente, existem centenas de trabalhos para avaliar a terapia com CTMs em todo o mundo. O crescente interesse na terapia com essas células se deve às suas funções na reparação de tecidos e na imunomodulação do hospedeiro sem provocar respostas imunológicas de células T alorreativas ou outras células efetoras [2]. Essa característica é devido à ausência de expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade maior (MHC) classe II e de ativadores de linfócitos T. CTMs possuem algum nível de expressão de MCH de classe I que podem ativar células T, mas que concomitante à falta de moléculas coestimulatórias, não conseguem provocar uma resposta imune [11]. Assim, como descrito por Lee et al. [12], evidências emergentes sugerem que a maioria dos efeitos benéficos dessas células pode ser explicada pela secreção de fatores terapêuticos que tem múltiplos efeitos.

As CTMs medeiam efeitos imunorreguladores na imunidade inata e adaptativa pela modulação da ativação e proliferação de células T [13], indiretamente através de fatores solúveis [14] ou por contato físico direto [13] independentemente do reconhecimento pelo MHC. Essa característica imunomoduladora têm provocado muito interesse clínico nas CTMs como "doador universal de células", particularmente na medicina regenerativa e para indução de tolerância em transplantes alogênicos [15].

Pesquisas sugerem que CTMs equinas derivadas de anexos fetais, incluindo tecido do cordão umbilical, não incitam resposta inflamatória celular quando administradas por via intradérmica e intra-articular [16, 17]. Pode-se, ainda, inferir que as CTMs derivadas de anexos fetais tem um maior poder imunomodulador quando comparadas às derivadas de fontes equinas adultas [18].

Devido a estas potentes características, as CTMs têm sido amplamente exploradas para aplicações em medicina regenerativa. Como relatado por Helmy et al. [19], as CTMs foram testadas em humanos, com resultados satisfatórios, para o tratamento de

enfermidades diversas, tais como transtornos musculoesqueléticos, problemas cardíacos, doenças neurológicas, hepatopatias como cirrose, diabetes do tipo I e II, dentre outras.

A propriedade imunomoduladora apresentada pelas CTMs varia de acordo com a fonte de obtenção das CTMs, com o número de passagens em cultura, com a dosagem de administração e condição patológica do paciente [20].

A maioria das terapias utiliza CTMs autólogas, mas devido à sua capacidade imunomoduladora, parece ser perfeitamente viável o uso de CTMs alogênicas [21]. As terapias com células-tronco devem ser seguras, isso significa que além de não causarem rejeição no hospedeiro, não podem formar tumores, devendo ser facilmente colhidas e expandidas [22]. Diversas pesquisas vem testando a imunogenicidade das CTMs em equinos e mostrando sua segurança em transplantes autólogos e alogênicos por diversas vias, como intradermal utilizando CU [16], intra-articular [23] e intratecal [24] utilizando MO e intralesional em tendão utilizando membrana amniótica [25].

Desta forma, esse trabalho testa a hipótese de que o transplante intramuscular de CTMs-CU é seguro por essa via utilizando modelo experimental equino com possibilidade de extrapolar os resultados e benefícios para outras espécies, inclusive humana.

2.2 Material e métodos

A etapa experimental deste estudo foi realizada no laboratório de Reprodução Avançada e Terapia Celular (LANÇA), no departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, na Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP, campus de Botucatu-SP, com aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da mesma faculdade sob o protocolo 145/2013-CEUA.

2.2.1 Seleção e manejo dos animais para experimentação *in vivo*

Foram selecionadas para a realização do transplante de CTMs-CU seis éguas híbridas, mestiças, com idade entre 6 a 12 anos, de peso corporal entre 300 e 500Kg. Os animais foram selecionados mediante exames físico, hematológico e ultrassonográfico prévios do músculo glúteo médio superficial.

2.2.2 Colheita do cordão umbilical

Amostra de cordão umbilical (CU) equino foi colhida em haras de Puro Sangue Inglês. Um segmento de CU de aproximadamente 10cm de extensão foi colhido e lavado com Tampão fosfato-salino pH 7,4 (PBS) contendo antibiótico (1%) e antimicótico (1,2%). A amostra foi lavada com PBS e acondicionada em tubo do tipo Falcon de 50mL contendo meio composto por DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Gibco, EUA) alta glicose, 20% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco, EUA), penicilina (100UI/mL), estreptomicina (100mg/mL) e anfotericina (3µg/mL) (Gibco, EUA). Os tubos foram armazenados e transportados a 5°C no sistema de transporte refrigerado de sêmen Botutainer (Botupharma, Brasil) até o laboratório.

2.2.3 Isolamento e cultivo das CTMs

No laboratório, o segmento de CU foi lavado em PBS com penicilina/estreptomicina (1%), dissecado para remoção total dos vasos sanguíneos e fragmentado para facilitar a digestão enzimática em solução de colagenase (1mg/mL) (Sigma, USA) por aproximadamente 40 minutos a 37 °C. A cada 10 minutos, o material foi passado no vortex para auxiliar a digestão. Após o tempo de digestão, a amostra foi filtrada com filtro de 70µm (BD Biosciences, EUA) e, posteriormente centrifugada com DMEM alta glicose a 350 g por 10 minutos. Em seguida o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado e cultivado em meio de cultivo composto de DMEM alta glicose, 20% de SFB, penicilina (100UI/mL), estreptomicina (100mg/mL), anfotericina (3µg/mL) e amicacina (11µg/mL) a 37,5°C em atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% CO₂.

A cada dois a três dias o meio foi trocado até a confluência celular mínima de 80%, quando procedeu-se os subcultivos para caracterização e criopreservação da amostra. Para esse propósito, as CTMs-CU em terceira passagem, foram lavadas e ressuspensionadas lentamente com o meio de criopreservação a uma concentração final de 3×10^6 células por mL. O meio de criopreservação utilizado foi o composto por 90% de SFB e 10% de dimetil sulfoxido (DMSO) (Sigma-Aldrich Corp, EUA); penicilina/estreptomicina (10µL/mL) e anfotericina B (3µg/mL). Os criotubos contendo as suspensões celulares foram acondicionados em um recipiente para criogenia Mr. Frosty (Nalgene, 5100-001), que proporciona uma taxa de resfriamento progressivo de -1°C/minuto. Esse recipiente (Mr. Frosty) foi acondicionado em um freezer -80°C por 24 horas para que ocorra um

congelamento lento das células. Após este período, os criotubos foram retirados do freezer -80°C e colocados rapidamente em botijão de nitrogênio líquido.

2.2.4 Ensaio de diferenciação celular em linhagens mesodermiais

As CTMs-CU foram semeadas (segunda passagem) em placas de seis *Wells* (Sarstedt, EUA) com meio de manutenção. Quarenta e oito horas após a incubação, o meio de manutenção foi removido e o meio de diferenciação osteogênico e adipogênico STEMPRO® (Invitrogen Gibco®, EUA) foi acrescido ao subcultivo, de acordo com a recomendação do fabricante. Ao meio adipogênico foi realizada a suplementação com 5% de soro de coelho e ao meio osteogênico, 20% de SFB, baseados em estudos pilotos prévios em nosso laboratório [26] e na melhor resposta a diferenciação osteogênica relatada por Toupadakis et al. [27] com essa concentração de SFB para CTMs provenientes do tecido do cordão umbilical.

Os meios de diferenciação foram trocados a cada dois a três dias e a confirmação da diferenciação osteogênica e adipogênica foi realizada, respectivamente, através da demonstração da deposição de matriz de cálcio utilizando a coloração com Alizarin red a 2% pH 4,2 (Sigma-Aldrich Corp, EUA) no 10º dia e da presença intracitoplasmática de gotículas de gordura utilizando o corante Oil red a 0,5% (Sigma-Aldrich Corp, EUA) no 8º dia.

2.2.5 Análise por citometria de fluxo

Análises imunofenotípicas das CTMs-CU foram realizadas, em primeira passagem e após criopreservação em terceira passagem. A caracterização foi realizada no citômetro de fluxo LSRFORTESSA (BD Biosciences, EUA), utilizando os anticorpos monoclonais mouse anti-rat CD90 (abDSerotec, EUA), mouse anti-human CD34 (Becton Dickinson and Company, EUA), mouse anti-horse CD44 (abDSerotec, EUA), mouse anti-horse MHC classe II marcados com a sonda isoticiato de fluoresceína (FITC). Durante as análises foram contabilizados 10.000 eventos, sendo considerados positivos os marcadores com expressão maior que 2%.

2.2.6 Ensaio de Unidades Formadoras de Colônias fibroblásticas (UFC-F)

A capacidade e eficiência de autorrenovação das CTMs-CU foi avaliada mediante a realização de ensaio de UFC-F, conforme metodologia descrita por Mensing et al. [28],

com modificações na concentração de células plaqueadas e tempo de cultivo, determinadas com base em estudos pilotos prévios. As CTMs-CU (segunda passagem) foram plaqueadas, antes da criopreservação, em baixa densidade (aproximadamente 220 células/cm²) em placas de seis Wells. No 5º dia as culturas foram fixadas e coradas com 1% de cristal violeta em 100% de metanol. As colônias coradas com mais de 20 células foram classificadas como UFC-F e contabilizadas. O cálculo da eficiência foi conduzido utilizando-se a seguinte fórmula: Eficiência de UFC-F = (UFC-F contadas/ células originalmente plaqueadas) x 100. O ensaio de UFC-F foi realizado em triplicata.

2.2.7 Exames hematológicos e ultrassonográficos

Em todos os momentos estudados foram realizados os exames hematológicos e ultrassonográficos. As amostras de sangue foram coletadas por venopunção da jugular em tubos à vácuo contendo EDTA para determinação dos valores de hematócrito, hemácias, hemoglobina, VCM, CHCM, proteína total, RDW, plaquetas, leucócitos, segmentados, linfócitos, eosinófilos, basófilos, monócitos e fibrinogênio. Os valores das variáveis hematológicas foram analisadas de acordo com os valores de referência de Jain [29] e Meyer & Harvey [30].

Os exames ultrassonográficos foram realizados com equipamento de ultrassom, modelo My lab 30 (The Esaote Group, Itália), com transdutor microconvexo, frequência de 6,6 MHz, 70-95% de ganho, profundidade de 7-8cm e aproximadamente 2,5-3,5cm de foco. O tecido muscular das regiões eram examinadas pela ultrassonografia antes da realização dos procedimentos em todos os momentos e durante especificamente os implantes de CTMs e Solução Balanceada de Hank's (HBSS) para que a agulha fosse guiada à profundidade determinada.

2.2.8 Transplante celular

As CTMs-CU criopreservadas foram descongeladas 150 dias depois da criopreservação, em banho-maria a 37°C por 2 minutos. Após este período, o conteúdo do criotubo foi colocado lentamente em um tubo do tipo Falcon de 15mL contendo 9mL de meio de cultivo pré-aquecido e submetido à centrifugação durante três minutos a 220g. Após a centrifugação, as células foram ressuspensas no meio de cultivo e plaqueadas em frascos de cultura de 75cm² para expansão durante duas semanas para serem transplantadas.

Após confluência celular de no mínimo 80%, as CTMs-CU foram tripsinizadas e a concentração celular e viabilidade, determinadas pelo método de exclusão Azul Tripan a 0,4%. Após sedação dos animais com xilazina a 10% (0,5mg/Kg) por via intravenosa, o transplante celular (D0) foi realizado em dois pontos, um no músculo glúteo médio superficial direito e outro no esquerdo com o auxílio do ultrassom para a determinação do local e profundidade da aplicação. Em cada região, foi transplantado na ordem de 3×10^6 CTMs ressuspendidas em HBSS. O volume total de 0,9mL foi administrado em 9 pontos (100 μ L em cada) com o auxílio de uma seringa de 1mL e agulha 40x1,2mm. Em outras duas regiões do músculo glúteo médio (lados direito e esquerdo) foram injetados 0,9mL de HBSS divididos da mesma forma em 9 pontos para a avaliação da distensão provocada pela injeção de líquido, servindo como grupo controle.

2.2.9 Biópsias musculares

Ao longo da fase experimental, foram realizadas seis biópsias nos músculos glúteo médio superficial de cada animal em pontos diferentes, conforme Figura 1. As duas primeiras foram feitas, em fase pré-experimental, 30 dias antes do transplante das CTMs (D-30), sendo uma do lado direito e a outra do lado esquerdo para verificar a integridade das fibras musculares e ausência de inflamação. As demais biópsias foram realizadas aos tratamentos, sendo duas delas (uma em região de implante de CTMs e a outra de HBSS) 48h depois (D2) e as outras duas 7 dias depois (D7). Tanto no D2 quanto no D7 as biópsias foram realizadas do mesmo lado para que a inflamação causada pelo procedimento não interferisse na região ainda não biopsiada.

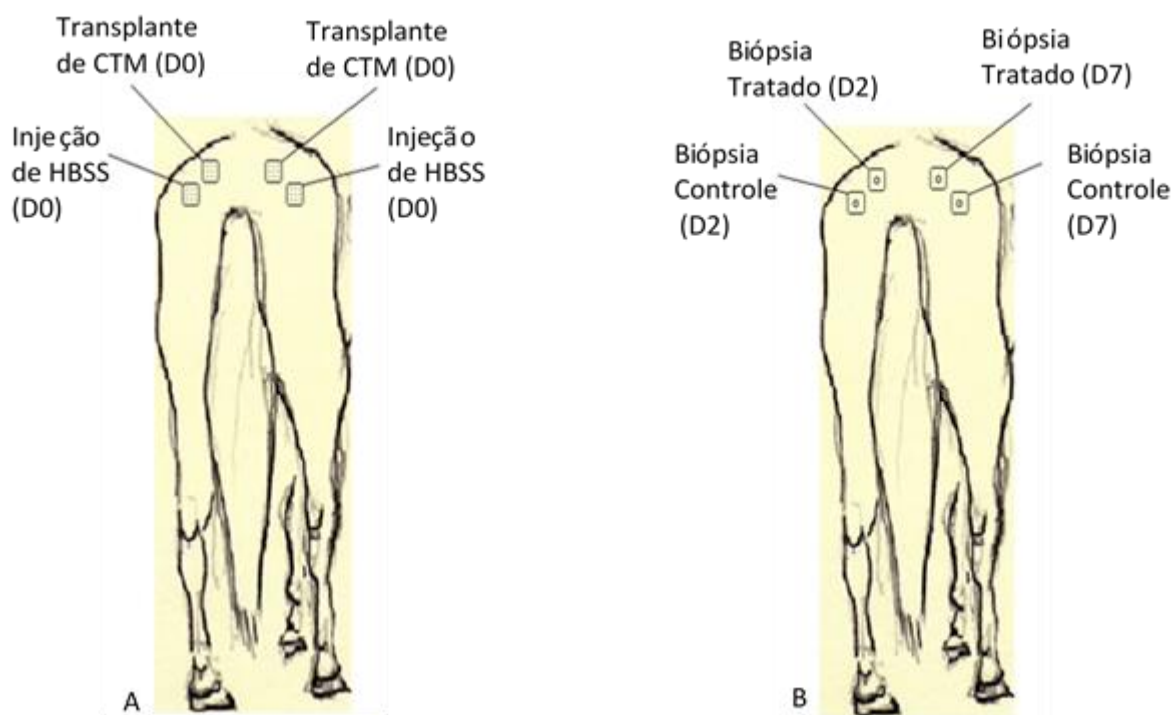


Figura 1. Esquema do transplante de CTMs-CU e biópsias musculares. (A) Localização dos transplante de CTMs e HBSS realizadas no D0. (B) Observam-se as biópsias realizadas nos pontos dos transplantes, sendo do lado esquerdo 2 dias após os transplantes e do lado direito 7 dias após os transplantes.

Semelhante ao realizado por Padilha et al. [31], a biópsia foi feita utilizando-se a agulha tipo Bergström 6,0 (6mm). Antes da sua realização, a região coincidente ao glúteo médio foi tricotomizada e limpa. Os animais foram sedados com xilazina a 10% e o bloqueio anestésico foi realizado no subcutâneo com aproximadamente 3mL de lidocaína 2% sem vasoconstritor. Após antissepsia, foi feita uma incisão de 1cm atingindo pele, subcutâneo e fáscia muscular por onde a agulha de biópsia foi inserida logo após. Os fragmentos de tecido muscular colhidos foram lavados com soro fisiológico de modo a cessar contração muscular e cobertos por talco neutro com o objetivo de proteger a arquitetura muscular durante a criopreservação. Cada amostra foi armazenada em um criotubo (Nalgene, EUA) e congelado em nitrogênio líquido, ficando estocado a uma temperatura de -196°C em um botijão próprio.

Todos os transplantes e biópsias foram precedidas pelo exame ultrassonográfico além da colheita de sangue para os parâmetros hematológicos.

2.2.10 Avaliação histológica

As 36 amostras de tecido muscular congeladas em nitrogênio líquido foram submetidas a cortes histológicos em secções transversais de 4µm de espessura em criostato (Leica Microsystems, Alemanha), sendo os mesmos estendidos em lâminas de vidro para coloração com Hematoxilina e Eosina (HE). Para avaliação dos parâmetros histológicos, as lâminas foram observadas no microscópio de luz, modelo Axio Imager A1 (Carl Zeiss, Alemanha), acoplado à uma câmara digital modelo Axiocam MRc (Zeiss Vision, Alemanha) do Serviço de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, e avaliados pelo uso do programa computacional Axiovision Software Rel. versão 4.6 (Zeiss Vision, Alemanha).

A análise morfológica qualitativa, por microscopia de luz em aumento de 100 e 400 vezes, compreendeu a avaliação da presença e tipo de infiltrado inflamatório, infiltrado neutrofílico, degeneração/necrose de fibras e presença ou ausência de fibrose. A análise semi-quantitativa consistiu na graduação dos componentes teciduais descritos acima, com exceção da fibrose, em ausente (grau 0), discreto (grau 1), moderado (grau 2) e intenso (grau 3) conforme detalhado na Tabela 1. Para os parâmetros infiltrado neutrofílico e degeneração/necrose de fibras, foi feita uma média aritmética dos valores encontrados em cinco campos contados por lâmina. A avaliação do grau de intensidade do infiltrado inflamatório foi feita seguindo o padrão de distribuição.

TABELA 1. Graduação e critérios utilizados para a avaliação semi-quantitativa dos parâmetros na histologia do músculo glúteo médio superficial de equinos, pelo método de Hematoxilina e Eosina.

Parâmetros	Graduação			
	Grau 0 Ausente	Grau 1 Discreto	Grau 2 Moderado	Grau 3 Intenso
Infiltrado neutrofílico	Ausente	1 a 10 neutrófilos por campo (400x)	11 a 20 neutrófilos por campo (400x)	>20 neutrófilos por campo (400x)
Infiltrado inflamatório	Ausente	-Discretas células inflamatórias -Distribuição Focal -Única região perivascular	-Distribuição multifocal -Regiões perivascular e interfasciculares	-Distribuição difusa -Região interfascicular
Degeneração/necrose de miócitos	Ausente	1 fibra por campo (100x)	2 a 3 fibras por campo (100x)	>4 fibras por campo (100x)

Os valores para infiltrado neutrofílico e degeneração/necrose de miócitos foram encontrados calculando-se a média aritmética do número de células visualizadas em cinco campos contados por lâmina, semelhante à metodologia descrita por Brasileiro et al. [32].

2.2.11 Análise estatística

Os resultados referentes aos parâmetros hematológicos foram apresentados de forma descritiva em média e desvio padrão, os ensaios de UFC-F em forma de média e a avaliação histológica em mediana. A análise estatística do efeito dos parâmetros hematológicos foi realizada com o auxílio do programa software Sigma Plot for Windows versão 11.0 (copyright ® 2008. Systat software, Inc, Alemanha). As variáveis que não passaram no teste de normalidade (Kolmogov-Smirnov) foram analisadas pelo One Way Repeated Measures Analysis of Variance. O Tukey Test foi usado para todos os pares de comparação múltipla, adotando-se $P < 0,05$ como significativo. Para a avaliação histológica, as variáveis estudadas foram analisadas pelo teste Mann-whitney, adotando-se $P < 0,05$ como significativo.

2.3 Resultados

2.3.1 Colheita, isolamento e cultivo das CTMs-CU

O uso de CU para o isolamento e cultivo de CTMs se mostrou de fácil obtenção, sem causar estresse, dor e complicações à égua e ao potro. O protocolo de isolamento foi eficaz e uma pequena porção da amostra foi suficiente para obtenção de uma concentração adequada de células. Observou-se aderência das CTMs-CU ao plástico já no segundo dia de cultivo, permitindo a primeira troca do meio de manutenção, eliminando, assim, as células não aderentes. A morfologia fibroblastoide apresentada pelas CTMs-CU foi observada com 24 horas de cultivo e a confluência de, no mínimo, 80% no sétimo dia do cultivo primário.

2.3.2 Potencial de diferenciação em linhagens mesodermais

O potencial de diferenciação das CTMs-CU foi demonstrado pela resposta positiva à diferenciação osteogênica e adipogênica. Na diferenciação osteogênica pode-se observar a deposição de grande quantidade de matriz extracelular rica em cálcio comprovada pela coloração positiva com Alizarim red no 10º dia. Na diferenciação adipogênica pode-se observar a presença de grande quantidade de gotículas de gordura no citoplasma evidenciadas pela coloração positiva com Oil red no 8º dia.

2.3.3 Caracterização imunofenotípica

Na análise imunofenotípica as CTMs-CU apresentaram a fresco em cultivo primário e após criopreservação em terceira passagem, respectivamente, elevada expressão do marcador CD44 (99,2 e 92,6%) e expressão negativa para os marcadores MHC-II (2,6 e 1,4%) e CD34 (0,7 e 0,60%), considerando valor menor que 3% como ausência de expressão. Para o marcador CD90, houve média expressão na análise da amostra a fresco (56,8%) e baixa para a amostra após criopreservação (9,5%).

2.3.4 Unidades formadoras de colônias fibroblásticas

Os valor médio referente ao número de colônias do ensaio UFC-F foi 129 e o valor de eficiência, 6,45%. O ensaio comprovou a capacidade das CTMs-CU cultivadas de gerar colônias fibroblásticas a partir de células individuais.

2.3.5 Criopreservação

As CTMs-CU criopreservadas da amostra selecionada foram descongeladas e a expansão em frascos de cultura de 75cm² foi satisfatória, atingindo confluência de 80% em sete dias. Após confluência celular do segundo subcultivo pós descongelação, a viabilidade celular das células transplantadas foi em média de 77,71% ($\pm 9,5$).

2.3.6 Transplante das CTMs-CU

O método escolhido para o transplante de CTMs foi seguro, não gerou infecção e incômodo ao animal pós transplante. Além disso, permitiu uma melhor distribuição das CTMs na região delimitada do tecido muscular.

2.3.7 Avaliação hematológica

As variáveis hematológicas (hematócrito, hemácias, hemoglobina, VCM, CHCM, proteína total, RDW, plaquetas, leucócitos, segmentados, linfócitos, eosinófilos, basófilos, monócitos e fibrinogênio) se mantiveram dentro do padrão da normalidade para a espécie equina em todas as avaliações após os transplantes das CTMs-CU e diferenças ($P > 0,05$) não foram observadas para as variáveis estudadas entre os momentos de avaliação (D0, D2 e D7). Os valores mínimos, máximos e médios das principais variáveis

hematológicas avaliadas durante a fase experimental estão apresentadas nas Tabelas 2 e 3.

TABELA 2. Valores do hemograma (eritrócitos, hemoglobina e hematócrito) e proteína plasmática total obtidos dos animais estudados em todos os momentos.

Momento	Erit (10⁶/μL)	Hb (g/dL)	Ht (%)	PPT (g/dL)
	Mín-Máx (X e σ)	Mín-Máx (X e σ)	Mín-Máx (X e σ)	Mín-Máx (X e σ)
D-30	6,4-10 (6,8 ± 0,23)	11-17 (10,96 ± 0,67)	32-47 (31,6 ± 1,47)	5,8-8,7 (6,76 ± 0,20)
D0	6,4-10 (7,36 ± 0,28)	11-17 (12,36 ± 0,49)	32-47 (35,16 ± 1,30)	5,8-8,7 (7 ± 0,19)
D2	6,4-10 (7,56 ± 0,14)	11-17 (12,53 ± 0,39)	32-47 (34,66 ± 0,84)	5,8-8,7 (6,66 ± 0,15)
D7	6,4-10 (7,45 ± 0,25)	11-17 (12,48 ± 0,44)	32-47 (35,16 ± 1,07)	5,8-8,7 (6,7 ± 0,08)

Erit: eritrócitos; Hb: hemoglobina; Ht: hematócrito; PPT: proteína plasmática total. Os valores estão representados em média (X) e desvio padrão (σ). Diferenças (P<0,05) entre os momentos não foram observadas para nenhuma das variáveis.

TABELA 3. Valores da contagem de leucócitos, fibrinogênio e plaquetas obtidos dos animais estudados em todos os momentos.

Momento	Leucócitos (x10³/μL)	Fibrinogênio (mg/dL)	Plaquetas (células/μL)
	Mín-Máx (X e σ)	Mín-Máx (X e σ)	Mín-Máx (X e σ)
D-30	5,2-13,9 (8,23 ± 0,67)	100-400 (300 ± 44,72)	100-270000 (185833 ± 18481)
D0	5,2-13,9 (7,916 ± 0,64)	100-400 (366,66 ± 33,33)	100-270000 (180033 ± 12946)
D2	5,2-13,9 (8,16 ± 0,62)	100-400 (266,66 ± 42,16)	100-270000 (182516 ± 16376)
D7	5,2-13,9 (8,13 ± 0,29)	100-400 (240 ± 36,51)	100-270000 (185833 ± 8092)

Diferenças (P<0,05) entre os momentos não foram observadas para nenhuma das variáveis. Os valores estão representados em média (X) e desvio padrão (σ).

2.3.8 Avaliação ultrassonográfica

Em comparação à musculatura íntegra observada no D0, a musculatura do glúteo médio no D2, nos grupos tratado e controle, apresentou-se heterogênea, com presença de regiões hipo a anecogênicas, com contornos pouco definidos e irregulares. As imagens geradas no D2 sugerem a presença de edema e possível reação inflamatória referentes aos transplantes realizados no D0 em ambos os grupos.

No D7 pôde-se observar reorganização das fibras musculares e ausência das regiões hipo-anecogênicas observadas no D2. Com relação ao D0, a musculatura apresentou-se com ecotextura heterogênea e presença de discretas regiões hipoecogênicas em permeio às fibras musculares. A Figura 2 ilustra as imagens ultrassonográficas da região tratada com CTMs-CU em todos os momentos em um animal.

Os padrões observados nas imagens, para os momentos D2 e D7, se aplicam tanto para a região que recebeu CTMs quanto para a região infiltrada apenas com HBSS, não observando diferenças aparentes entre as duas regiões em cada momento.

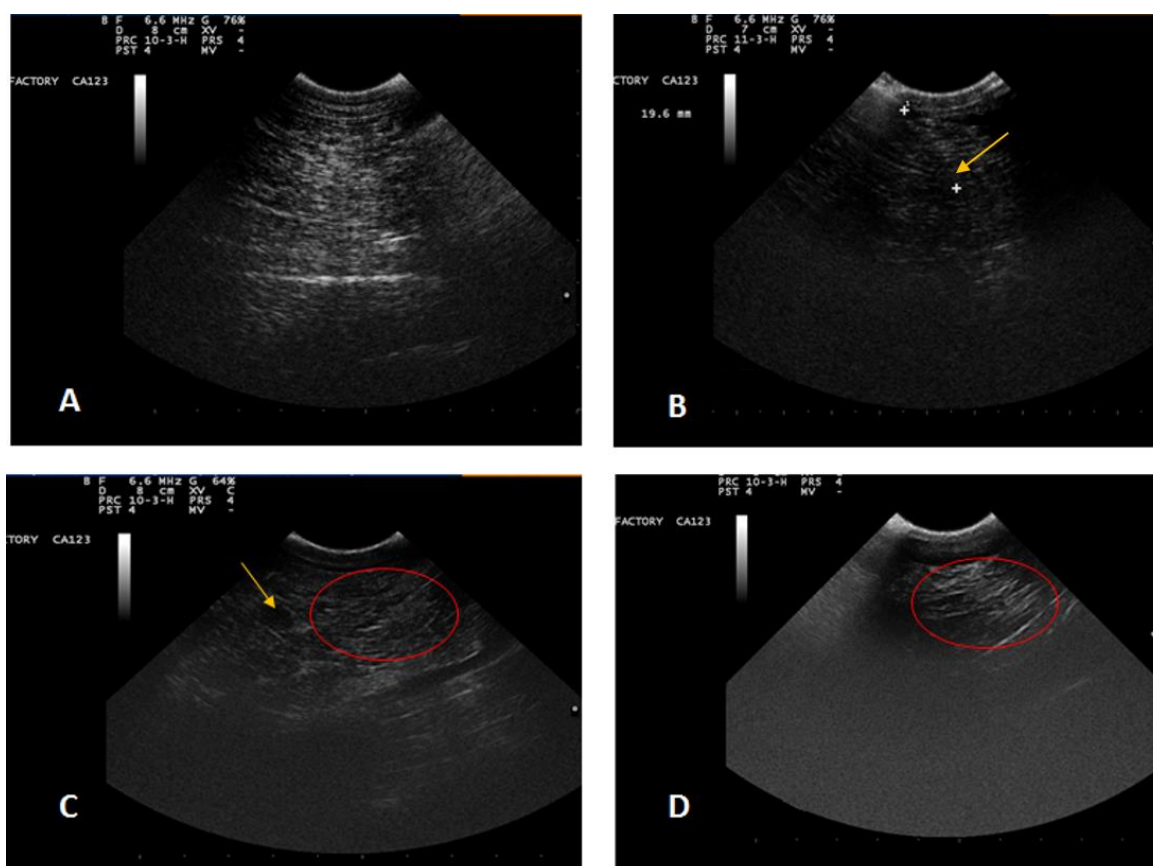


FIGURA 2. Sonogramas das éguas nos momentos D0, D2 e D7. (A) Imagem gerada no D0 referente à região a receber transplante de CTMs-CU. Observa-se a disposição das fibras musculares de um tecido íntegro. (B) Imagem da agulha (seta amarela) sendo guiada por ultrassom a uma profundidade de aproximadamente 2cm. (C) Imagem gerada no D2, musculatura com aspecto heterogêneo (elipse vermelha) e presença de regiões hipo a anecogênicas, com contornos pouco definidos e irregulares (seta amarela). (D) Imagem gerada no D7, musculatura com ecotextura heterogênea com relação ao D0, presença de discretas regiões hipoecogênicas em permeio às fibras musculares (elipse vermelha). Observa-se a reorganização das fibras musculares.

2.3.9 Biópsias musculares

A utilização da agulha tipo Bergström 6,0 (6mm) permitiu a colheita de uma quantidade representativa de tecido muscular de forma simples e efetiva. Após o procedimento, os animais apresentaram comportamento natural. Não houve formação de abscesso ou aumento de volume evidente.

2.3.10 Avaliação histológica

Os resultados referentes aos achados histológicos (infiltrado inflamatório, infiltrado neutrofílico, degeneração/necrose de miócitos e fibrose) no músculo glúteo médio superficial estão apresentados nas Tabelas 4 e 5. No grupo controle foi observado ausência de infiltrado mononuclear (mediana = 0) em todos os momentos (D2 e D7), não diferindo ($P > 0,05$) do grupo tratado em que a mediana do grau de infiltrado mononuclear foi igual a 0,5 para o D2 e 1 para o D7. Comparando os momentos, houve diferença ($P < 0,05$) apenas no parâmetro infiltrado neutrofílico do grupo tratado, entre o momento D-30 lado direito (biópsia realizada em fase pré-experimental), em que a mediana foi igual a 0,2 (grau 0) e o momento D2, em que a mediana foi igual a 0,6 (grau 1). Nas Figuras 3 e 4 observam-se fotomicrografias das biópsias em todos os momentos e grupos.

Tabela 4. Avaliação do processo inflamatório e os valores em mediana da intensidade dos achados histológicos no músculo glúteo médio superficial de equinos (infiltrado neutrofílico e infiltrado mononuclear), pelo método Hematoxilina e Eosina.

Momento	Infiltrado neutrofílico		Infiltrado mononuclear		Processo inflamatório	
	Músculo esquerdo	Músculo direito	Músculo esquerdo	Músculo direito	Músculo esquerdo	Músculo direito
D-30	0	0,2*	1	0	Discreto	Ausente
	Controle	Tratado	Controle	Tratado	Controle	Tratado
D2	0	0,6*	0	0,5	Ausente	Discreto
D7	0,3	0,6	0	1	Ausente	Discreto

Diferenças ($P < 0,05$) entre o grupo controle e tratado não foram observadas para as variáveis nos momentos estudados. *Contudo, entre o momento D-30 e D2 observou-se diferença nos valores encontrados para intensidade de infiltrado neutrofílico no grupo tratado. No momento D-30, as expressões esquerdo e direito indicam as regiões das duas biópsias realizadas nessa fase, no músculo glúteo médio superficial.

Tabela 5. Avaliação histológica representando os valores do parâmetro degeneração/necrose de miócitos em grau de intensidade na forma de mediana e o parâmetro fibrose pela presença ou ausência (0), por meio do método Hematoxilina e Eosina.

Momento	Degeneração/necrose de miócitos		Fibrose	
	Músculo esquerdo	Músculo direito	Músculo esquerdo	Músculo direito
D-30	0	0	0	0
	Controle	Tratado	Controle	Tratado
D2	0	0	0	0
D7	0	0	0	0

Diferenças ($P < 0,05$) entre os momentos não foram observadas para nenhuma das variáveis.

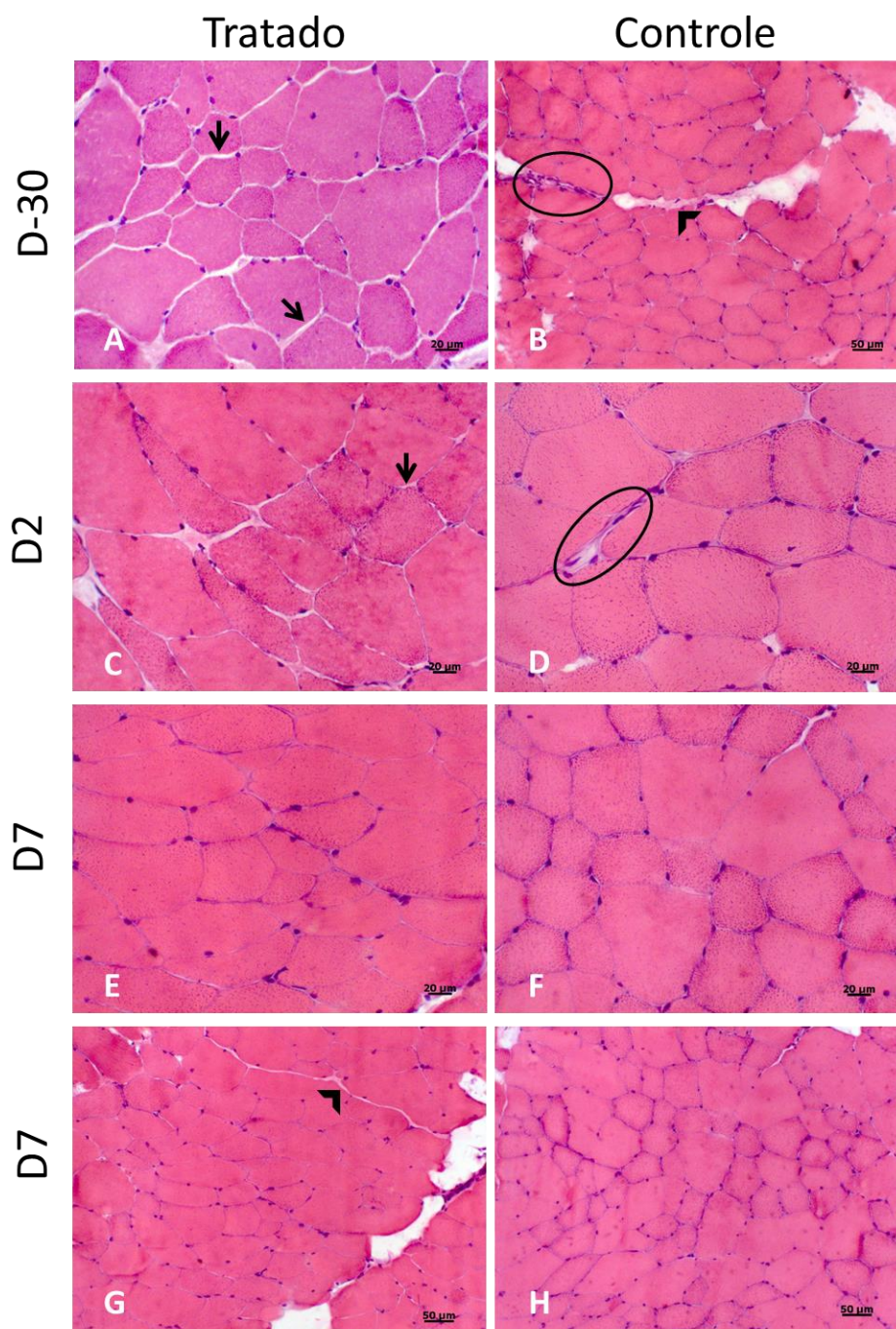


FIGURA 3. Fotomicrografias de biópsias do músculo glúteo médio superficial de equinos sem alterações histológicas nos grupos tratado e controle. As fibras musculares histologicamente preservadas exibem-se justapostas, cada uma envolvida por um endomísio (seta), organizadas em fascículos delimitados pelo perimísio (cabeça de seta). Sustentados nesta membrana, observam-se capilares sanguíneos (círculo). Não são observadas células inflamatórias ou edema por entre as fibras nos diferentes momentos, tanto no grupo tratado quanto no grupo controle. A. Momento D-30 (HE, 400x). B. Momento D-30 (HE, 200x). C. Momento D2, tratado, (HE, 400x). D. Momento D2 controle (HE, 400x). E. Momento D7, tratado (HE, 400x). F. Momento D7, controle (HE, 400x). G e H. Mesmos cortes histológicos que E e F em menor aumento (HE, 200x).

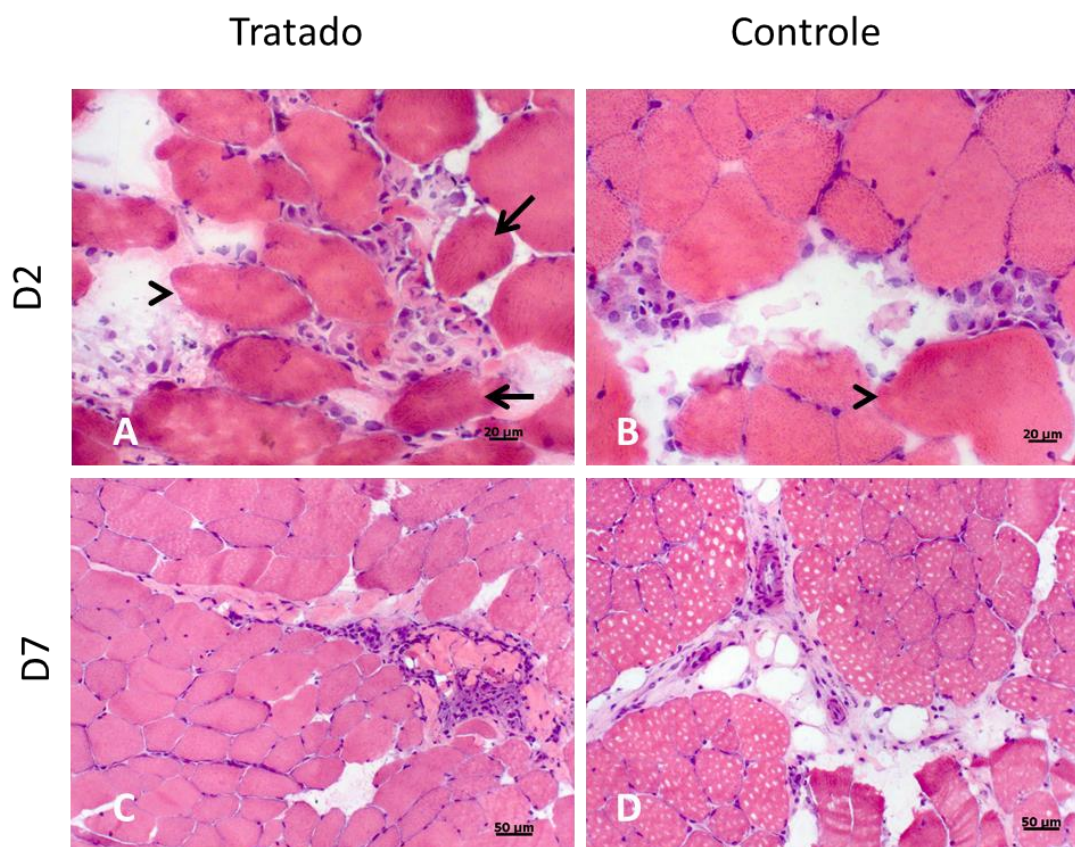


FIGURA 4. Fotomicrografias de biópsias do músculo glúteo médio superficial de equinos com processo inflamatório discreto nos grupos tratado e controle. A. Momento D2, tratado. Foco de infiltrado inflamatório composto majoritariamente por macrófagos, além de discretos neutrófilos. Nota-se degeneração (cabeça de seta) e necrose (seta) de fibras musculares, indicada pelo aumento da eosinofilia sarcoplasmática e picnose nuclear. Ainda, o edema é representado pelo espaçamento entre as fibras musculares lesionadas. HE, 400x. B. Momento D2, controle. Infiltrado inflamatório interfascicular composto por macrófagos e raros linfócitos. À direita, fibra muscular degenerada (cabeça de seta). HE, 400x. C. Momento D7, tratado. Foco inflamatório envolvendo o estroma colagenoso (perimísio). HE, 200x. D. Momento D7, controle. Fotomicrografia evidenciando infiltrado inflamatório perivascular discreto, composto por macrófagos e discretos linfócitos, associado à edema interfascicular. Os orifícios observados nas fibras musculares correspondem a formação de cristais de gelo (artefato de congelamento). HE, 200x.

2.4 Discussão

Em nosso estudo, propomos o uso de CTMs provenientes da matriz do cordão umbilical equino, precisamente, da porção intervacular distinguida por Corradetti et al. [33]. Os autores descreveram duas porções para o isolamento de CTMs, a intervacular

(ou geleia de *Wharton*) e a perivascular, sendo esta última mais intimamente próxima aos vasos que compõem o cordão umbilical.

No presente estudo, as CTMs-CU tiveram aderência ao plástico e morfologia fibroblastoide no segundo dia do cultivo e crescimento rápido permitindo a realização da primeira passagem após uma semana. Estudos que compararam o cultivo de diferentes fontes de CTMs, relataram um maior rendimento e proliferação de CTMs provenientes de tecidos sólidos como tecido do cordão umbilical e tecido adiposo [34]. Além disso, Corradetti et al. [33] mostraram que as CTMs extraídas da porção intervacular, como as utilizadas no presente estudo, são mais proliferativas que as obtidas da perivascular. Isso pode ser explicado pelo relato, em humanos, de Nanaev et al. [35] de que células mais próximas aos vasos são mais diferenciadas, enquanto as células imaturas localizadas perto da superfície amniótica, menos diferenciadas, mantem uma melhor capacidade de se proliferar.

Em razão da ausência de anticorpos específicos para equinos e à baixa reatividade dos disponíveis para outras espécies, não há um painel específico para a imunofenotipagem dos marcadores de superfície para equinos [36]. Com base no descrito por De Schauwer, et al. [37] e testado por Paebst et al. [38], a imunofenotipagem foi feita com os marcadores CD90, CD44, CD34 e MHC-II. As CTMs-CU mostraram a expressão de marcadores consistentemente expressos em outros estudos conduzidos em diversas fontes de origem mesodermal na espécie equina como o CD44 e o CD90 [39, 40, 41, 27] assim como a ausência do marcador de exclusão CD34 [33, 39, 41, 42, 43]. Na amostra após criopreservação, a baixa expressão do CD90 (9,5%) foi compatível com o exposto por Paebst et al. [38], estudo no qual os autores afirmaram que os marcadores com maior heterogeneidade são o CD90 e o CD105. Quanto ao marcador de superfície MHC-II, a expressão foi negativa (2,6% e 1,4%), o que não ocorre em outros estudos como o conduzido por Schnabel et al. [44] com CTMs derivadas de medula óssea equina, no qual os valores médios foram elevados (49,84%) em segunda passagem e o apresentado por Barberini et al. [45] para cordão umbilical de equino, no qual obteve-se baixa expressão de MCH-II ($\bar{x} = 5,9 \pm 1,8\%$). Ressalta-se que diferentemente destes estudos uma das análises imunofenotípicas apresentada no presente estudo foi conduzido ao término do cultivo primário, onde espera-se que a população celular seja ainda relativamente heterogênea.

A diferenciação em linhagens mesodermas foram bem sucedidas com o protocolo proposto. A diferenciação adipogênica foi confirmada após oito dias de exposição ao meio de diferenciação, assim como relatado por Corradetti et al. [33] também em CTMs-CU. A diferenciação osteogênica ocorreu já no décimo dia de exposição das CTMs ao meio de indução, confirmada pela forte demonstração de matriz rica em cálcio corada com Alizarim red. A boa resposta a este ensaio foi fundamentada inicialmente em estudos pilotos prévios baseados nos relatos de Toupadakis et al. [27] que observaram uma maior eficiência na diferenciação osteogênica das CTMs provenientes do CU e medula óssea de equinos após utilizar a adição de 20% de SFB no meio de indução.

A média (129) do número de colônias estimadas no ensaio de UFC-F no presente estudo foi similar à encontrada por Passeri et al. [46] (136,7) mesmo plaqueando uma menor densidade de células (aproximadamente 220 células/cm²) do que esses autores (10.0000 células/cm²). Adicionalmente, a eficiência UFC-F foi 6,45%, sendo similar às obtidas por Mensing et al. [28] em amostras de CTMs provenientes do tecido subcutâneo ($\bar{x}$ =7,59%) do masseter e inferior as evidenciadas nas amostras provenientes da região apical ($\bar{x}$ =18,45%), meio do dente ($\bar{x}$ =17,45%), região periodontal ($\bar{x}$ =13,43%) e gengiva ($\bar{x}$ =13,50%) de equinos.

Considerando a baixa densidade de CTMs-CU plaqueadas no presente estudo, além do curto período em que o ensaio de UFC-F (cinco dias) foi realizado, pode-se evidenciar que as células progenitoras provenientes da porção intervacular do cordão umbilical de equinos apresentaram, nas condições experimentais, uma excelente clonicidade e consequentemente atividade proliferativa *in vitro*.

A média da viabilidade celular (77, 71%) realizada imediatamente antes de cada transplante das CTMs-CU, no presente estudo, foi superior às observadas por Ranera et al. [47] após o primeiro dia pós descongelação em amostras de CTMs da MO (61,23%) e TA (62,75%), quinto (CTMs-MO: 38,2%) e oitavo dia (CTMs-TA: 18,72%) de cultivo mediante a avaliação da integridade de membrana com as sondas iodeto de propídio e anexina V em citômetro de fluxo. A excelente viabilidade encontrada em nosso trabalho pode ser realacionada ao meio de criopreservação utilizando 90% de SFB e 10% de DMSO que tem se mostrado mais efetivo na manutenção da viabilidade celular do que meios com outras composições [48]. A criopreservação é especialmente importante quando as CTMs são derivadas de cordão umbilical, uma vez que é um material não disponível de forma imediata e sim dependente do momento do parto.

Exames hematológicos e ultrassonográficos foram realizados de modo a complementar e consolidar as análises referentes à comprovação da baixa imunogenicidade das CTMs-CU. O tecido muscular é um dos tecidos moles mais adaptados ao exame ultrassonográfico e permite avaliar a presença de inflamação [49] demonstrada por uma imagem em que as fibras musculares se tornam hiperecogênicas e a presença de exsudato tornam os septos fibroadiposos hipoecogênicos [50]. A imagem de um músculo normal mostra as fibras musculares organizadas paralelamente como zonas hipoecogênicas e o septo fibroadiposo aparece como linhas hiperecogênicas separando as fibras dando um aspecto marmoreado.

A fáscia também é vista como hiperecogênica [49]. Em nossos achados, a avaliação feita no D2 revelou, como esperado, uma imagem sugestiva de inflamação aguda demonstrada pela desarmonia das fibras musculares e presença de regiões hipoecogênicas irregulares. Percebe-se que a inflamação gerada é referente ao trauma (inserção da agulha e injeção de pequeno volume de líquido), pois no D7 já observa-se reorganização das fibras musculares e diminuição das regiões hipoecogênicas observadas entre as fibras, indicando resolução, em andamento, da inflamação. Ademais, não houve diferença entre as regiões que receberam o transplante de CTMs-CU e as que receberam apenas HBSS, indicando que as CTMs não foram responsáveis pelas alterações encontradas.

Os parâmetros hematológicos são importantes na análise da segurança do uso de CTMs alogênicas, pois permite ser avaliada por meio da resposta leucocitária, que em casos de inflamação aguda pode resultar em alterações no leucograma. A depender da intensidade da resposta esta pode ser caracterizada por leucocitose por neutrofilia ou leucopenia por neutropenia, com ou sem desvio a esquerda e neutrófilos tóxicos. Outra forma de avaliar a resposta inflamatória é a dosagem de fibrinogênio que, por ser uma proteína de fase aguda, se eleva rapidamente em resposta a citocinas inflamatórias [51].

Nossos resultados demonstraram que o transplante local de CTMs-CU equino em tecido muscular nas condições executadas no experimento não incitaram resposta inflamatória sistêmica. Um estudo elaborado por Broeckx et al. [52] avaliou, por meio de diferentes parâmetros hematológicos, a influência da injeção intravenosa de CTMs alogênicas derivadas de sangue periférico em equinos. Como resultado, observou alteração nos valores da contagem de plaquetas, neutrófilos e níveis de cortisol no grupo tratado em relação ao grupo controle, mas não puderam afirmar que foi influência das CTMs. Em um trabalho mais recente, KOL et al. [53], fez múltiplas injeções intravenosas

de CTMs alogênicas derivadas de tecido adiposo (TA) e medula óssea. A avaliação clínica não revelou nenhum efeito adverso, assim como no exame hematológico. Porém, na dosagem, por citometria de fluxo, de linfócitos T CD8⁺ foi encontrado aumento da produção nos equinos que receberam transplante de CTMs-MO, revelando uma reação do organismo sem variação dos parâmetros clínicos considerados normais. O mesmo não ocorreu com os animais que receberam CTMs-TA, indicando que a heterogeneidade das CTMs-MO pode ter ativado a produção dessas células.

Na etapa da análise histopatológica do músculo glúteo médio superficial foi notada, isoladamente, a presença de infiltrado inflamatório, predominantemente mononuclear, em algumas amostras em todos os grupos e momentos, assim como infiltrado neutrofílico discreto. Comparando os grupos, foi observado que eles não diferiram ($P > 0,05$) entre si no grau de inflamação. Na análise entre momentos, houve diferença apenas na intensidade de infiltrado neutrofílico no momento D2, em relação ao momento D-30 (biópsia realizada em músculo íntegro) no grupo tratado. Esse resultado demonstra que, após a aplicação das CTMs-CU, houve uma inflamação discreta, detectada 48 horas depois, a qual foi cessada no momento D7.

É comum observarmos células inflamatórias após transplantes de diversos tipos desde que seja modulada. Em um estudo com transplante alogênico intra-articular de CTMs de medula óssea de equino feito por Pigott et al. [23], foi encontrada reação inflamatória após 48 horas da aplicação, mas que cessou em um intervalo entre 7 e 28 dias de forma espontânea. Os autores compararam o transplante alogênico, alogênico modificado geneticamente, xenogênico e autólogo, e apesar do grau de inflamação ter sido maior nos grupos alogênico e xenogênico, em todos os grupos foi observado um certo grau de inflamação que correspondeu à fase aguda.

Em outro estudo, similar ao presente trabalho, Carrade et al. [33] realizaram transplante de CTMs autólogas e alogênicas de cordão umbilical por via intradérmica e avaliou histologicamente o processo inflamatório 48 horas, 72 horas e 7 dias após aplicação. As análises revelaram uma leve resposta tecidual às injeções de CTMs de forma semelhante entre autólogas e alogênicas, com pico 48 horas após o transplante e que se resolveu aos 7 dias, revelando uma resposta auto-limitante.

No experimento realizado por Gala et al. [54], os autores mostraram a indução de resposta inflamatória por CTMs-MO autólogas em tecido muscular de ratos, com a hipótese de que CTMs cultivadas *in vitro* sofrem modificações fenotípicas durante a manipulação extracorpórea, se tornando imunogênicas. Esses achados da literatura

indicam que é comum a reação do organismo quando qualquer material biológico reproduzido é inserido em um animal, tanto pela presença do material quanto pela manipulação empregada, principalmente devido ao fato de não ter sido administrado nenhum tipo de anti-inflamatório geralmente utilizado nesse tipo de procedimento.

Em nosso estudo, o infiltrado inflamatório esteve presente também em amostras do grupo controle, permitindo afirmar que outros fatores que não a presença das CTMs incitaram a leve resposta, como as múltiplas injeções durante a aplicação. O infiltrado inflamatório, quando presente, era em sua maioria perivascular e focal, indicando que a resposta tecidual foi leve e se resolveria de forma independente, não inviabilizando o uso terapêutico das CTMs-CU.

O resultado da análise histológica das lâminas revelou degeneração e necrose de fibras musculares em somente um campo de apenas quatro biópsias, das 36 analisadas. Além disso, três eram do grupo controle, sendo uma no D2 e duas no D7, demonstrando que a degeneração e necrose de fibras ocorreu mesmo sem a presença das CTMs-CU. A manipulação empregada no transplante pode explicar a presença das fibras lesionadas, as quais estimularam uma reação inflamatória de células fagocíticas.

2.5 Conclusão

Pode-se concluir que as CTMs-CU não provocam inflamação no glúteo médio superficial que curse lesão tecidual ou rejeição pelo organismo do hospedeiro e que portanto, o uso destas células na terapia de lesões do músculo glúteo médio superficial é seguro e apresenta um bom potencial para utilização clínica. Além disso, não existem estudos avaliando a imunogenicidade de CTMs-CU de equinos em tecido muscular, contribuindo de forma expressiva para a pesquisa científica. Destaca-se ainda, a possibilidade de extrapolação dos nossos resultados para outras espécies, uma vez que o equino é um exemplar modelo experimental para estudos do sistema musculoesquelético.

Conflito de interesses

Os autores declaram que não tem interesses conflitantes.

Agradecimentos

À FAPESP pela bolsa de mestrado (Proc.2013/01383-0).

2.6 Referências

- [1] Ribitsch I, Burk J, Delling U, Geißler C, Gittel C, Jülke H, et al. Basic science and clinical application of stem cells in veterinary medicine. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2010;123:219–63. doi:10.1007/10_2010_66.
- [2] Voswinkel J, Francois S, Gorin N-C, Chapel A. Gastro-intestinal autoimmunity: preclinical experiences and successful therapy of fistulizing bowel diseases and gut Graft versus host disease by mesenchymal stromal cells. *Immunol Res* 2013;56:241–8. doi:10.1007/s12026-013-8397-8.
- [3] Douat ESV. Comparative study of the 1 MHz with pulse frequency repetition of 100 Hz and 16 Hz therapeutic ultrasound effect in rat tibia healing after osteotomy 2005.
- [4] Giovannini S, Brehm W, Mainil-Varlet P, Nesic D. Multilineage differentiation potential of equine blood-derived fibroblast-like cells. *Differentiation* 2008;76:118–29. doi:10.1111/j.1432-0436.2007.00207.x.
- [5] De Vita B, Lemes LC, Listoni AJ, Maia L, Freitas NPP, Landim e Alvarenga F, et al. Anexos fetais: uma fonte alternativa de células-tronco mesenquimais para a medicina veterinária equina. *Veterinária E Zootec* 2012;19:8–22.
- [6] Durando MM, Zarucco L, Schaer TP, Ross M, Reef VB. Pneumopericardium in a horse secondary to sternal bone marrow aspiration. *Equine Vet Educ* 2010;18:75–9. doi:10.1111/j.2042-3292.2006.tb00419.x.
- [7] Paterson YZ, Rash N, Garvican ER, Paillot R, Guest DJ. Equine mesenchymal stromal cells and embryo-derived stem cells are immune privileged in vitro. *Stem Cell Res Ther* 2014;5:90. doi:10.1186/scrt479.
- [8] Dyson SJ. Are mesenchymal progenitor cells set to revolutionise management of musculoskeletal injuries in the horse? *Vet J* 2013;197:533–4. doi:10.1016/j.tvjl.2013.05.018.
- [9] Cremonesi F, Corradetti B, Lange Consiglio A. Fetal adnexa derived stem cells from domestic animal: progress and perspectives. *Theriogenology* 2011;75:1400–15. doi:10.1016/j.theriogenology.2010.12.032.
- [10] Smith RK, Garvican ER, Fortier LA. The current “state of play” of regenerative medicine in horses: what the horse can tell the human. *Regen Med* 2014;9:673–85. doi:10.2217/rme.14.42.
- [11] Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation* 2003;75:389–97. doi:10.1097/01.TP.0000045055.63901.A9.

- [12] Lee JW, Fang X, Krasnodembskaya A, Howard JP, Matthay MA. Concise review: Mesenchymal stem cells for acute lung injury: role of paracrine soluble factors. *Stem Cells* 2011;29:913–9. doi:10.1002/stem.643.
- [13] Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood* 2003;101:3722–9. doi:10.1182/blood-2002-07-2104.
- [14] Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, Haynesworth SE, Ringdén O. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol* 2003;57:11–20.
- [15] Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Götherström C, Hassan M, Uzunel M, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 2004;363:1439–41. doi:10.1016/S0140-6736(04)16104-7.
- [16] Carrade DD, Affolter VK, Outerbridge CA, Watson JL, Galuppo LD, Buerchler S, et al. Intradermal injections of equine allogeneic umbilical cord-derived mesenchymal stem cells are well tolerated and do not elicit immediate or delayed hypersensitivity reactions. *Cytotherapy* 2011;13:1180–92. doi:10.3109/14653249.2011.602338.
- [17] Carrade DD, Owens SD, Galuppo LD, Vidal MA, Ferraro GL, Librach F, et al. Clinicopathologic findings following intra-articular injection of autologous and allogeneic placentally derived equine mesenchymal stem cells in horses. *Cytotherapy* 2011;13:419–30. doi:10.3109/14653249.2010.536213.
- [18] Schnabel L V, Fortier L a, McIlwraith CW, Nobert KM. Therapeutic use of stem cells in horses: which type, how, and when? *Vet J* 2013;197:570–7. doi:10.1016/j.tvjl.2013.04.018.
- [19] Helmy KY, Patel SA, Silverio K, Pliner L, Rameshwar P. Stem cells and regenerative medicine: accomplishments to date and future promise. *Ther Deliv* 2010;1:693–705. doi:10.4155/tde.10.57.
- [20] Ma S, Xie N, Li W, Yuan B, Shi Y, Wang Y. Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ* 2014;21:216–25. doi:10.1038/cdd.2013.158.
- [21] Kode JA, Mukherjee S, Joglekar M V, Hardikar AA. Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration. *Cytotherapy* 2009;11:377–91. doi:10.1080/14653240903080367.
- [22] Sohni A, Verfaillie CM. Mesenchymal stem cells migration homing and tracking. *Stem Cells Int* 2013;2013:130763. doi:10.1155/2013/130763.
- [23] Pigott JH, Ishihara a, Wellman ML, Russell DS, Bertone a L. Inflammatory effects of autologous, genetically modified autologous, allogeneic, and xenogeneic

- mesenchymal stem cells after intra-articular injection in horses. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2013;26:453–60. doi:10.3415/VCOT-13-01-0008.
- [24] Maia L, da Cruz Landim- Alvarenga F, Taffarel MO, de Moraes CN, Machado GF, Melo GD, et al. Feasibility and safety of intrathecal transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in horses. *BMC Vet Res* 2015;11:1–9. doi:10.1186/s12917-015-0361-5.
 - [25] Lovati AB, Corradetti B, Lange Consiglio A, Recordati C, Bonacina E, Bizzaro D, et al. Comparison of equine bone marrow-, umbilical cord matrix and amniotic fluid-derived progenitor cells. *Vet Res Commun* 2011;35:103–21. doi:10.1007/s11259-010-9457-3.
 - [26] Maia L, Landim-Alvarenga FC, Da Mota LSLS, De Assis Golim M, Laufer-Amorim R, De Vita B, et al. Immunophenotypic, immunocytochemistry, ultrastructural, and cytogenetic characterization of mesenchymal stem cells from equine bone marrow. *Microsc Res Tech* 2013;76:618–24. doi:10.1002/jemt.22208.
 - [27] Toupadakis CA, Wong A, Genetos DC, Cheung WK, Borjesson DL, Ferraro GL, et al. Comparison of the osteogenic potential of equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, umbilical cord blood, and umbilical cord tissue. *Am J Vet Res* 2010;71:1237–45. doi:10.2460/ajvr.71.10.1237.
 - [28] Mensing N, Gasse H, Hambruch N, Haeger J-D, Pfarrer C, Staszuk C. Isolation and characterization of multipotent mesenchymal stromal cells from the gingiva and the periodontal ligament of the horse. *BMC Vet Res* 2011;7:42. doi:10.1186/1746-6148-7-42.
 - [29] Jain NC: *Essentials of veterinary hematology*. Philadelphia: Lea & Febiger 1993, 417p
 - [30] Meyer D.J, Harvey JW. *Veterinary laboratory medicine: interpretation & diagnosis*. 2.ed. Philadelphia: Sauders, 2004. 351p
 - [31] Padilha FGF, Suma R, Amorim RM. Avaliação prática da biópsia muscular percutânea por agulha em equinos. *A Hora Veterinária* 2008, 28:29-32.
 - [32] Brasileiro JL, Fagundes DJ, Miji LON, Oshima CTF, Teruya R, Marks G, et al. Isquemia e reperfusão de músculo sóleo de ratos sob ação da pentoxifilina. *J Vasc Bras* 2007;6:50–63. doi:10.1590/S1677-54492007000100008.
 - [33] Corradetti B, Lange-Consiglio A, Barucca M, Cremonesi F, Bizzaro D. Size-sieved subpopulations of mesenchymal stem cells from intervacular and perivascular equine umbilical cord matrix. *Cell Prolif* 2011;44:330–42. doi:10.1111/j.1365-2184.2011.00759.x.
 - [34] Burk J, Ribitsch I, Gittel C, Juelke H, Kasper C, Staszuk C, et al. Growth and differentiation characteristics of equine mesenchymal stromal cells derived from different sources. *Vet J* 2013;195:98–106. doi:10.1016/j.tvjl.2012.06.004.

- [35] Nanaev AK, Kohnen G, Milovanov AP, Domogatsky SP, Kaufmann P. Stromal differentiation and architecture of the human umbilical cord. *Placenta* 1997;18:53–64. doi:10.1016/S0143-4004(97)90071-0.
- [36] Rozemuller H, Prins H-J, Naaijken B, Staal J, Bühring H-J, Martens AC. Prospective isolation of mesenchymal stem cells from multiple mammalian species using cross-reacting anti-human monoclonal antibodies. *Stem Cells Dev* 2010;19:1911–21. doi:10.1089/scd.2009.0510.
- [37] De Schauwer C, Meyer E, Van de Walle GR, Van Soom A. Markers of stemness in equine mesenchymal stem cells: a plea for uniformity. *Theriogenology* 2011;75:1431–43. doi:10.1016/j.theriogenology.2010.11.008.
- [38] Paebst F, Piehler D, Brehm W, Heller S, Schroeck C, Tárnok A, et al. Comparative immunophenotyping of equine multipotent mesenchymal stromal cells: an approach toward a standardized definition. *Cytometry A* 2014;85:678–87. doi:10.1002/cyto.a.22491.
- [39] Radcliffe CH, Flaminio MJBF, Fortier LA. Temporal analysis of equine bone marrow aspirate during establishment of putative mesenchymal progenitor cell populations. *Stem Cells Dev* 2010;19:269–82. doi:10.1089/scd.2009.0091.
- [40] Iacono E, Brunori L, Pirrone A, Pagliaro PP, Ricci F, Tazzari PL, et al. Isolation, characterization and differentiation of mesenchymal stem cells from amniotic fluid, umbilical cord blood and Wharton's jelly in the horse. *Reproduction* 2012;143:455–68. doi:10.1530/REP-10-0408.
- [41] De Schauwer C, Piepers S, Van de Walle GR, Demeyere K, Hoogewijs MK, Govaere JIJ, et al. In search for cross-reactivity to immunophenotype equine mesenchymal stromal cells by multicolor flow cytometry. *Cytometry A* 2012;81:312–23. doi:10.1002/cyto.a.22026.
- [42] Braun J, Hack A, Weis-Klemm M, Conrad S, Tremel S, Kohler K, et al. Evaluation of the osteogenic and chondrogenic differentiation capacities of equine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Am J Vet Res* 2010;71:1228–36. doi:10.2460/ajvr.71.10.1228.
- [43] Ranera B, Lyahyai J, Romero A, Vázquez FJ, Remacha AR, Bernal ML, et al. Immunophenotype and gene expression profiles of cell surface markers of mesenchymal stem cells derived from equine bone marrow and adipose tissue. *Vet Immunol Immunopathol* 2011;144:147–54. doi:10.1016/j.vetimm.2011.06.033.
- [44] Schnabel L V, Pezzanite LM, Antczak DF, Felipe MJB, Fortier L a. Equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells are heterogeneous in MHC class II expression and capable of inciting an immune response in vitro. *Stem Cell Res Ther* 2014;5:13. doi:10.1186/scrt402.
- [44] Barberini DJ, Freitas NPP, Magnoni MS, Maia L, Listoni AJ, Heckler MC, et al. Equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue and umbilical

- cord: immunophenotypic characterization and differentiation potential. *Stem Cell Res Ther* 2014;5:25. doi:10.1186/scrt414.
- [46] Passeri S, Nocchi F, Lamanna R, Lapi S, Miragliotta V, Giannessi E, et al. Isolation and expansion of equine umbilical cord-derived matrix cells (EUCMCs). *Cell Biol Int* 2009;33:100–5. doi:10.1016/j.cellbi.2008.10.012.
 - [47] Ranera B, Remach, A AR, Álvarez-Arguedas S, Romero A, Vázquez FJ, et al. Effect of hypoxia on equine mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *BMC Vet Res* 2012;8:142. doi:10.1186/1746-6148-8-142.
 - [48] Maia L, Moraes CN, Freitas-Dell'Aqua CP, Queiroz CM, Mota LSLS, Santiloni V, et al. Development of a cryopreservation protocol for equine mesenchymal stem cells obtained from umbilical cord. *J Equine Vet Sci* 2014;34:235. doi:10.1016/j.jevs.2013.10.167.
 - [49] Lew HL, Chen CPC, Wang T-G, Chew KTL. Introduction to musculoskeletal diagnostic ultrasound: examination of the upper limb. *Am J Phys Med Rehabil* 2007;86:310–21. doi:10.1097/PHM.0b013e31803839ac.
 - [50] Peetrons P. Ultrasound of muscles. *European radiology* 2002, v. 12, n. 1:35–43.
 - [51] Welles EG: Clinical Interpretation of Equine Leukograms. In: Feldman BV, Zinkl JG, Jain NC. *Schalm's Veterinary Hematology*. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000, p. 407-08.
 - [52] Broeckx S, Forier R. The Influence of Allogenic Mesenchymal Stem Cells on the Hematological Status of Horses. *J Stem Cell Res Ther* 2013;03. doi:10.4172/2157-7633.1000136.
 - [53] Kol A, Wood J a, Carrade Holt DD, Gillette J a, Bohannon-Worsley LK, Puchalski SM, et al. Multiple intravenous injections of allogeneic equine mesenchymal stem cells do not induce a systemic inflammatory response but do alter lymphocyte subsets in healthy horses. *Stem Cell Res Ther* 2015;6. doi:10.1186/s13287-015-0050-0.
 - [54] Gala K, Burdzińska A, Idziak M, Wilczek E, Paczek L. Transplantation of mesenchymal stem cells into the skeletal muscle induces cytokine generation. *Cytokine* 2013;64:243–50. doi:10.1016/j.cyto.2013.06.314.

CONCLUSÕES GERAIS

Mediante à análise imunofenotípica da expressão dos marcadores de superfície celular e diferenciação em multilinhagens, as células utilizadas no experimento foram caracterizadas como células-tronco mesenquimais, além de apresentarem negatividade ao marcador MHC-II, uma das características que explica a ausência de imunogenicidade dessas células.

O teste de clonicidade permitiu mostrar a boa capacidade das CTMs-CU em se multiplicar e gerar colônias.

Por meio dos exames hematológicos, ultrassonográficos e histológicos, pôde-se concluir que as CTMs-CU não provocam inflamação no glúteo médio superficial que curse lesão tecidual ou rejeição pelo organismo do hospedeiro e que portanto, o uso destas células na terapia de lesões do músculo glúteo médio superficial é seguro e apresenta um bom potencial para utilização clínica. Além disso, não existem estudos avaliando a imunogenicidade de CTMs-CU de equinos em tecido muscular, contribuindo de forma expressiva para a pesquisa científica. Destaca-se ainda, a possibilidade de extrapolação dos nossos resultados para outras espécies, uma vez que o equino é um exemplar modelo experimental para estudos do sistema musculoesquelético.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, J.D. A terapia celular no tratamento da isquemia crítica dos membros inferiores. **Jornal Vascular Brasileiro.**, v. 4, n. 4, p.357-365, 2005.
- ARNHOLD, S. J.; GOLETZ, I.; KLEIN, H.; STUMPF, G.; BELUCHE, L. A.; ROHDE, C.; ADDICKS, K.; LITZKE, L. F. Isolation and characterization of bone marrow-derived equine mesenchymal stem cells. **American journal of veterinary research**, v. 68, n. 10, p. 1095–105, 2007.
- BAJADA, S.; MAZACOVA, I.; RICHARDSON, J. B.; ASHAMMAKHI, N. Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. **Journal of Tissue Engineering Regenerative Medicine**, v. 2, p.169–183, 2008.
- BARBERINI, D. J.; FREITAS, N. P. P.; MAGNONI, M. S.; MAIA, L.; LISTONI, A. J.; HECKLER, M. C.; SUDANO, M. J.; GOLIM, M. A.; LANDIM-ALVARENGA, F. Equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue and umbilical cord: immunophenotypic characterization and differentiation potential. **Stem cell research & therapy**, v. 5, n. 1, p. 25, 2014.
- BARRY, F.P.; MURPHY, J. M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, p. 568–584, 2004.
- BARTHOLOMEW, A.; STURGEON, C.; SIATSKAS, M.; FERRER, K.; MCINTOSH, K.; PATIL, S.; HARDY, W.; DEVINE, S.; UCKER, D.; DEANS, R.; MOSELEY, A.; HOFFMAN, R. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. **Experimental hematology**, v. 30, n. 1, p. 42–8, 2002.
- BECKER, A. J.; MCCCULLOCH, E. A.; TILL, J. E. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. **Nature**, v. 197, p.452–454, 1963.
- BJORNSON, C. R.; RIETZE, R. L.; REYNOLDS, B. A.; MAGLI, M. C.; VESCOVI, A. L. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. **Science**, v. 283, p. 534-537, Jan.1999.
- BRAUN, J.; HACK, A.; WEIS-KLEMM, M.; CONRAD, S.; TREML, S.; KOHLER, K.; WALLISER, U.; SKUTELLA, T.; AICHER, W. K. Evaluation of the osteogenic and chondrogenic differentiation capacities of equine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. **American journal of veterinary research**, v. 71, n. 10, p. 1228–36, 2010.
- BUHRMANN, C.; MOBASHERI, A.; MATIS, U.; SHAKIBAEI, M. Curcumin mediated suppression of nuclear factor- κ B promotes chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells in a high-density co-culture microenvironment. **Arthritis research & therapy**, v. 12, n. 4, p. R127, 2010.

CARRADE, D. D.; AFFOLTER, V. K.; OUTERBRIDGE, C. A.; WATSON, J. L.; GALUPO, L. D.; BUERCHLER, S.; KUMAR, V.; WALKER, N. J.; BORJESSON, D. L. Intradermal injections of equine allogeneic umbilical cord-derived mesenchymal stem cells are well tolerated and do not elicit immediate or delayed hypersensitivity reactions. **Cytotherapy**, v. 13, n. 10, p. 1180–92, 2011a.

CARRADE, D. D.; OWENS, S. D.; GALUPPO, L. D.; VIDAL, M. A.; FERRARO, G. L.; LIBRACH, F.; BUERCHLER, S.; FRIEDMAN, M. S.; WALKER, N. J.; BORJESSON, D. L. Clinicopathologic findings following intra-articular injection of autologous and allogeneic placentally derived equine mesenchymal stem cells in horses. **Cytotherapy**, v. 13, n. 4, p. 419–30, 2011b.

CARRADE, D. D.; LAME, M. W.; KENT, M. S.; CLARK, K. C.; WALKER, N. J.; BORJESSON, D. L. Comparative Analysis of the Immunomodulatory Properties of Equine Adult-Derived Mesenchymal Stem Cells. **Cell medicine**, v. 4, n. 1, p. 1–11, 2012.

CARRADE HOLT, D. D.; WOOD, J. A.; GRANICK, J. L.; WALKER, N. J.; CLARK, K. C.; BORJESSON, D. L. Equine mesenchymal stem cells inhibit T cell proliferation through different mechanisms depending on tissue source. **Stem cells and development**, v. 23, n. 11, p. 1258–65, 2014.

CASTILLO, M. D.; TRZASKA, K. A.; GRECO, S. J.; PONZIO, N. M.; RAMESHWAR, P. Immunostimulatory effects of mesenchymal stem cell-derived neurons: implications for stem cell therapy in allogeneic transplantations. **Clinical and Translational Science**, v.1, p. 27–34, 2008.

CHIDGEY, A. P.; LAYTON, D.; TROUNSON, A.; BOYD, R. L. Tolerance strategies for stem-cell-based therapies. **Nature**, v. 453, n. 7193, p. 330–7, 2008. Nature Publishing Group.

CLARKE, D. L.; JOHANSSON, C. B.; WILBERTZ, J.; VERESS, B.; NILSSON, E.; KARLSTROM, H.; LENDAHL, U.; FRISÉN, J. Generalized potential of adult neural stem cells. **Science**, v. 288, p.1660-1663, Junho. 2000.

CORCIONE, A.; BENVENUTO, F.; FERRETTI, E.; GIUNTI, D.; CAPPIELLO, V.; CAZZANTI, F.; RISSO, M.; GUALANDI, F.; MANCARDI, G. L. PISTOIA, V.; UCCELLI, A. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. **Blood**, v. 107, n. 1, p. 367–72, 2006.

CORRADETTI, B.; LANGE-CONSIGLIO, A.; BARUCCA, M.; CREMONESI, F.; BIZZARO, D. Size-sieved subpopulations of mesenchymal stem cells from intervacular and perivascular equine umbilical cord matrix. **Cell proliferation**, v. 44, n. 4, p. 330–42, 2011.

CORSELLI, M.; CHEN, C. W.; CRISAN, M.; LAZZARI, L.; PÉAULT, B. Perivascular ancestors of adult multipotent stem cells. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 30, n. 6, p. 1104–9, 2010.

CREMONESI, F.; CORRADETTI, B.; LANGE, C. A. Fetal adnexa derived stem cells from domestic animals: progress and perspectives. **Theriogenology**, v. 75, p. 1400-1415, 2011.

CRISAN, M.; YAP, S.; CASTEILLA, L.; CHEN, C. W.; CORSELLI, M.; PARK, T. S.; ANDRIOLO, G.; SUN, B.; ZHENG, B.; ZHANG, L.; NOROTTE, C.; TENG, P. N.; TRAAS, J.; SCHUGAR, R.; DEASY, B. M.; BADYLAK, S.; BUHRING, H. J.; GIACOBINO, J. P.; LAZZARI, L.; HUARD, J.; PÉAULT, B. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. **Cell stem cell**, v. 3, n. 3, p. 301-13, 2008. Elsevier.

CROP, M. J.; BAAN, C. C.; KOREVAAR, S. S.; JIZERMANS, J. N. M.; ALWAYN, I. P. J.; WEIMAR, W.; HOOGDUIJN, M. J. Donor-derived mesenchymal stem cells suppress alloreactivity of kidney transplant patients. **Transplantation**, v. 87, n. 6, p. 896-906, 2009.

CSAKI, C.; MOBASHERI, A.; SHAKIBAEI, M. Synergistic chondroprotective effects of curcumin and resveratrol in human articular chondrocytes: inhibition of IL-1 β -induced NF-kappaB-mediated inflammation and apoptosis. **Arthritis research & therapy**, v. 11, n. 6, p. R165, 2009.

DE SCHAUWER, C.; MEYER, E.; VAN DE WALLE, G. R.; SOOM, A. VAN. Markers of stemness in equine mesenchymal stem cells: a plea for uniformity. **Theriogenology**, v. 75, n. 8, p. 1431-43, 2011.

DE SCHAUWER, C.; PIEPERS, S.; VAN DE WALLE, G. R.; DEMEYERE, K.; HOOGEWIJS, M. K.; GOVAERE, J. L. J.; BRAECKMANS, K.; VAN SOOM, A.; MEYER, E. In search for cross-reactivity to immunophenotype equine mesenchymal stromal cells by multicolor flow cytometry. **Cytometry. Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology**, v. 81, n. 4, p. 312-23, 2012.

DE VITA, B. Anexos fetais: uma fonte alternativa de células-tronco mesenquimais para a medicina veterinária equina. **Veterinária e Zootecnia**, v. 19, p. 008-022, 2012.

DI NICOLA, M.; CARLO-STELLA, C.; MAGNI, M.; MILANESI, M.; LONGONI, P. D.; MATTEUCCI, P.; GRISANTI, S.; GIANNI, A. M. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. **Blood**, v. 99, n. 10, p. 3838-43, 2002.

DOMINICI, M.; BLANC, K. LE; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F. C.; KRAUSE, D. S.; DEANS, R. J.; KEATING, A.; PROCKOP, D. J.; HORWITZ, E. M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-7, 2006.

DOUAT, E. S. V. Estudo comparativo do efeito do ultrassom terapêutico 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. 2001.

DURANDO, M. M.; ZARUCCO, L.; SCHAER, T. P.; ROSS, M.; REEF, V. B. Pneumopericardium in a horse secondary to sternal bone marrow aspiration. **Equine Veterinary Education**, v. 18, n. 2, p. 75–79, 2010.

DYSON, S. J. Are mesenchymal progenitor cells set to revolutionise management of musculoskeletal injuries in the horse? **Veterinary journal**, v. 197, n. 3, p. 533–4, 2013. Elsevier Ltd.

EGGENHOFER, E.; LUK, F.; DAHLKE, M. H.; HOOGDUIJN, M. J. The life and fate of mesenchymal stem cells. **Frontiers in immunology**, v. 5, n. May, p. 148, 2014.

EMING, S. A.; KRIEG, T.; DAVIDSON, J. M. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. **The Journal of investigative dermatology**, v. 127, n. 3, p. 514–25, 2007.

FELSON, D. T. Developments in the clinical understanding of osteoarthritis. **Arthritis research & therapy**, v. 11, n. 1, p. 203, 2009.

FIGUEIREDO, M. D.; SALTER, C. E.; ANDRIETTI, A. L. P.; VANDENPLANS, M. L.; HURLEY, D. J.; MOORE, J. N. Validation of a reliable set of primer pairs for measuring gene expression by real-time quantitative RT-PCR in equine leukocytes. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 131, n. 1-2, p. 65–72, 2009.

FORRAZ, N.; MCGUCKIN, C.P. The umbilical cord: a rich and ethical stem cell source to advance regenerative medicine. **Cell Proliferation**, v. 44, suppl.1, p. 60-69, 2010.

FREITAS, N. P. P. Inoculação de células-tronco mesenquimais autólogas e alogênicas, provenientes da medula óssea, em tecido muscular de equinos. 2012. 77f. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo.

GIACCA, M.; ZACCHIGNA, S. VEGF gene therapy: therapeutic angiogenesis in the clinic and beyond. **Gene therapy**, v. 19, n. 6, p. 622–9, 2012.

GIOVANNINI, S.; BREHM, W.; MAINIL-VARLET, P.; NESIC, D. Multilineage differentiation potential of equine blood-derived fibroblast-like cells. **Differentiation; research in biological diversity**, v. 76, n. 2, p. 118–29, 2008.

HASS, R.; KASPER, C.; BÖHM, S.; JACOBS, R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. **Cell communication and signaling**, v. 9, n. 1, p. 12, 2011. BioMed Central Ltd.

HELMY, K. Y.; PATEL, S. A.; SILVERIO, K.; LILLIAN, P.; RAMESHWAR, P. Stem cells and regenerative medicine: accomplishments to date and future promise. **Therapeutic Delivery**, v. 1, n. 5, p. 693-705, 2010.

HORWITZ, E. M.; PROCKOP, D. J.; FITZPATRICK, L. A.; KOO, W. W.; GORDON, P. L.; NELL, M.; SUSSMAN, M.; ORCHARD, P.; MARX, J. C.; PYERITZ, R. E.; BRENNER, M. K. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. **Nature medicine**, v. 5, n. 3, p. 309–13, 1999.

HOYNOWSKI, S. M.; FRY, M. M.; GARDNER, B. M.; LEMING, M. T.; TUCKER, J. R.; BLACK, L.; SAND, T.; MITCHELL, K. E. Characterization and differentiation of equine umbilical cord-derived matrix cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 362, n. 2, p. 347–53, 2007.

HUNG, S. P.; YANG, M. H.; TSENG, K. F.; LEE, O. K. Hypoxia-induced secretion of TGF- β 1 in mesenchymal stem cell promotes breast cancer cell progression. **Cell transplantation**, v. 22, n. 10, p. 1869–82, 2013.

IACONO, E.; BRUNORI, L.; PIRRONE, A.; PAGLIARO, P. P.; RICCI, F.; TAZZARI, P. L.; MERLO, B. Isolation, characterization and differentiation of mesenchymal stem cells from amniotic fluid, umbilical cord blood and Wharton's jelly in the horse. **Reproduction**, v. 143, n. 4, p. 455–68, 2012.

INOUE, S.; POPP, F. C.; KOEHL, G. E.; PISO, P.; SCHITT, H. J.; GEISLER, E. K.; DAHLKE, M. H. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells in a rat organ transplant model. **Transplantation**, v. 81, n. 11, p. 1589–95, 2006.

JIANG, X. X.; ZHANG, Y.; LIU, B.; ZHANG, S. X.; WU, Y.; YU, X. D.; MAO, N. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. **Blood**, v. 105, n. 10, p. 4120–6, 2005.

KANG, J. G.; PARK, S. B.; SEO, M. S.; KIM, H. S.; CHAE, J. S.; KANG, K. S. Characterization and clinical application of mesenchymal stem cells from equine umbilical cord blood. **Journal of Veterinary Science**, v. 14, n. 3, p. 367, 2013.

KISIDAY, J. D.; KOPESKY, P. W.; EVANS, C. H.; GRODZINSKY, A. L.; MCILWRAITH, C. W.; FRISBIE, D. D. Evaluation of adult equine bone marrow- and adipose-derived progenitor cell chondrogenesis in hydrogel cultures. **Journal of orthopaedic research**, v. 26, n. 3, p. 322–31, 2008.

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.

KRAMPERA, M.; GLENNIE, S.; DYSON, J.; SCOTT, D.; LAYLOR, R.; SIMPSON, E.; DAZZI, F. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. **Blood**, v. 101, n. 9, p. 3722–9, 2003.

LAZARUS, H. M.; KOC, O. N.; DEVINE, S. M.; CURTIN, P.; MAZIARZ, R. T.; HOLLAND, H. K.; SHPALL, E. J.; MCCARTHY, P.; ATKINSON, K.; COOPER, B. W.; GERSON, S. L.; LAUGHLIN, M. J.; LOBERIZA, F. R.; MOSELEY, A. B.; BACIGALUPO, A. Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. **Biology of blood and marrow transplantation**, 11, n. 5, p. 389–98, 2005.

LE BLANC, K.; TAMMIK, L.; SUNDBERG, B.; HAYNESWORTH, S. E.; RINGDÉN, O. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. **Scandinavian journal of immunology**, v. 57, n. 1, p. 11–20, 2003.

LE BLANC, K.; RASMUSSEN, I.; SUNDBERG, B.; GOTHERSTROM, C.; HASSAN, M.; UZUNEL, M.; RINGDÉN, O. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. **The Lancet**, v. 363, n. 9419, p. 1439–41, 2004.

LE BLANC, K.; FRASSONI, F.; BALL, L.; LOCATELLI, F.; ROELOFS, H.; LEWIS, I.; LANINO, E.; SUNDBERG, B.; BERNARDO, M. E.; REMBERGER, M.; DINI, G.; EGELER, R. M.; BACIGALUPO, A.; FIBBE, W. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. **The Lancet**, v. 371, n. 9624, p. 1579–86, 2008.

LEE, J. W.; FANG, X.; KRASNODEMBSKAYA, A.; HOWARD, J. P.; MATTHAY, M. A. Concise review: Mesenchymal stem cells for acute lung injury: role of paracrine soluble factors. **Stem cells**, v. 29, n. 6, p. 913–9, 2011.

LIU, Y.; MU, R.; WANG, S.; LONG, L.; LIU, X.; LI, R.; SUN, J.; GUO, J.; ZHANG, X.; GUO, J.; YU, P.; LI, C.; LIU, X.; HUANG, Z.; WANG, D.; LI, H.; GU, Z.; LIU, B.; LI, Z.. Therapeutic potential of human umbilical cord mesenchymal stem cells in the treatment of rheumatoid arthritis. **Arthritis research & therapy**, v. 12, n. 6, p. R210, 2010.

LOON, V. J. F. VAN; SCHEFFER, C. J. W.; GENN, H. J.; HOOGENDOORN, A. C.; GREVE, J. W. Clinical follow-up of horses treated with allogeneic equine mesenchymal stem cells derived from umbilical cord blood for different tendon and ligament disorders. **The Veterinary quarterly**, , n. September 2014, p. 1–6, 2014.

LUSTER, A. D.; ALON, R.; ANDRIAN, U. H. VON. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. **Nature immunology**, v. 6, n. 12, p. 1182–90, 2005.

MA, S.; XIE, N.; LI, W.; YUAN, B.; SHI, Y.; WANG, Y. Immunobiology of mesenchymal stem cells. **Cell death and differentiation**, v. 21, n. 2, p. 216–25, 2014.

- MAIA, L.; CRUZ LANDIM- ALVARENGA, F. DA; TAFFAREL, M. O.; et al. Feasibility and safety of intrathecal transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in horses. **BMC Veterinary Research**, v. 11, n. 1, p. 1–9, 2015.
- MARRIOTT, M. P.; EMERY, B.; CATE, H. S.; BINDER, M. D.; KEMPER, D.; WU, Q.; KOLBE, S.; GORDON, I. R.; WANG, H.; EGAN, G.; MURRAY, S.; BUTZKUEVEN, H.; KILPATRICK, T. J. Leukemia inhibitory factor signaling modulates both central nervous system demyelination and myelin repair. **Glia**, v. 56, n. 6, p. 686–98, 2008.
- MONTEIRO, B. S.; NETO, N. M. A.; DEL CARLO, R. J. Células-tronco mesenquimais. **Ciência Rural**, v.40, p. 238-245, 2010.
- NARDI, N. B. Células-tronco: fatos, ficção e futuro. **Genética na Escola.**, p. 25-29, 2007.
- NAUTA, A. J.; FIBBE, W. E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stroma cells. **Blood**, v. 110, n.10, p. 3499-3506, 2007.
- NÉMETH, K.; LEELAHAVANICHKUL, A.; YUEN, P. S. T.; MAYER, B.; PARMELEE, A.; DOI, K.; ROBEY, P. G.; LEELAHAVANICHKUL, K.; KOLLER, B. H.; BROWN, J. M.; HU, X.; JELINEK, I.; STAR, R. A. MEZEY, E. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. **Nature medicine**, v. 15, n. 1, p. 42–9, 2009.
- NEWMAN, R. E.; YOO, D.; LEROUX, M. A.; DANILKOVITCH-MIAGKOVA, A. Treatment of inflammatory diseases with mesenchymal stem cells. **Inflammation & allergy drug targets**, v. 8, n. 2, p. 110–23, 2009.
- OTSURU, S.; GORDON, P. L.; SHIMONO, K.; JETHVA, R.; MARINO, R.; PHILLIPS, C. L.; HOFMANN, T. J.; VERONESI, E.; DOMINICI, M.; IWAMOTO, M. HORWITZ, E. M. Transplanted bone marrow mononuclear cells and MSCs impart clinical benefit to children with osteogenesis imperfecta through different mechanisms. **Blood**, v. 120, n. 9, p. 1933–41, 2012.
- PAEBST, F.; PIEHLER, D.; BREHM, W.; HELLER, S.; SCHROECK, C.; TÁRNOK, A.; BURK, J. Comparative immunophenotyping of equine multipotent mesenchymal stromal cells: an approach toward a standardized definition. **Cytometry**, v. 85, n. 8, p. 678–87, 2014.
- PASCUCCI, L.; MERCATI, F.; MARINI, C.; CECCARELLI, P.; DALL'AGLIO, C.; PEDINI, V.; GARGIULO, A. M. Ultrastructural morphology of equine adipose-derived mesenchymal stem cells. **Histology and histopathology**, v. 25, n. 10, p. 1277–85, 2010.
- PATERSON, Y. Z.; RASH, N.; GARVICAN, E. R.; PAILLOT, R.; GUEST, D. J. Equine mesenchymal stromal cells and embryo-derived stem cells are immune privileged in vitro. **Stem cell research & therapy**, v. 5, n. 4, p. 90, 2014.

PENNY, J.; HARRIS, P.; SHAKESHEFF, K.; MOBASHERI, A. The biology of equine mesenchymal stem cells: phenotypic characterization, cell surface markers and multilineage differentiation. **Frontiers in Bioscience**, v. 17, n. 7, p. 892–908, 2012.

PIGOTT, J. H.; ISHIHARA, A; WELLMAN, M. L.; RUSSELL, D. S.; BERTONE, A L. Inflammatory effects of autologous, genetically modified autologous, allogeneic, and xenogeneic mesenchymal stem cells after intra-articular injection in horses. **Veterinary and comparative orthopaedics and traumatology**, v. 26, n. 6, p. 453–60, 2013.

RADCLIFFE, C. H.; FLAMINIO, M. J. B. F.; FORTIER, L. A. Temporal analysis of equine bone marrow aspirate during establishment of putative mesenchymal progenitor cell populations. **Stem cells and development**, v. 19, n. 2, p. 269–82, 2010.

RANERA, B.; LYAHYAI, J.; ROMERO, A.; VÁZQUEZ, F. J.; REMACHA, A. R.; BERNAL, M, L.; ZARAGOZA, P.; RODELLAR, C.; MARTÍN-BURRIEI, I. Immunophenotype and gene expression profiles of cell surface markers of mesenchymal stem cells derived from equine bone marrow and adipose tissue. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 144, n. 1-2, p. 147–54, 2011.

REED, S. A.; JOHNSON, S. E. Equine umbilical cord blood contains a population of stem cells that express Oct4 and differentiate into mesodermal and endodermal cell types. **Journal of cellular physiology**, v. 215, n. 2, p. 329–36, 2008.

RESENDE, M. A. Miosites no cavalo atleta. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DO CAVALO ATLETA, 2., 2005, Belo Horizonte, MG. Anais, Belo Horizonte, 2005. p. 56-75.

RIBITSCH, I.; BURK, J.; DELLING, U.; GEIBLER, C.; GITTEL, C.; JULKE, H.; BRHEM, W.; Basic Science and Clinical Application of Stem Cells in Veterinary Medicine. **Advances in Biochemical Engineering**, v.123, p. 219-63, 2010.

RICHARDSON, L. E.; DUDHIA, J.; CLEGG, P. D.; SMITH, R. Stem cells in veterinary medicine--attempts at regenerating equine tendon after injury. **Trends in biotechnology**, v. 25, n. 9, p. 409–16, 2007a.

RICHARDSON, S. M.; MOBASHERI, A.; FREEMONT, A. J.; HOYLAND, J. A. Intervertebral disc biology, degeneration and novel tissue engineering and regenerative medicine therapies. **Histology and histopathology**, v. 22, n. 9, p. 1033–41, 2007b.

ROITT, I. *Imunologia*. 5.ed. São Paulo: Manole, 1999.

ROSLER, E. S.; FISK, G. J.; ARES X.; ARES, X.; IRVING, J.; MIURA, T.; RAO, M. S.; CARPENTE, M. K. Long-term culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions. **Developmental Dynamics**, v. 229, p. 259–274, 2004.

ROSSIGNOL, J.; BOYER, C.; THINARD, R.; REMY, S.; DUGAST, A. S.; DUBAYLE, D.; DEY, N. D.; BOEFFARD, F.; DELECRIN, J.; HEYMANN, D.; VANHOVE, B.; ANEGON, I.; NAVEILHAN, P.; DUNBAR, G. L.; LESCAUDRON, L. Mesenchymal stem cells induce a weak immune response in the rat striatum after allo or xenotransplantation. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, n.13, p. 2547–2558, 2009.

ROZEMULLER, H.; PRINS, H-J.; NAAIJKENS, B.; STAAL, J.; BÜHRING, H-J.; MARTENS, A. C. Prospective isolation of mesenchymal stem cells from multiple mammalian species using cross-reacting antihuman monoclonal antibodies. **Stem Cells and Development**, n. 10, p. 1089, 2010.

SCHNABEL, L. V; FORTIER, L. A; MCILWRAITH, C. W.; NOBERT, K. M. Therapeutic use of stem cells in horses: which type, how, and when? **Veterinary journal**, v. 197, n. 3, p. 570–7, 2013. Elsevier Ltd.

SHI, Y.; HU, G.; SU, J.; LI, W.; CHEN, Q.; SHOU, P.; XU, C.; CHEN, X.; HUANG, Y.; ZHU, Z.; HUANG, X.; HAN, X.; XIE, N.; REN, G. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair. **Cell research**, v. 20, n. 5, p. 510–8, 2010. Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences.

SHI, Y.; SU, J.; ROBERTS, A. I.; SHOU, P.; RABSON, A. B.; REN, G. How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses. **Trends in immunology**, v. 33, n. 3, p. 136–43, 2012.

SMITH, R. K. W.; WERLING, N. J.; DAKIN, S. G.; DAKIN, S. G.; ALAM, R.; GOODSHIP, A. E.; DUDHIA, J. Beneficial effects of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells in naturally occurring tendinopathy. **PloS one**, v. 8, n. 9, p. e75697, 2013.

SOHNI, A.; VERFAILLIE, C. M. Mesenchymal stem cells migration homing and tracking. **Stem cells international**, v. 2013, p. 130763, 2013.

SOTIROPOULOU, P. A.; PEREZ, S. A.; GRITZAPIS, A. D.; BAXEVANIS, C. N.; PAPAMICHAIL, M. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. **Stem cells**, v. 24, n. 1, p. 74–85, 2006.

SPAGGIARI, G. M.; CAPOBIANCO, A.; BECCHETTI, S.; MINGARI, M. C.; MORETTA, L. Mesenchymal stem cell natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood*, v. 107, p. 1484–1490, 2006.

SVOBODOVA, E.; KRULOVA, M.; ZAJICOVA, A.; POKORNA, K.; PROCHAZKOVA, J.; TROSAN, P.; HOLAN, V. The role of mouse mesenchymal stem cells in differentiation of naive T-cells into anti-inflammatory regulatory T-cell or proinflammatory helper T-cell 17 population. **Stem cells and development**, v. 21, n. 6, p. 901–10, 2012.

TSE, W. T.; PENDLETON, J. D.; BEYER, W. M.; EGALKA, M. C.; GUINAN, E. C. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. **Transplantation**, v. 75, n. 3, p. 389–97, 2003.

TYNDALL, A.; WALKER, U. A.; COPE, A.; DAZZI, F.; DE, B. C.; FIBBE, W.; GUIDUCCI, S.; JONES, S.; JORGENSEN, C.; LE BLANC, K.; LUYTEN, F.; MCGONAGLE, D.; MARTIN, I.; BOCELLI-TYNDALL, C.; PENNESI, G.; PITOIA, V.; PITZALIS, C.; UCCELLI, A.; WULFFRAAT, N.; FELDMANN, M. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells: a review based on an interdisciplinary meeting held at the Kennedy Institute of Rheumatology Division. **Arthritis Research & Therapy**, London, p. 301, 2007.

UCCELLI, A.; MORETTA, L.; PISTOIA, V. Mesenchymal stem cells in health and disease. **Nature reviews. Immunology**, v. 8, n. 9, p. 726–36, 2008. Nature Publishing Group.

VARANDA, L. F. O. Células-tronco mesenquimais provenientes da medula óssea na reparação de falhas ósseas experimentais no osso IV metacarpiano de equinos. 2012. 82f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília, Brasília, DF. 2011.

VIOLINI, S.; RAMELLI, P.; PISANI, L. F.; GORNI, C.; MARIANI, P. Horse bone marrow mesenchymal stem cells express embryo stem cell markers and show the ability for tenogenic differentiation by in vitro exposure to BMP-12. **BMC cell biology**, v. 10, p. 29, 2009.

VOSWINKEL, J.; FRANCOIS, S.; GORIN, N-C.; CHAPEL, A. Gastro-intestinal autoimmunity: preclinical experiences and successful therapy of fistulizing bowel diseases and gut Graft versus host disease by mesenchymal stromal cells. **Immunologic Research**, p. 1-8, 2013.

WAN, C. D.; CHENG, R.; WANG, H. B.; LIU, T. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells derived from adipose tissues in a rat orthotopic liver transplantation model. **Hepatobiliary & pancreatic diseases international**, v. 7, n. 1, p. 29–33, 2008.

ZHANG, W.; QIN, C.; ZHOU, Z. M. Mesenchymal stem cells modulate immune responses combined with cyclosporine in a rat renal transplantation model. **Transplantation Proceedings**, v. 39, p. 3404–3408, 2007.

ANEXO 1

- **Material e métodos**

- **Isolamento e cultivo das CTMs-CU**

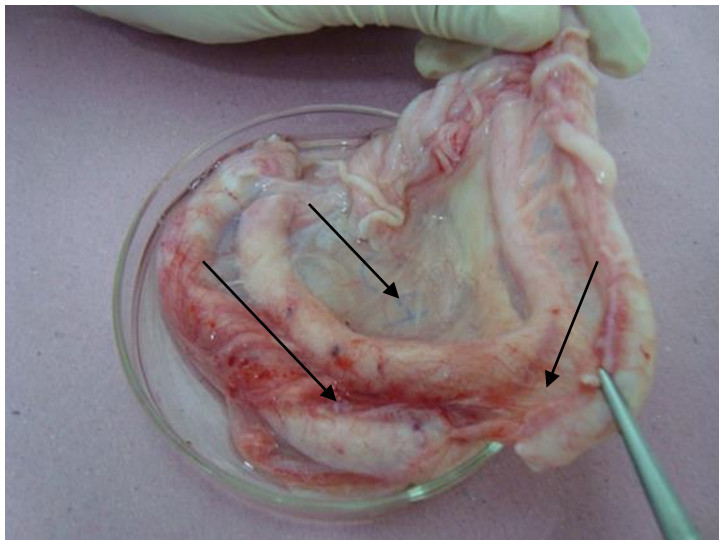


FIGURA 5. Amostra de cordão umbilical equino coletada para isolamento de CTMs. Nota-se a presença dos vasos sanguíneos e tecido intervascular (setas).

- **Transplante celular**



FIGURA 6. Momento do transplante de CTMs-CU no músculo glúteo médio superficial equino. (A) Agulha sendo guiada por aparelho de ultrassonografia. (B) Aplicação da suspensão de CTMs-CU no local guiado pelo aparelho de ultrassom.

- **Biópsias musculares**



FIGURA 7. Etapas da realização da biópsia muscular. (A) Introdução da agulha de biópsia na incisão feita. (B) Fragmento muscular colhido, no lúmen da agulha. (C) Fragmento do músculo sendo envolvido por talco neutro. (D) Criopreservação do fragmento em nitrogênio líquido.

- **Resultados**

- **Caracterização imunofenotípica**

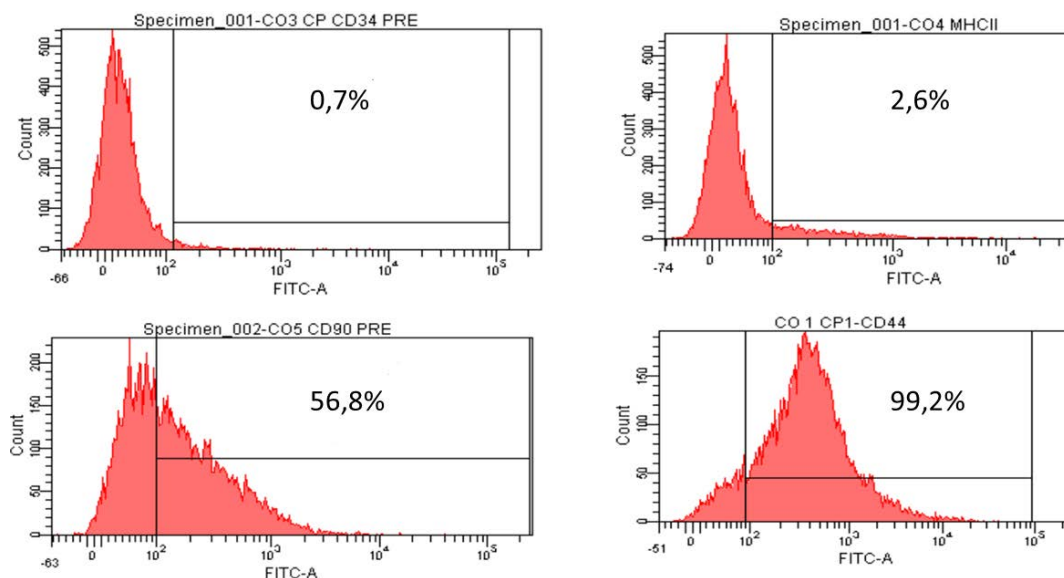


FIGURA 8. Histogramas representando o perfil imunofenotípico das CTMs-CU a fresco em cultivo primário. Foram avaliados, por citometria de fluxo, os marcadores de superfície celular CD 34, MHC-II, CD 90 e CD 44 conjugados com FITC.

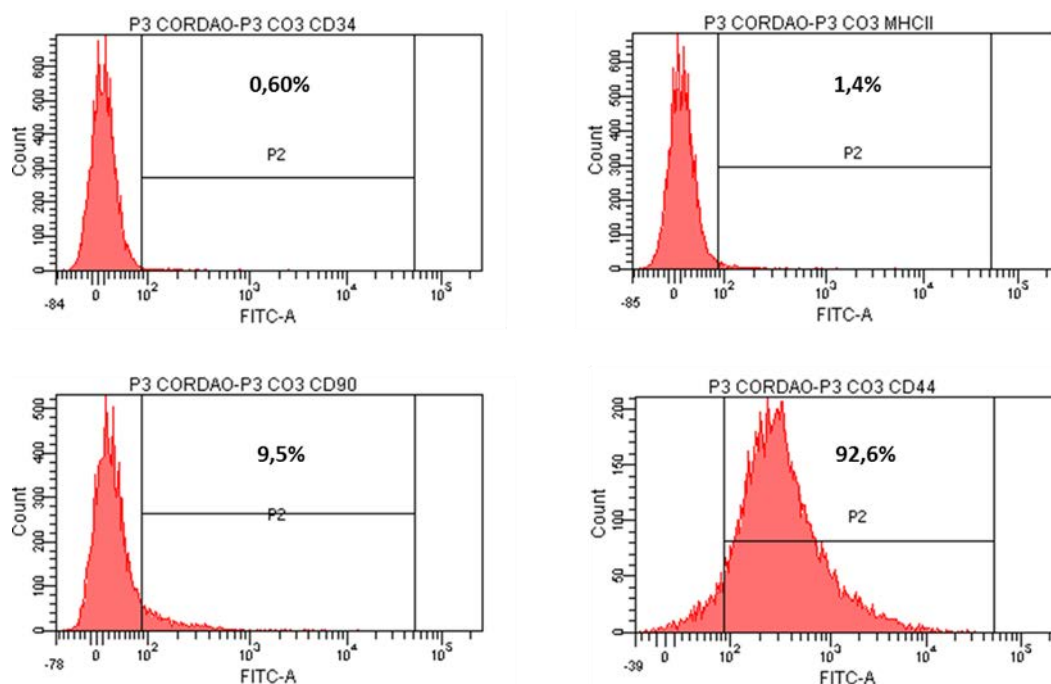


FIGURA 9. Histogramas representando o perfil imunofenotípico das CTMs-CU em terceira passagem após descongelamento. Foram avaliados, por citometria de fluxo, os marcadores de superfície celular CD 34, MHC-II, CD 90 e CD 44 conjugados com FITC.

- **Potencial de diferenciação em linhagens mesodermas**

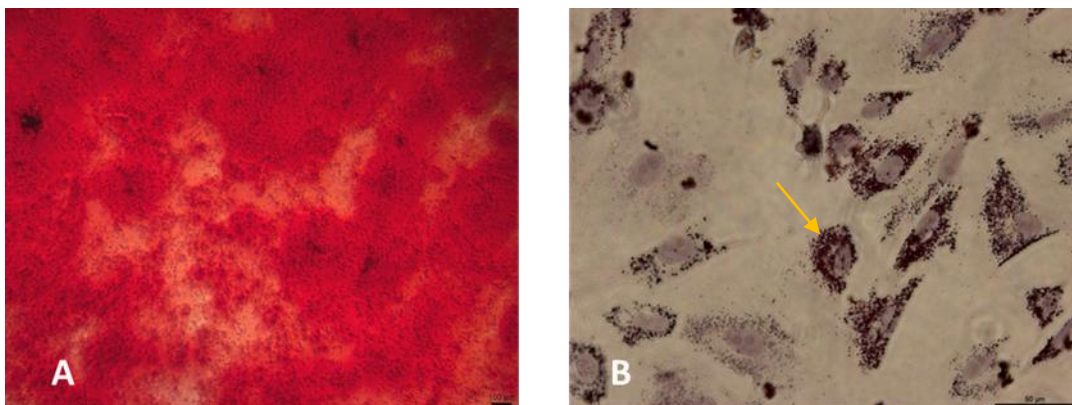


FIGURA 10. Diferenciação das CTMs-CU em linhagens mesodermas. (A) Diferenciação osteogênica. Note a deposição de grande quantidade de matriz rica em cálcio marcada com Alizarin Red. (B) Diferenciação adipogênica. Note a presença de gotículas (seta amarela) intracelulares de gordura coradas com Oil Red.

- **Unidades formadoras de colônias fibroblásticas**

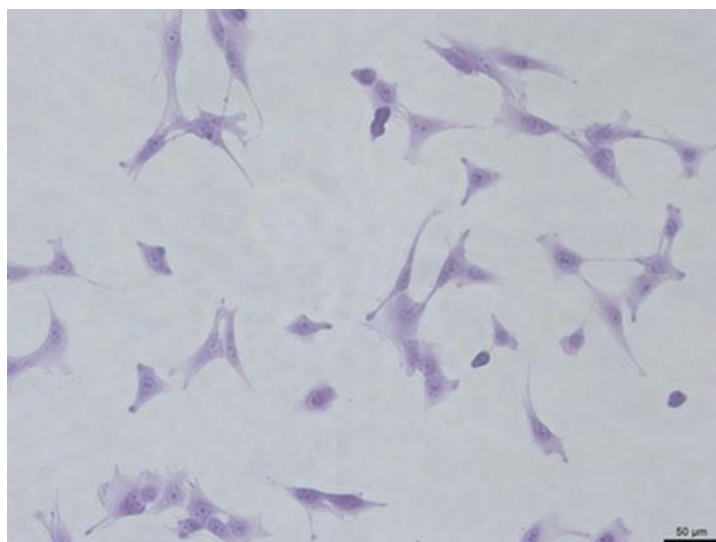


FIGURA 11. Ensaio de UFC-F. Colônia de CTMs-CU em placa de seis wells, coradas com Cristal Violeta.

ANEXO 2

Normas para publicação no periódico “Cytotherapy”:

Article structure

Manuscript files should be structured as follows: (1) Title page; (2) Abstract; (3) Keywords; (4) Abbreviations; (5) Main text; (6) Acknowledgments; (7) Disclosure of Interest; (8) References; (9) Legends of Figures and Tables; and (10) Tables and/or Figures.

Manuscript Style

The text should be double-spaced with generous margins. Times New Roman in 12 pt size is the preferred font style. Smaller spacing and font may be used for references, tables and figure legends. Subheadings may be used for clarification in the Material and Methods and Results sections, and must clearly differentiate from the main text using appropriate font style. The Title page should include: (a) Full title (avoid abbreviations in the title); (b) Running title (for page heading, maximum of 50 characters); (c) All contributing authors with full name, title and affiliation; and (d) Corresponding author details with e-mail address (to which all decision letters and page proofs will be communicated).

AUTHOR INFORMATION PACK 21 Jun 2015 www.elsevier.com/locate/jcyt 7

Should be 250 words or less and divided into subheadings: (1) Background; (2) Methods; (3) Results; (4) Discussion; and (5) Keywords. Only approved abbreviations may be used in the abstract without definition. Review Articles should include a "block style" nonstructured abstract.

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUPAP: Symbols, Units, Nomenclature and Fundamental Constants in Physics: <http://www.iupap.org/> for further information.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be

presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Figure Captions

Include the figure number in the figure caption (in Arabic numerals). Every panel appearing in the artwork should be defined in the legend. Define scale bars in figure legends, not in the artwork. Legends should be intelligible without reference to the text. Abbreviations defined in the text do not have to be defined again in the figure legends.

Tables

As with figures, the number of tables should be kept to a minimum and preferably not repeat information already found in the text. Tables should be intelligible without reference to the text and should supplement, not duplicate it. Each table should be included in the main manuscript file on a separate page after the references. If tables are uploaded separately, they must be in Word or Excel.

The title should be typed above the first line of the table, and should include the number of the table (Roman numerals). Footnotes are indicated by using lower case alphabets as superscripts. P values are given as numbers (not as *, **, ***). Abbreviations defined in the text do not have to be defined again in the table key.

References

The total number of references should not exceed 100. Number references consecutively in the order in which they are first mentioned in the text. Identify references in the text, tables and legends by Arabic numerals within parentheses, i.e. (1). References cited in tables and legends to figures should be numbered in accordance with a sequence established by the first identification in the text of the particular table or illustration. The titles of the journals should be abbreviated according to the style used in Index Medicus. List all authors when 6 or fewer; when 7 or more, list the first six and add 'et al'. If a journal carries continuous pagination throughout a volume the month and issue number are omitted in the reference list. Page numbers are given as "2284-90", not "2284-2290." The use of abstracts in the list of references should be avoided. Manuscripts accepted but not yet published are designated 'in press.' Unpublished observations as well as manuscripts submitted but not yet accepted

should be cited in the text only as 'unpublished observations' with the authors' initials, surname and institution as well as the year when the observation was made. The references must be verified by the authors against the original documents.

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication and a copy of the title page of the relevant article must be submitted.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any

further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list. References in a special issue. Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s)

name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given. **List:** Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.