

LISLEY INATA MAMBELLI

**Células tronco de tecido adiposo de equinos. Estudo do seu potencial para o
tratamento da endometrose**

São Paulo

2011

LISLEY INATA MAMBELLI

**Células tronco de tecido adiposo de equinos. Estudo do seu potencial para o
tratamento da endometrose**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Profa. Dra. Irina Kerkis

Co-orientador:

Profa. Dra. Maria Angélica Miglino

São Paulo

2011

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2445
FMVZ

Mambelli, Lisley Inata

Células tronco de tecido adiposo de equinos. Estudo do seu potencial para o tratamento da endometrose / Lisley Inata Mambelli. -- 2011.
125 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2011.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.
Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Profa. Dra. Irina Kerkis.

Co-orientador: Profa. Dra. Maria Angélica Miglino.

1. Infertilidade em éguas. 2. Endometrose. 3. Aplicação terapêutica. 4. Células tronco de tecido adiposo. 5. Terapia celular. I. Título.

ERRATA

MAMBELLI, L.I. **Células tronco de tecido adiposo de equinos. Estudo do seu potencial para o tratamento da endometrose.** [Stem cells from equine adipose tissue. Study of their potential for the treatment of endometrosis]. 2011. 125 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

| Página | Parágrafo | Linha | Onde se lê | Leia-se |
|----------|-----------|-------|------------|---------|
| Resumo | 1ª | 3ª | 116 f. | 125 f. |
| Abstract | 1ª | 3ª | 116 f. | 125 f. |



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Células tronco de tecido adiposo de equinos. Estudo do seu potencial para o tratamento da endometrose", protocolado sob o nº 1804/2009, utilizando 6 (seis) cavalos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Irina Kerkis, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 09/12/2009.

We certify that the Research "Equine adipose tissue-derived stem cells. Study of their potential for the treatment of endometrosis", protocol number 1804/2009, utilizing 6 (six) horses, under the responsibility Profa. Dra. Irina Kerkis, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 12/09/2009.

São Paulo, 04 de março de 2011

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MAMBELLI, Lisley Inata

Título: Células tronco de tecido adiposo de equinos. Estudo do seu potencial para o tratamento da endometrose

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus e a todos os anjos do céu, em especial minha tia Julia Inata e meu padrinho Edson Mambelli por estarem, mesmo que apenas em pensamentos, participando de todas as etapas da minha vida, me guiando e me protegendo. Nem sei dizer o quanto eu sinto falta de vocês.

Aos meus pais Suely Inata Mambelli e Luiz Carlos Mambelli pela vida maravilhosa que vocês me proporcionam. Mas além disso, por estarem sempre ao meu lado, em todos os momentos da minha vida, me apoiando, me instruindo e me guiando em qualquer decisão que eu tomasse. Vocês são tudo pra mim!!!

Ao eterno companheiro da minha vida Renato Onomura por todos estes anos de amor, carinho, compreensão, convivência, aprendizado, dedicação e muita, mas muita paciência. Tudo o que passamos juntos e o apoio que você me deu sempre, com certeza não caberiam nem em dez folhas de agradecimentos. Eu vou ser eternamente grata pela sua presença iluminando o meu caminho e também pela Shibinha linda que você nos deu.

A minha madrinha Marli Bacci que sempre se faz presente em todos os momentos da minha vida. Por todo o crédito e por toda a confiança depositada em mim sempre!

A minha gatinha Zizi e a minha cachorrinha Miya, lindas da minha vida, por tornarem todos os meus dias mais alegres. Sem sombra de dúvidas, anjo da guarda tem quatro patas.

A minha orientadora Dra. Irina Kerkis, por todas as oportunidades dadas a minha carreira como pesquisadora desde as iniciações científicas. Como a senhora sempre diz: os passarinhos criam asas e voam, mas sempre retornam ao seu ninho como forma de reconhecimento. Com certeza não se pode ensinar nada a ninguém, pode se apenas ensinar a pessoa a ver com os próprios olhos e caminhar com as próprias pernas. Muito obrigada por toda a paciência, carinho e ensinamentos durante estes anos de convivência e amizade.

A minha co-orientadora Dra. Maria Angélica Miglino, por estar sempre presente nos momentos em que eu precisava. Não consigo me lembrar de nenhum momento se quer, que eu tenha recorrido a senhora e a senhora me deu as costas. Muito obrigada pela oportunidade e por me acolher em seu programa de pós-graduação com tanta disponibilidade e vontade de ajudar.

Aos colaboradores deste trabalho Profs. Rodrigo Costa Mattos e Eduardo Malschitzky por nos ceder os animais e o espaço na Universidade Federal do Rio Grande do Sul e por todo o auxílio nas análises patológicas no decorrer deste trabalho.

Aos meus amigos de laboratório Ana, Cris, Camila, Diana, Marília, Milena, Alexandre Pereira, Leandro, Rui e Enrico pela disponibilidade em ajudar sempre que necessário. Em especial a Babyzinha, a Bru, a Pri e ao Nelson por me ensinarem, me aturarem e me ajudarem SEMPRE no desenvolvimento deste e de qualquer outro trabalho que eu esteja desenvolvendo. Muito obrigada pelo carinho, pelas risadas, broncas, dicas, pelos conselhos, pelos sorvetes e capuccinos na cantina, mas mais importante do que tudo isso, pela amizade de vocês, totalmente indispensável e necessária na minha vida profissional e pessoal.

Aos colegas do REPROLAB da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em especial ao Gustavo Winter por me receberem tão bem em Porto Alegre e pela imensa disponibilidade em ajudar em todos os momentos clínicos no desenvolvimento deste trabalho.

Ao amigo Carlos Maranduba que mesmo longe está sempre presente em pensamento. Por todo o aprendizado e ajuda durante o desenvolvimento de qualquer trabalho que eu faça.

Ao Dr. Alexandre Kerkis por todos os ensinamentos durante estes anos de convivência.

Ao Dener, amigo e técnico do lab., por me ajudar demais nas etapas finais de desenvolvimento deste trabalho: pelo carinho e cuidado com as minhas lâminas.

A equipe técnica do Laboratório de Genética, Zenaide, Mirtes, Angelina, Ivone, Olga, e Lisandro por todo apoio e ajuda no desenvolvimento de todos os trabalhos desenvolvidos.

Aos amigos do “lado de lá da genética” (rsrsrs) Rodrigo, Will, Sérgio e Renato pela amizade, aprendizagem e disponibilidade em ajudar sempre.

As minhas queridas éguas (Lobuna, Czarina, Cumparsita, Ki-Rumba, Trairona e Amanda) que com certeza tornaram viável este trabalho.

A CAPES e a FAPESP pelas bolsas no primeiro e no segundo ano do meu mestrado, respectivamente.

Todas estas pessoas, a seu modo, tem uma participação na minha vida, e com certeza contribuíram de alguma maneira não só no desenvolvimento deste trabalho mas na minha formação como pessoa, tornando o meu mundo um lugar muito mais prazeroso de se viver. E como sempre diz minha amiga do coração Baby:

“Nenhum de nós é tão bom, quanto todos nós juntos”

À todos vocês, o meu sincero e eterno muito obrigada!!!

*Já pensei que fosse morrer de tanta saudade e
tive medo de perder alguém especial (e acabei por perder),
Mas sobrevivi!
E ainda vivo, não passo pela vida!!
Bom mesmo é ir a luta com determinação,
Abraçar a vida e viver com paixão,
Perder com classe e vencer com ousadia,
Porque o mundo pertence a quem se atreve
E A VIDA É MUITO para ser insignificante”*

Charles Chaplin

RESUMO

MAMBELLI, L. I. **Células tronco de tecido adiposo de equinos. Estudo do seu potencial para o tratamento da endometrose.** [Stem cells from equine adipose tissue. Study of their potential for the treatment of endometrosis]. 2011. 116 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

A aplicação terapêutica de Células Tronco (CT) em equinos é um campo emergente. Nestes animais, as CT são promissoras para o tratamento de lesões nos tendões e rupturas de ligamentos. Apesar das características e do potencial na restauração de tecidos lesionados, bem como dos efeitos parácrinos destas células, não existem dados a respeito do seu uso no tratamento de desordens sistêmicas que podem acometer os equinos, tais como a endometrose. A endometrose é uma doença progressiva e irreversível que leva a degeneração do endométrio e a formação de um tecido fibroso periglandular, sendo de grande relevância na medicina veterinária, por ser uma das maiores causas de infertilidade. Apesar dos constantes avanços na busca de um tratamento, nenhum obteve sucesso. Levando-se em consideração a importância da doença, o objetivo deste projeto foi utilizar CT, previamente isoladas e caracterizadas pelo nosso grupo, no tratamento da endometrose, visando diminuir o processo inflamatório e a formação do tecido fibroso periglandular. Seis éguas com endometrose foram sincronizadas. Em quatro foram infundidas CT previamente marcadas com *Vybrant*, e nas outras duas (controle) apenas solução fisiológica. Antes da infusão, foram coletadas biópsias uterinas e amostras para citologia. Após 7, 21 e 61 dias da infusão, foram coletadas novas biópsias e amostras citológicas. Por meio da fluorescência direta observamos a presença das CT marcadas enxertadas tanto no corpo quanto nos cornos uterinos das éguas. Através de análises histológicas observamos uma significativa melhora no aspecto morfológico e na organização do tecido uterino, bem como, das glândulas endometriais, após a infusão das CT, tal resultado foi observado progressivamente ao longo dos dias. Notamos também uma diminuição no processo de fibrose do tecido periglandular. As análises de citologia demonstraram a ausência de inflamação uterina antes e após a infusão das CT. Nossos dados sugerem que existem benefícios na utilização de CT de tecido adiposo de equinos no tratamento do tecido uterino acometido pela endometrose, que clinicamente só poderão ser validados após a prenhez desses animais.

Palavras-chave: Infertilidade em éguas. Endometrose. Células tronco de tecido adiposo.

ABSTRACT

MAMBELLI, L.I. **Stem cells from equine adipose tissue. Study of their potential for the treatment of endometrosis.** [Células tronco de tecido adiposo de equinos. Estudo do seu potencial para o tratamento da endometrose]. 2011. 116 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

In horses, Stem Cell (SC) therapies are a promising tool to the treatment of many injuries, as tendon lesions and ligaments rupture. Besides the characteristics and the potential in tissue restoration, as well as, paracrine effects of SC, there is no information about the use of them for the treatment of systemic disorders which can commit horses, such as endometrosis. Endometrosis is a progressive and irreversible disease which is defined as active or inactive periglandular and stromal endometrial fibrosis, including glandular alterations within fibrotic foci. Modifications induced by this disease alter the surface of endometrium which, in consequence, led to infertility. Conventional treatments do not reduce the fibrotic process or even help to restore fertility. Considering the importance of this disease, the goal of this project is to use SC, previously isolated and characterized by our group, in the treatment of endometrosis, in order to reduce inflammatory process and periglandular fibrous tissue formation, typical of this disease. Six mares with confirmed endometrosis were synchronized for the use as animal model in this work. In four of animals we infused stem cells previously marked with *Vybrant*, and the other two (control group) were infused with saline solution. Before the infusion, uterine biopsies and also samples for cytology were collected. After 7, 21 and 61 days of cells infusion new biopsies and cytology samples for analysis were collected. We observed, by direct fluorescence, the presence of marked cells grafted in both body and uterine horns of treated animals. Through histological analysis we observed a significant improvement in morphology and organization of uterine tissue, as well as endometrial glands, after infusion of stem cells, this result was observed progressively throughout the days. Furthermore, we noted a decrease in the process of periglandular tissue fibrosis, after infusion of cells. Cytology analysis showed that the animals have no uterine inflammation before or after infusion of SC. Our data suggest that there are benefits of using stem cells from equine adipose tissue in the treatment of uterus tissue affected by endometrosis, which can only be clinically validated after pregnancy of these animals.

Keywords: Mares infertility. Endometrosis. Stem cells from adipose tissue.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Biópsia uterina de égua com Endometrose. (G) glândulas isoladas, (GN) ninhos glandulares e (SC) células estromais. Fonte Hoffmann et al., 2008 | 35 |
| Figura 2 – Coleta das biópsias endometriais | 50 |
| Figura 3 – Limpeza da região perianal | 50 |
| Figura 4 – Infusão das células tronco | 51 |
| Figura 5 – Análise do cariótipo por coloração de Giemsa. Objetiva=100X | 55 |
| Figura 6 – Diferenciação Miogênica. Células tronco de tecido adiposo de equinos em cultura com morfologia típica de células musculares. Objetiva=20x | 56 |
| Figura 7 – Diferenciação Miogênica. Análise de imunofluorescência mostrando que as células diferenciadas apresentam marcação positiva para o anticorpo anti- α -actinina. Como esperado, os controles não expressam marcação. Núcleos corados por DAPI em azul. Objetiva=40x e 63x | 57 |
| Figura 8 – Diferenciação Miogênica. Análise de imunofluorescência mostrando que as células diferenciadas apresentam marcação positiva para o anticorpo anti-miosina. Como esperado, os controles não expressam marcação. Núcleos corados por DAPI em azul. Objetiva=63x | 57 |
| Figura 9 – Diferenciação Neurogênica. Células em cultura demonstrando morfologia semelhante a neurônios. Objetiva=40x | 58 |
| Figura 10 – Diferenciação Neurogênica. Células em cultura sugerindo, morfologicamente, a formação de sinapse. Objetiva=63x | 59 |
| Figura 11 – Diferenciação Neurogênica. Células coradas por Hematoxilina/Eosina demonstrando morfologia semelhante a neurônios. Objetiva=20x | 59 |
| Figura 12 – Diferenciação Neurogênica. Células em cultura se diferenciaram para estrutura semelhante a neuroesfera. Objetiva=40x | 60 |
| Figura 13 – Diferenciação Neurogênica. Imunofluorescência das estruturas semelhantes a neuroesferas. No centro, expressão de nestina (FITC, verde) e na periferia, núcleos corados (PI, vermelho). Objetiva=40x e 63x | 60 |

| | |
|--|----|
| Figura 14 – Diferenciação Neurogênica. Imunofluorescência das células com morfologia semelhante a neurônios, demonstrando a expressão de GFAP. Núcleos corados por DAPI em azul. Objetiva=20x | 61 |
| Figura 15 – Diferenciação Neurogênica. Imunofluorescência demonstrando a expressão de β -tubulina III. Núcleos corados por DAPI em azul. Objetiva=40x | 61 |
| Figura 16 – Células tronco indiferenciadas marcadas com <i>Vybrant</i> . Pode ser observado o padrão de marcação pontual típico. Núcleos corados por DAPI em azul. Objetiva=63x e 100x | 62 |
| Figura 17 – Lobuna. Localização das células tronco marcadas por <i>Vybrant</i> enxertadas no tecido uterino. (A) Corpo uterino, (B) Corno direito e (C) Corno esquerdo. Núcleos corados por DAPI em azul. Objetiva=60x | 63 |
| Figura 18 – Cumparsita. Localização das células tronco marcadas por <i>Vybrant</i> enxertadas no tecido uterino. (A) Corpo uterino, (B) Corno direito e (C) Corno esquerdo. Núcleos corados por DAPI em azul. Objetiva=60x | 63 |
| Figura 19 – Trairona. Localização das células tronco marcadas por <i>Vybrant</i> enxertadas no tecido uterino. (A) Corpo uterino, (B) Corno direito e (C) Corno esquerdo. Núcleos corados por DAPI em azul. Objetiva=60x | 64 |
| Figura 20 – Amanda. Localização das células tronco marcadas por <i>Vybrant</i> enxertadas no tecido uterino. (A) Corpo uterino e (B) Corno direito, não observamos a presença de células marcadas na amostra do corno esquerdo. Núcleos corados por DAPI em azul. Objetiva=60x e 40x | 64 |
| Figura 21 – Ki-Rumba. Animal controle. Não foi observamos células marcadas no tecido uterino. (A) Corpo uterino, (B) Corno direito e (C) Corno esquerdo. Núcleos corados por DAPI em azul + contraste de fase. Objetiva=60x | 65 |
| Figura 22 – Czarina. Animal controle. Não foi possível observar a presença das células marcadas no tecido uterino. (A) Corpo uterino, (B) Corno direito e (C) Corno esquerdo. Núcleos corados por DAPI em azul + contraste de fase. Objetiva=60x | 65 |
| Figura 23 – Lobuna. Amostra do corpo uterino antes da infusão das células. Núcleos corados por DAPI em azul. Objetiva=63x | 66 |
| Figura 24 – Czarina. Amostra do corpo uterino antes da infusão das células. Núcleos corados por DAPI em azul. Objetiva=63x | 66 |

| | |
|---|----|
| Figura 25 – Ki-Rumba. Amostra do corpo uterino antes da infusão das células. Núcleos corados por DAPI em azul. Objetiva=63x | 66 |
| Figura 26 – Cumparsita. Amostra do corpo uterino antes da infusão das células. Núcleos corados por DAPI em azul. Objetiva=63x | 67 |
| Figura 27 – Trairona. Amostra do corpo uterino antes da infusão das células. Núcleos corados por DAPI em azul. Objetiva=63x | 67 |
| Figura 28 – Amanda. Amostra do corpo uterino antes da infusão das células. Núcleos corados por DAPI em azul. Objetiva=63x | 67 |
| Quadro 1 - Presença (+) ou ausência (-) de neutrófilos polimorfonucleares indicando a existência ou não de processo inflamatório (Endometrite) | 68 |
| Figura 29 – Lobuna. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corpo uterino antes da infusão das células tronco. Objetiva=20x e 60x | 69 |
| Figura 30 – Cumparsita. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corpo uterino antes da infusão das células tronco. Objetiva=20x e 60x | 70 |
| Figura 31 – Trairona. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corpo uterino antes da infusão das células tronco. Objetiva=20x e 60x | 70 |
| Figura 32 – Amanda. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corpo uterino antes da infusão das células tronco. Objetiva=20x e 60x | 70 |
| Figura 33 – Ki-Rumba. Animal controle. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corpo uterino antes do experimento. Objetiva=20x e 60x | 71 |
| Figura 34 – Czarina. Animal controle. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corpo uterino antes do experimento. Objetiva=20x e 60x | 71 |
| Figura 35 – Czarina. Animal controle. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corpo uterino antes do experimento. Objetiva=20x e 60x | 72 |
| Figura 36 – Lobuna. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino direito, 7 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x e 60x | 72 |
| Figura 37 – Lobuna. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino esquerdo, 7 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x e 60x | 72 |
| Figura 38 – Cumparsita. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corpo uterino, 7 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x e 60x. | 73 |

| | |
|---|----|
| Figura 39 – Cumparsita. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino direito, 7 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x e 60x | 73 |
| Figura 40 – Cumparsita. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino esquerdo, 7 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x e 60x | 73 |
| Figura 41 – Trairona. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corpo uterino, 7 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x e 60x | 74 |
| Figura 42 – Trairona. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino direito, 7 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x e 60x | 74 |
| Figura 43 – Trairona. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino esquerdo, 7 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x e 60x | 74 |
| Figura 44 – Amanda. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corpo uterino, 7 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x | 75 |
| Figura 45 – Amanda. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino direito, 7 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x | 75 |
| Figura 46 – Amanda. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino esquerdo, 7 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x | 75 |
| Figura 47 – Ki-Rumba. Animal controle. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corpo uterino, 7 dias após o experimento. Objetiva=20x e 63x | 76 |
| Figura 48 – Ki-Rumba. Animal controle. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino direito, 7 dias após o experimento. Objetiva=20x e 63x | 76 |
| Figura 49 – Ki-Rumba. Animal controle. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino esquerdo, 7 dias após o experimento. Objetiva=20x e 63x | 76 |
| Figura 50 – Czarina. Animal controle. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corpo uterino, 7 dias após o experimento. Objetiva=20x e 63x | 77 |
| Figura 51 – Czarina. Animal controle. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino direito, 7 dias após o experimento. Objetiva=20x e 63x | 77 |
| Figura 52 – Czarina. Animal controle. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino esquerdo, 7 dias após o experimento. Objetiva=20x e 63x | 77 |
| Figura 53 – Lobuna. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corpo uterino, 21 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x e 63x | 78 |

| | |
|--|----|
| Figura 54 – Lobuna. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino direito, 21 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x e 63x | 78 |
| Figura 55 – Lobuna. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino esquerdo, 21 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x e 63x | 78 |
| Figura 56 – Cumparsita. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corpo uterino, 21 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x e 63x | 79 |
| Figura 57 – Cumparsita. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino direito, 21 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x e 63x | 79 |
| Figura 58 – Cumparsita. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino esquerdo, 21 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x e 63x | 79 |
| Figura 59 – Trairona. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corpo uterino, 21 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x e 63x | 80 |
| Figura 60 – Trairona. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino direito, 21 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x e 63x | 80 |
| Figura 61 – Trairona. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino esquerdo, 21 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x e 63x | 80 |
| Figura 62 – Amanda. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corpo uterino, 21 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x | 81 |
| Figura 63 – Amanda. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino direito, 21 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x | 81 |
| Figura 64 – Amanda. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino esquerdo, 21 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x | 81 |
| Figura 65 – Ki-Rumba. Animal controle. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corpo uterino, 21 dias após o experimento. Objetiva=20x e 63x | 82 |
| Figura 66 – Ki-Rumba. Animal controle. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino direito, 21 dias após o experimento. Objetiva=20x e 63x | 82 |
| Figura 67 – Ki-Rumba. Animal controle. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino esquerdo, 21 dias após o experimento. Objetiva=20x e 63x | 82 |
| Figura 68 – Czarina. Animal controle. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corpo uterino, 21 dias após o experimento. Objetiva=20x e 63x | 83 |

| | |
|--|----|
| Figura 69 – Czarina. Animal controle. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino direito, 21 dias após o experimento. Objetiva=20x e 63x | 83 |
| Figura 70 – Czarina. Animal controle. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino esquerdo, 21 dias após o experimento. Objetiva=20x e 63x | 83 |
| Figura 71 – Lobuna. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corpo uterino, 61 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x e 63x | 84 |
| Figura 72 – Lobuna. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino direito, 61 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x e 63x | 84 |
| Figura 73 – Lobuna. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino esquerdo, 61 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x e 63x | 84 |
| Figura 74 – Cumparsita. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corpo uterino, 61 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x e 63x | 85 |
| Figura 75 – Cumparsita. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino direito, 61 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x e 63x | 85 |
| Figura 76 – Cumparsita. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino esquerdo, 61 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x e 63x | 85 |
| Figura 77 – Trairona. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corpo uterino, 61 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x e 63x | 86 |
| Figura 78 – Trairona. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino direito, 61 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x e 63x | 86 |
| Figura 79 – Trairona. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino esquerdo, 61 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x e 63x | 86 |
| Figura 80 - Amanda. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corpo uterino, 61 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x | 87 |
| Figura 81 - Amanda. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino direito, 61 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x | 87 |
| Figura 82 - Amanda. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino esquerdo, 61 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x | 87 |
| Figura 83 – Ki-Rumba. Animal controle. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corpo uterino, 61 dias após o experimento. Objetiva=20x e 63x | 88 |

| | |
|--|----|
| Figura 84 – Ki-Rumba. Animal controle. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino direito, 61 dias após o experimento. Objetiva=20x e 63x | 88 |
| Figura 85 – Ki-Rumba. Animal controle. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino esquerdo, 61 dias após o experimento. Objetiva=20x e 63x | 88 |
| Figura 86 – Czarina. Animal controle. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corpo uterino, 61 dias após o experimento. Objetiva=20x e 63x | 89 |
| Figura 87 – Czarina. Animal controle. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino direito, 61 dias após o experimento. Objetiva=20x e 63x | 89 |
| Figura 88 – Czarina. Animal controle. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino esquerdo, 61 dias após o experimento. Objetiva=20x e 63x | 89 |
| Figura 89 – Lobuna. Coloração de Alcian Blue na biópsia do corpo uterino antes da infusão das células tronco. Objetiva=20x | 90 |
| Figura 90 – Cumparsita. Coloração de Alcian Blue na biópsia do corpo uterino antes da infusão das células tronco. Objetiva=20x | 90 |
| Figura 91 – Trairona. Coloração de Alcian Blue na biópsia do corpo uterino antes da infusão das células tronco. Objetiva=20x | 90 |
| Figura 92 – Amanda. Coloração de Alcian Blue na biópsia do corpo uterino antes da infusão das células tronco. Objetiva=20x | 91 |
| Figura 93 – Ki-Rumba. Animal controle. Coloração de Alcian Blue na biópsia do corpo uterino antes do experimento. Objetiva=20x | 91 |
| Figura 94 – Czarina. Animal controle. Coloração de Alcian Blue na biópsia do corpo uterino antes do experimento. Objetiva=20x | 91 |
| Figura 95 – Lobuna. Coloração de Alcian Blue na biópsia do corpo uterino, 7 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x | 92 |
| Figura 96 – Cumparsita. Coloração de Alcian Blue na biópsia do corpo uterino, 7 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x | 92 |
| Figura 97 – Trairona. Coloração de Alcian Blue na biópsia do corpo uterino, 7 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x | 92 |
| Figura 98 – Amanda. Coloração de Alcian Blue na biópsia do corpo uterino, 7 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x | 93 |

| | |
|--|----|
| Figura 99 – Ki-Rumba. Animal controle. Coloração de Alcian Blue na biópsia do corpo uterino, 7 dias após o experimento. Objetiva=20x | 93 |
| Figura 100 – Czarina. Animal controle. Coloração de Alcian Blue na biópsia do corpo uterino, 7 dias após o experimento. Objetiva=20x | 93 |
| Figura 101 – Lobuna. Coloração de Alcian Blue na biópsia do corpo uterino, 21 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x | 94 |
| Figura 102 – Cumparsita. Coloração de Alcian Blue na biópsia do corpo uterino, 21 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x | 94 |
| Figura 103 – Trairona. Coloração de Alcian Blue na biópsia do corpo uterino, 21 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x | 94 |
| Figura 104 – Amanda. Coloração de Alcian Blue na biópsia do corpo uterino, 21 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x | 95 |
| Figura 105 – Ki-Rumba. Animal controle. Coloração de Alcian Blue na biópsia do corpo uterino, 21 dias após o experimento. Objetiva=20x | 95 |
| Figura 106 – Czarina. Animal controle. Coloração de Alcian Blue na biópsia do corpo uterino, 21 dias após o experimento. Objetiva=20x | 95 |
| Figura 107 – Lobuna. Coloração de Alcian Blue na biópsia do corpo uterino, 61 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x | 96 |
| Figura 108 – Cumparsita. Coloração de Alcian Blue na biópsia do corpo uterino, 61 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x | 96 |
| Figura 109 – Trairona. Coloração de Alcian Blue na biópsia do corpo uterino, 61 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x | 96 |
| Figura 110 – Amanda. Coloração de Alcian Blue na biópsia do corpo uterino, 61 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x | 97 |
| Figura 111 – Ki-Rumba. Animal controle. Coloração de Alcian Blue na biópsia do corpo uterino, 61 dias após o experimento. Objetiva=20x | 97 |
| Figura 112 – Czarina. Animal controle. Coloração de Alcian Blue na biópsia do corpo uterino, 61 dias após o experimento. Objetiva=20x | 97 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---------|--|
| BSA | do inglês “ <i>Bovine Serum Albumin</i> ” |
| CD105 | do inglês “ <i>Clusters of Differentiation</i> ” |
| CT | Célula Tronco |
| CTA | Células Tronco Adultas |
| CTAH | Células Tronco do Tecido Adiposo Humano |
| CTE | Células Tronco Embrionárias |
| CTM | Células Tronco Mesenquimais |
| DAPI | do inglês “ <i>4’6-Diamidino-2-phenylindol</i> ” |
| DMEM-HG | do inglês “ <i>Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium-High Glucose</i> ” |
| DMEM-LG | do inglês “ <i>Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium-Low Glucose</i> ” [^] |
| FSH | do inglês “ <i>Follicle-Stimulating Hormone</i> ” |
| G | Glândulas isoladas |
| GFAP | do inglês “ <i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i> ” |
| GN | do inglês “ <i>Glandular Nest</i> ” |
| ITS | do inglês “ <i>Insulin Transferinn Seleniun</i> ” |
| PBS | do inglês “ <i>Phosphate-Buffered Saline</i> ” |
| RT-PCR | do inglês “ <i>Reverse-Transcription-Polymerase Chain Reaction</i> ” |
| SC | do inglês “ <i>Stromal Cells</i> ” |
| SFB | Soro Fetal Bovino |
| TBS | do inglês “ <i>Tween Buffered Saline</i> ” |
| TGFβ-1 | do inglês “ <i>Transforming Growth Factor-Beta 1</i> ” |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 24 |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA | 27 |
| 2.1 CÉLULAS TRONCO | 27 |
| 2.1.1 Células Tronco Adultas | 27 |
| 2.1.1.1 Células Tronco Mesenquimais | 28 |
| 2.2 POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO | 30 |
| 2.3 CÉLULAS TRONCO E A MEDICINA REGENERATIVA | 31 |
| 2.4 O TECIDO ADIPOSEO COMO FONTE DE CÉLULAS TRONCO | 31 |
| 2.5 CÉLULAS TRONCO E SUA APLICAÇÃO TERAPÊUTICA EM EQUINOS | 32 |
| 2.6 ENDOMETROSE | 33 |
| 2.7 O ÚTERO DA ÉGUA | 35 |
| 2.8 BIÓPSIAS UTERINAS | 37 |
| 2.9 TRATAMENTO DA ENDOMETROSE | 38 |
| 3 OBJETIVOS | 40 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS | 42 |
| 4.1 ANIMAIS | 42 |
| 4.2 ISOLAMENTO, CULTURA E EXPANSÃO DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DE TECIDO ADIPOSEO DE EQUINOS | 43 |
| 4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS ISOLADAS A PARTIR DE TECIDO ADIPOSEO DE EQUINOS | 44 |
| 4.3.1 Método de <i>Cell Doubling</i> | 44 |
| 4.3.2 Análise de Cariótipo | 44 |

| | |
|---|-----------|
| 4.3.3 Ensaios de Diferenciação | 45 |
| 4.3.3.1 Diferenciação Osteogênica | 45 |
| 4.3.3.2 Diferenciação Adipogênica | 46 |
| 4.3.3.3 Diferenciação Condrogênica | 46 |
| 4.3.3.4 Diferenciação Miogênica | 47 |
| 4.3.3.5 Diferenciação Neurogênica | 47 |
| 4.4 MARCAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO COM <i>VYBRANT</i> | 48 |
| 4.5 SINCRONIZAÇÃO DOS ANIMAIS | 48 |
| 4.6 COLETA DAS BIÓPSIAS ENDOMETRIAIS E INFUSÃO UTERINA DAS CÉLULAS TRONCO | 49 |
| 4.7 ANÁLISE DA CITOLOGIA ENDOMETRIAL DAS AMOSTRAS OBTIDAS ANTES E DEPOIS DE 7, 21 E 61 DIAS DA INFUSÃO DAS CÉLULAS TRONCO | 51 |
| 4.8 ANÁLISE HISTOLÓGICA DAS BIÓPSIAS UTERINAS OBTIDAS ANTES E DEPOIS DE 7, 21 E 61 DIAS DA INFUSÃO DAS CÉLULAS TRONCO | 52 |
| 4.9 LOCALIZAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO NAS BIÓPSIAS UTERINAS | 52 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 54 |
| 5.1 ISOLAMENTO, CULTURA E EXPANSÃO DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DE TECIDO ADIPOSEO DE EQUINOS | 54 |
| 5.2 <i>CELL DOUBLING</i> , DIFERENCIAÇÕES OSTEOGÊNICA, ADIPOGÊNICA E CONDRÓGÊNICA <i>IN VITRO</i> | 54 |
| 5.3 CARIÓTIPO | 55 |
| 5.4 DIFERENCIAÇÃO MIOGÊNICA | 56 |
| 5.5 DIFERENCIAÇÃO NEUROGÊNICA | 58 |
| 5.6 CÉLULAS TRONCO MARCADAS COM <i>VYBRANT</i> | 62 |

| | |
|--|------------|
| 5.7 ANÁLISE DO ENXERTO DAS CÉLULAS TRONCO NAS BIÓPSIAS UTERINAS | 62 |
| 5.8 ANÁLISE DAS CITOLOGIAS ENDOMETRIAIS | 68 |
| 5.9 ANÁLISE HISTOLÓGICA DAS BIÓPSIAS UTERINAS | 68 |
| 6 CONCLUSÕES | 99 |
| REFERÊNCIAS | 102 |
| APÊNDICE | 109 |

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A Célula Tronco (CT) pode ser definida como uma célula que possui capacidade de auto-renovação e de diferenciação para diversos tipos celulares (ALVARADO, 2008). As CT encontradas nos mais variados tecidos específicos de um indivíduo adulto são denominadas Células Tronco Adultas (CTA) e constituem uma população de células multipotentes, que ao contrário do que se acreditava inicialmente, não estão envolvidas apenas no processo de reparação e homeostase dos tecidos dos quais são isoladas, mas também possuem grande capacidade de diferenciação, bem como diversos efeitos parácrinos que contribuem para a recuperação e regeneração de outros tipos celulares e teciduais do organismo. Nos últimos anos, foi demonstrado que CTA podem ser obtidas a partir de vários tecidos adultos, tais como medula óssea (CAPLAN, 1991), polpa de dente (KERKIS et al., 2006), pele (LIU et al., 2008) e também tecido adiposo (ZUK et al., 2001, 2002; NAKAGAMI et al., 2005), e não apenas de seres humanos, como também de diversos animais, dentre eles os equinos (VIDAL et al., 2006; MAMBELLI et al., 2009). A capacidade das CTA de originar praticamente todos os tipos de células do indivíduo as têm tornado extremamente atrativas para a regeneração de tecidos (CAPLAN, 2000, 2003, 2005), uma vez que não fazem uso de embriões como material biológico, contornando as questões éticas, culturais e religiosas envolvidas com o uso das Células Tronco Embrionárias (CTE). Além disso, o avanço tecnológico tem ajudado a visualizar o real potencial da utilização terapêutica das CTA, e a sua capacidade de reconstituição de tecidos injuriados está sendo amplamente estudada em modelos animais (PITTENGER; MARTIN, 2004; TOHMA et al., 2008; MONTEIRO et al., 2009).

A aplicação terapêutica das CT em equinos é um campo emergente. Nos cavalos, estas células se mostram extremamente promissoras para o tratamento de diversas doenças, a exemplo, osteoartrites, lesões tendíneas e ruptura de ligamentos suspensórios, uma vez que estes animais frequentemente sofrem tais injúrias e estas células podem servir como um instrumento para ajudar na qualidade da regeneração dos ligamentos e tendões lesionados, enquanto que as terapias tradicionais se limitam a minimizar o processo inflamatório e a dor, não tendo efeito na recuperação do tecido. Em se tratando dos equinos, proprietários e veterinários estão constantemente em busca de novas terapias que propiciem resultados mais efetivos, e apesar do

grande número de dados científicos, que demonstram a eficácia clínica da terapia com CT em modelos animais com determinadas doenças (NIEMEYER et al., 2006; MESIMÄKI et al., 2009), não existem na literatura dados a respeito do uso de CT para o tratamento de outras desordens sistêmicas que acometem estes animais, tal como a endometrose.

Dentre algumas doenças que acometem os equinos, a endometrose é uma desordem que possui grande relevância para a área da medicina veterinária, uma vez que é responsável pelas maiores causas de infertilidade em éguas. A endometrose é definida como a atividade alterada ou inatividade das glândulas do endométrio, sendo caracterizada por um processo progressivo e irreversível que leva à degeneração do tecido endometrial e à formação de um tecido fibroso periglandular que prejudica a função das glândulas uterinas (HOFFMANN et al., 2008). Apesar de ser uma doença bastante destrutiva e ser considerada uma das maiores causas de infertilidade em éguas, a etiologia da endometrose permanece desconhecida e os tratamentos convencionais não obtiveram sucesso na redução do processo fibrótico ou na melhoria da fertilidade (ASBURY; LYLE, 1993). Por conta disto, e levando-se em consideração o potencial, bem como os efeitos antiinflamatório, imunossupressor e imunomodulador das CT, acreditamos que estas células serão capazes de contribuir na redução do processo inflamatório e auxiliar na recuperação do tecido fibroso periglandular, característicos desta doença.

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CÉLULAS TRONCO

As células tronco são células primordiais, indiferenciadas que possuem alto potencial proliferativo e extrema capacidade de diferenciação. Ao se multiplicarem, estas células são capazes de gerar cópias idênticas de si mesmas e quando reintroduzida no organismo podem constituir funcionalmente qualquer tecido (FORTIER, 2005). No entanto, sua pluripotência ou capacidade de gerar diversos tipos celulares é reduzida a cada divisão celular, ou seja, sua capacidade de diferenciação torna-se mais restrita (CAPLAN, 2008). Devido a essas características únicas, as CT são de grande importância para área médica.

2.1.1 Células tronco adultas

Inicialmente, acreditou-se que as CT encontradas em órgãos adultos fossem comprometidas a uma ou a poucas linhagens e estivessem envolvidas apenas na reparação dos mesmos, e que fossem incapazes de serem reprogramadas para diferenciar-se em tecidos diferentes (POULSOM et al., 2002). De acordo com esta visão, as células descendentes de uma CT sofrem uma mudança irreversível em um estágio inicial, o que faz com que as células sejam permanentemente comprometidas com uma via de diferenciação específica aos progenitores não diferenciados, progenitores comprometidos e linhagens celulares especializadas (MEYER, 2001). Entretanto, muitas evidências sugerem que a diferenciação inicial de uma via específica não é irreversível. Assim, as CTA apresentam capacidade de se diferenciarem em vários tecidos, porém com um pouco mais de restrição do que as CTE (LARRÚ, 2001). Por outro lado, as CTA implicam menos problemas éticos para a pesquisa e aplicação clínica do que as CTE, uma vez que não se faz uso de embriões como material biológico (CHOUMERANOU et al., 2008).

O uso das CTA no desenvolvimento de pesquisas em engenharia de tecidos e na medicina regenerativa é importante e apresenta vantagens, uma vez que sua diferenciação é mais controlada e, quando introduzidas no organismo, dificilmente produzem tumores (MARTIN, 2008).

Atualmente, foi mostrado que as CTA podem ser isoladas de vários tecidos adultos, tais como a polpa de dente, a pele e também o tecido adiposo. Nestes trabalhos foi demonstrado também que estas células apresentam uma plasticidade, ou seja, capacidade de se diferenciarem em vários tecidos, mais ampla do que foi mostrado antigamente para as CT isoladas da medula óssea. Acredita-se atualmente, que CTA são células multipotentes capazes de produzir não só células derivadas da mesoderme (como primeiramente demonstrado para CT Mesenquimais, CTM), mas também da endoderme e da ectoderme (PITTENGER et al., 1999; HERZOG et al., 2003).

2.1.1.1 Células tronco mesenquimais

As células tronco mesenquimais fazem parte do grupo das CTA e de uma maneira geral, estas células são definidas a partir de um conjunto de características apresentadas *in vitro*, incluindo a combinação de marcadores fenotípicos e as propriedades funcionais de diferenciação.

As CTM foram primeiramente descritas por Friendstein et al. (1970) como precursores fibroblásticos da medula óssea. A partir daí, Caplan (1991) e Colter (2000) entre outros autores, purificaram, expandiram e caracterizaram células da medula óssea, as quais foram nomeadas células tronco mesenquimais.

Como proposto pelo Comitê de Células Tronco Mesenquimais da Sociedade Internacional de Terapia Celular, as CTM humanas são definidas como CD105, CD73 e CD90 positivas e negativas para CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19 e HLA. O marcador de superfície celular Stro-1 é considerado o melhor marcador para CTM, porém não é exclusivo para esse tipo celular e a expressão do mesmo não é mantida durante sucessivas passagens (KOLF et al., 2007).

Sendo do grupo das CTA, as CTM também são isoladas a partir de vários tecidos do organismo, tais como músculo, derme, cartilagens articulares, fígado, baço, timo e também tecido adiposo (BIANCO; COSSU, 1999). Atualmente existem três hipóteses para justificar a presença das CTM nos mais diferentes órgãos do organismo. A primeira considera que estas células são originadas de um tecido ou órgão específico, sendo posteriormente liberadas na circulação em situação de injúria tecidual. A segunda possibilidade baseia-se no fato de que as CTM possam ser isoladas a partir de diferentes tecidos, sendo que as culturas apresentam morfologia semelhante a fibroblastos, além de serem morfológica e fenotipicamente similares entre si (ZUK et al., 2001). A teoria mais justificável foi recentemente proposta, baseando-se na relação das CTM com o nicho perivascular. Esta hipótese justifica a presença destas células nos mais diferentes tecidos.

Uma das características das CTM, quando cultivadas em baixa densidade, é a rápida adesão com formação de colônias (BAKSH et al., 2004). Além disso, muitos autores demonstraram a alta eficiência destas células em se diferenciarem para outros tipos celulares de origem mesodermal, quando induzidas e utilizando meios de cultivo adequados. As CTM se diferenciam para osteoblastos, adipócitos, condrócitos e cardiomiócitos. Barry (1999) demonstrou a capacidade destas células em se diferenciarem também para células neurais e endoteliais. Em relação à morfologia, a microscopia de luz revela células fibroblastóides alongadas, fusiformes e pontiagudas, com núcleos ovais, grandes e centrais e citoplasma abundante. Quando senescentes, elas são grandes, largas, achatadas e proliferam-se lentamente (FEHRER; LEPPERDINGER, 2005).

A utilização de CTM em estudos pré-clínicos e clínicos em doenças cardíacas e pulmonares se mostrou muito eficiente não apenas nos seres humanos, mas também em outros animais, como por exemplo, os equinos (FRISBIE; SMITH, 2010). Outra característica importante destas células a ser considerada na terapia celular são os efeitos parácrinos por meio da secreção de moléculas bioativas no tecido enxertado (NASEF, 2008). As CTM enxertadas possuem uma ação benéfica para o organismo através das suas propriedades anti-apoptótica, anti-fibrótica e angiogênica (ZHANG et al., 2007).

2.2 POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO

A propriedade mais explorada das CT é a sua capacidade de diferenciação. Pode-se definir diferenciação celular como um processo pelo qual se originam as diferenças entre as células de um indivíduo, caracterizada em termos estruturais e funcionais. Esta diferenciação ocorre através de uma variedade de fatores indutores que controlam este mecanismo (DORSHKIND, 2002). A transdução dos sinais recebidos pela célula resulta então na repressão de certos genes e ativação de outros. Os fatores de transcrição levam a uma expressão coordenada desses genes, sendo que a interação entre esses fatores conduz a um padrão de resposta específico. Enzimas, peptídeos, receptores, canais iônicos e moléculas de adesão, entre outros, são regulados pela expressão gênica (GLEZERA et al., 2000). As modificações no padrão dessas expressões são responsáveis pela diferenciação das CT. Em geral, a diferenciação celular é acompanhada da perda simultânea de outras possibilidades de diferenciação, ou seja, da perda da sua plasticidade.

Quanto à capacidade de originar os tecidos do organismo, as CT podem ser classificadas como:

- **Totipotentes:** são aquelas células capazes de dar origem a todas as células presentes no organismo e também aos anexos extra-embrionários;
- **Pluripotentes:** um pouco mais restritas que as totipotentes, estas podem originar quase todos os tipos celulares;
- **Multipotentes:** mesma definição de pluripotentes. Muitos autores dizem que pluripotência e multipotência são sinônimos; porém este termo é mais utilizado para CTA;
- **Oligopotentes:** são células um pouco mais diferenciadas (ou comprometidas) e podem produzir poucas células no organismo;

- **Unipotentes:** produzem somente um único tipo celular maduro.

Em resumo, à medida que as CT se diferenciam, elas perdem o seu potencial proliferativo e a sua diferenciação se torna mais restrita.

2.3 CÉLULAS TRONCO E A MEDICINA REGENERATIVA

Nos últimos anos, uma nova área da medicina vem sendo desenvolvida, abrindo perspectivas inovadoras para o tratamento de doenças até então consideradas incuráveis, é a chamada medicina regenerativa, que consiste na utilização de células, fatores de crescimento e biomateriais que permitem ao próprio organismo reparar tecidos e órgãos lesionados (ASSMUS et al., 2002). Devido às diversas características das CT, estas células se tornaram de grande importância para esta nova área da medicina.

Naturalmente, nosso organismo apresenta CT nos variados tipos de tecidos. No caso de uma lesão, ocorre a migração destas células do sangue periférico para o local injuriado, visando o reparo do mesmo. Células já diferenciadas podem também se proliferar em resposta a agressões teciduais, indicando que o processo de regeneração ocorre nestes tecidos, contudo, tal regeneração pode não ser suficiente e eficiente o bastante para recuperar totalmente a lesão. Por este motivo, o crescente estudo de métodos para a realização de transplantes utilizando CT vem sendo aprimorados nesta área de pesquisa, seja transplantando CT indiferenciadas diretamente no órgão lesionado, ou transplantando CT parcialmente diferenciadas.

2.4 O TECIDO ADIPOSEO COMO FONTE DE CÉLULAS TRONCO

O futuro da terapia celular, tal como a engenharia de tecidos, depende de uma fonte de CT pluripotentes (FOLLMAR et al., 2007; HAN et al., 2007). Para engenharia de tecido mesodérmico, uma fonte destas células é o estroma da medula óssea. Entretanto, a aquisição da

medula óssea tem suas limitações. Uma fonte alternativa de CTA que seja obtida em grandes quantidades, com anestesia local, com um mínimo de desconforto ao doador, deverá ser vantajosa. Zuk et al. (2001) isolaram do tecido adiposo humano, coletado por lipoaspiração, uma população de células semelhantes a fibroblastos, denominados como Células Tronco do Tecido Adiposo Humano ou CTAH. As CTAH podem ser mantidas *in vitro* por longos períodos como uma população que se divide estavelmente e com baixos níveis de senescência. A imunohistoquímica e a citometria de fluxo mostraram que a maioria das CTAH é de origem mesodérmica ou mesenquimal, com baixos níveis de pericitos contaminantes (células endoteliais e células musculares lisas). Finalmente, as CTAH diferenciaram-se *in vitro* para células adipogênicas, condrogênicas e osteogênicas na presença de fatores indutores de linhagem específica. Esses dados reforçam a hipótese que o lipoaspirado humano contém células multipotentes e representam uma fonte alternativa de CT comparada às CTM da medula óssea.

Vidal et al. (2007) analisaram as características e a frequência de crescimento, além do potencial de diferenciação osteogênico e adipogênico de células estromais isoladas a partir de tecido adiposo de equinos. Como resultado, eles observaram que as células isoladas apresentavam um alto índice de crescimento nos primeiros dez dias de cultivo, sendo que a partir deste período esta taxa decaía, sugerindo a senescência destas células. Quanto às diferenciações, as colorações por *fosfatase alcalina* e *Oil Red O* comprovaram a eficiência das diferenciações osteogênica e adipogênica, respectivamente. Tal resultado foi observado mesmo nas passagens subsequentes. Os autores concluíram que apesar das características de crescimento e do potencial de diferenciação revelarem algumas diferenças quando comparados àqueles resultados já descritos na literatura científica, o tecido adiposo é uma fonte promissora para obtenção de CTA visando à aplicação clínica na medicina veterinária de equinos.

2.5 CÉLULAS TRONCO E SUA APLICAÇÃO TERAPÊUTICA EM EQUINOS

A aplicação terapêutica de CT em equinos é um campo emergente. Em cavalos, estas células se mostram extremamente promissoras para o tratamento de diversas doenças, a exemplo, artrites, lesões nos tendões e ruptura de ligamentos, uma vez que estes animais frequentemente

sofrem tais injúrias e as CT podem servir como um instrumento para ajudar na melhoria da qualidade de regeneração dos ligamentos e tendões lesionados (LACITIGNOLA, 2008). As terapias tradicionais se limitam a minimizar o processo inflamatório e a dor, não tendo efeito na regeneração do tecido lesionado. Tais terapias resultam, frequentemente, na formação de cicatrizes com a perda parcial ou total da função tecidual. Um bom exemplo são as lesões tendíneas, nas quais a cicatriz é constituída de fibras menos organizadas e uma menor concentração de colágeno. Esta conformação resulta na não restauração da morfologia e da força do tendão o que conseqüentemente, o torna mais suscetível a novas lesões. Desta forma, as terapias tradicionais permitem que o animal se recupere, porém, a qualidade do tecido não será a mesma. Em se tratando de equinos, proprietários e veterinários estão constantemente em busca de novas terapias que propiciem resultados mais efetivos.

Apesar do grande número de dados científicos, que demonstram a eficácia clínica da terapia com células tronco em modelos animais com osteoartrites, defeitos osteocondrais, lesões tendíneas e fraturas (NIEMEYER et al., 2006; MESIMÄKI et al., 2009), não existem na literatura dados a respeito do uso de células tronco para o tratamento de outras desordens sistêmicas que acometam estes animais, tais como a endometrose.

Dentre algumas doenças que acometem os equinos, a endometrose é uma desordem que possui grande relevância para a área da medicina veterinária, uma vez que, é responsável pelas maiores causas de infertilidade em éguas.

2.6 ENDOMETROSE

O termo endometrose substituiu o termo “endometrite degenerativa crônica” e foi citado pela primeira vez por Kenney (1992), que o definiu como diferentes alterações do endométrio dos equinos. Atualmente, esta doença é definida como a atividade alterada ou inatividade das glândulas do endométrio, podendo ser caracterizada por um processo progressivo e irreversível, correlacionado com a idade do animal, que leva à degeneração do tecido endometrial e à formação de um tecido fibroso periglandular que pode afetar tanto as glândulas isoladas quanto os ninhos glandulares (HOFFMANN et al., 2008). Apesar da grande importância desta doença

para a medicina veterinária, pouco é conhecido a respeito da endometriose, e sua etiologia e patogenia permanecem desconhecidas (HOFFMANN et al., 2003). Alguns autores acreditam que infecções uterinas repetidas ou persistentes poderiam, ao causar inflamação do endométrio, levar ao desenvolvimento da fibrose periglandular, porém outros fatores, tais como agressões frequentes (coito, infecções ou gestação) ao endométrio poderiam agravar a doença (CARNEVALE; GINTHER, 1992; CADARIO et al., 2002). Por se tratar de um processo progressivo, vários tratamentos, como por exemplo, a curetagem do endométrio, foram propostos, porém não obtiveram sucesso na redução do processo fibrótico ou na melhoria da fertilidade (ASBURY; LYLE, 1993). Apesar dos constantes avanços pela busca do conhecimento de como surgiu e de que maneira poderia ser tratada esta doença, ainda resta muito a ser descoberto.

O início da endometriose é caracterizado pela presença de feixes periglandulares de colágeno e camadas concêntricas de fibroblastos (RAILA et al., 1997). O primeiro estágio da doença é caracterizado pela presença de grandes células estromais com morfologia poligonal que produzem fibras de colágeno (Figura 1), sendo que em um estágio mais avançado, estas células passam a não mais sintetizar colágeno e grande parte se diferencia para miofibroblasto. Os miofibroblastos secretam diferentes mediadores que podem afetar a composição da matriz extracelular, além de proporcionarem contratibilidade às glândulas uterinas, prejudicando a função das mesmas (HOFFMANN et al., 2008).

O grau de endometriose é determinado pela frequência de glândulas com fibrose e formação de ninhos, bem como pelo número de camadas de fibrose (KENNEY; DOIG, 1986).

A fibrose periglandular difusa, independentemente do grau de severidade, tem um maior efeito nocivo na capacidade do útero em levar uma gestação a termo, quando comparada a alterações localizadas. Por isso, a frequência com que aparecem os ninhos de fibrose é um fator importante na classificação do grau de endometriose (KENNEY, 1978).

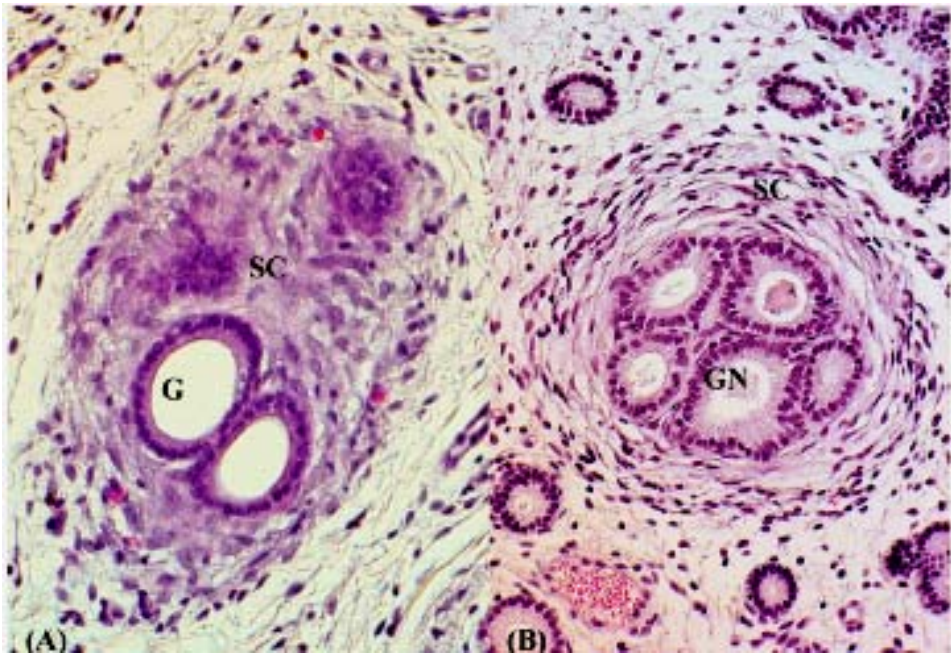


Figura 1 - Biópsia uterina de égua com Endometrose. (G) glândulas isoladas, (GN) ninhos glandulares e (SC) células estromais, Fonte: Hoffmann et al., 2008

Apesar de ser uma doença bastante destrutiva, a endometrose só é diagnosticada quando os animais passam a apresentar algum sintoma característico, tal como uma baixa taxa de fertilidade sem nenhum motivo aparente. A partir da observação dos sintomas, devem ser realizados exames diagnósticos a fim de confirmar ou não a doença.

2.7 O ÚTERO DA ÉGUA

O útero das éguas é composto por três camadas: endométrio (mucosa), miométrio (muscular) e perimétrio (camada serosa).

A mucosa do lúmen uterino é revestida por células epiteliais, que variam de cúbicas a cilíndricas altas. Abaixo do epitélio está a lâmina própria, que foi dividida por Kenney (1978) em estrato compacto e estrato esponjoso. O estrato compacto é formado por muitas células do estroma e capilares. No estrato esponjoso encontram-se algumas células do estroma, artérias,

veias e vasos linfáticos, bem como as glândulas endometriais. Vogel e Humke (1973) denominam a camada entre o endométrio e o miométrio de estrato subglandular, rico em vasos e pobre em glândulas. O miométrio é formado por uma grossa camada circular interna e uma fina camada longitudinal externa e, entre elas, está o estrato vascular. Sobreposto ao miométrio fica o perimétrio, formado por tecido conjuntivo frouxo, vasos e nervos, coberto por mesotélio peritoneal (DELLMANN; BROWN, 1987).

As características histológicas observadas nas biópsias endometriais podem ser fisiológicas (cíclicas ou estacionais), patológicas ou artefatos (KENNEY, 1978). A interpretação correta das mudanças depende do conhecimento de mudanças cíclicas e estacionais do endométrio. Características cíclicas a serem observadas são: a altura do epitélio luminal, a configuração das glândulas e a quantidade de edema na lâmina própria (DOIG; WAELCHLI, 1993).

O ciclo reprodutivo das éguas é dividido nas seguintes fases: anestro, proestro, estro e diestro. Sendo o anestro a fase em que não há atividade cíclica e corresponde a maior parte da vida de uma fêmea; o proestro compreende a fase mais curta do ciclo, e antecede o estro; o estro é a fase receptiva, ou seja o período fértil da égua. Nesta fase a irrigação uterina é maior, uma vez que a fêmea está à espera da monta e conseqüentemente do embrião fecundado. Caso não ocorra a monta e a fecundação do óvulo, a égua entra em diestro, última fase do ciclo reprodutivo. Neste trabalho, o enfoque é na fase do estro. O ciclo estral da égua tem duração de 18 a 22 dias, tempo entre uma ovulação e outra, e é dividido nas seguintes fases:

Proliferativa (8 a 9 dias) ⇒ Pró-estro (3 dias); estro (2-3dias); pós-estro (3 dias);

Secretória (9 dias) ⇒ inter-estro inicial e intermediário;

Involutiva (4 dias) ⇒ inter-estro final.

Na fase proliferativa, as células do epitélio luminal e do epitélio das glândulas são prismáticas altas, com grandes núcleos ovais a redondos, hipocromáticos. As glândulas estão distendidas. Na fase secretória, as células do epitélio luminal são isoprismáticas a cúbicas, com núcleos ovais a redondos. As glândulas são tortuosas, o lúmen é maior e seu epitélio é baixo, com vacúolos secretórios na parte apical do citoplasma e núcleos redondos. Na fase involutiva as células epiteliais das glândulas tem núcleos pequenos, redondos e hipercromáticos. As glândulas começam a perder a tortuosidade (KELLER, 2004).

2.8 BIÓPSIAS UTERINAS

A biópsia uterina faz parte do exame ginecológico para avaliar a capacidade reprodutiva das éguas. Sua maior importância consiste na determinação da capacidade do útero em levar uma gestação a termo, sempre relacionada aos achados clínicos, laboratoriais e outros dados relevantes, tais como a idade, o número de crias e o comportamento do animal. A técnica também é útil em detectar mudanças associadas à baixa fertilidade, não facilmente diagnosticadas por outros métodos (DOIG; WAELCHLI, 1993). A biópsia endometrial é indicada para qualquer égua não gestante com suspeita de alguma alteração uterina.

A biópsia uterina é indicada nas seguintes situações:

1. Constatação de problemas do trato genital;
2. Infertilidade após inseminações/coberturas em três ou mais ciclos numa mesma temporada de monta, com sêmen de comprovada fertilidade;
3. Éguas com histórico de perda embrionária precoce ou aborto;
4. Comportamento de anestro durante a temporada fisiológica de monta, bem como hipoplasia de ovários e genitália;
5. Antes e depois de uma intervenção cirúrgica no trato genital;
6. Avaliação de fertilidade;
7. Monitoramento dos resultados de uma terapia uterina.

A retirada da amostra uterina pode ser feita em qualquer fase do ciclo estral (KENNEY; DOIG, 1986), sem causar problemas clínicos. Porém, de acordo com Neely (1983), para uma avaliação correta do grau de fibrose endometrial, o diestro é a melhor fase do ciclo para a coleta da amostra, pois o útero apresenta maior concentração de glândulas. Um endométrio em anestro é hipoplásico e subdesenvolvido, sendo difícil a avaliação da fibrose. Da mesma forma, durante o estro, as glândulas estão presentes em menor quantidade, separadas pelo edema, que pode ser consequência da influência do estrógeno ou de uma inflamação (neste caso acompanhado de células inflamatórias).

Segundo Watson e Sertich (1992), coletas repetidas de amostras não tem efeito negativo sobre a taxa de parição. Os autores coletaram biópsias endometriais de éguas duas, três ou quatro

vezes num período de 50 dias, inclusive durante os dias de cobertura, e observaram que seis das sete éguas estudadas ficaram prenhas (KELLER, 2004).

2.9 TRATAMENTO DA ENDOMETROSE

Por se tratar de um processo progressivo e irreversível, vários tratamentos foram propostos para endometrose, porém nenhum deles obteve sucesso na redução do processo fibrótico ou na melhoria da fertilidade (HOFFMAN et al., 2008). Muitas tentativas de realizar uma curetagem química, também não obtiveram sucesso na melhoria do tecido uterino afetado pela doença.

Levando em consideração o que foi descrito, e o fato de que não existir na literatura dados a respeito do uso de células tronco na terapia da endometrose, propomos o uso de células tronco mesenquimais, previamente isoladas e caracterizadas pelo nosso grupo, como um possível tratamento para a endometrose em éguas.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivos testar a capacidade das células tronco, isoladas a partir de tecido adiposo de equinos, na diminuição do processo inflamatório, bem como na redução do tecido fibroso periglandular, característicos da endometriose.

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos do presente projeto envolvendo o uso de animais foram conduzidos após aprovação da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP). Projeto protocolado sob o n° 1804.

4.1 ANIMAIS

Foram utilizadas seis éguas (Lobuna, Cumparsita, Trairona, Amanda, Ki-Rumba e Czarina) em fase cíclica com idade entre 6 e 21 anos. A atividade reprodutiva cíclica foi determinada através de palpação retal e ultra-sonografia, sendo a identificação de um corpo lúteo o critério para a utilização do animal no experimento. As éguas foram mantidas exclusivamente em pastagem (campo nativo melhorado, através de correção, adubação e semeadura de espécies forrageiras hibernais), sendo suplementadas duas vezes ao dia, com uma combinação de aveia branca e ração comercial (contendo 12% de proteína bruta) e sal mineral. A área está dividida em cinco piquetes, a fim de permitir a rotação de acordo com a condição da pastagem, sendo a lotação média de dois animais por hectare. A área destinada aos animais fica junto à Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), situada na Avenida Bento Gonçalves, número 9090, em Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

4.2 ISOLAMENTO, CULTURA E EXPANSÃO DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DE TECIDO ADIPOSEO DE EQUINOS

Os procedimentos de isolamento, cultivo, expansão e congelamento das CTM foram previamente descritos por Mambelli et al. (2009). Brevemente, as amostras de tecido adiposo foram coletadas sob condições assépticas durante cirurgias de rotina. Para o isolamento das células derivadas do tecido adiposo, os fragmentos de gordura foram lavados extensivamente com solução salina (PBS), cortados em pequenos pedaços e enzimaticamente digeridos utilizando colagenase tipo I (Gibco, Carlsbad, CA, EUA) 0,075% por 30 minutos em constante agitação a uma temperatura de 37 °C. O tecido digerido foi filtrado (100 um) para obter a fração celular estromal-vascular, que foi então re-suspendida em meio de cultura basal (meio para células indiferenciadas) *Dulbecco's Modified Eagle's medium-high glucose* (DMEM-HG, Gibco), suplementado com 15% de soro fetal bovino (Hyclone - Logan, Utah, EUA), 1% de L-Glutamina (100x), 1% de Aminoácidos não Essenciais e 1% de antibiótico-antimicótico Penicilina G 10,00U/ml, Anfotericina b – 25ug/ml, Estreptomina – 10,000ug/ml, todos da Gibco. Em seguida, as células foram semeadas em placas de cultura de 100 mm na concentração 5×10^5 . Após 24 horas, as células não aderentes foram removidas por meio de lavagem (3 vezes) com PBS e troca do meio de cultura. As células foram cultivadas em estufa de CO₂ (5%), com atmosfera úmida a uma temperatura de 37°C até atingirem a semi-confluência (aproximadamente 80%). Em seguida, uma parte das células foi congelada contando a passagem 1 e guardadas em nitrogênio líquido, enquanto a outra parte foi repicada várias vezes a fim de expandir a cultura sob as condições descritas acima.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS ISOLADAS A PARTIR DE TECIDO ADIPOSEO DE EQUINOS

As CTM foram previamente caracterizadas (MAMBELLI et al., 2009) por diversos métodos descritos na literatura científica, a exemplo o método de *cell doubling* (VIDAL et al., 2006), análise de cariótipo (WENCESLAU et al., 2010 submetido) e ensaios de diferenciação (ZUK et al., 2002).

4.3.1 Método de *Cell Doubling*

A capacidade de proliferação *in vitro* das células tronco isoladas a partir do tecido adiposo de equinos foi avaliada através do método de duplicação celular ou *cell doubling*, previamente descrito por Mambelli et al. (2009). As células foram cultivadas em garrafas T25 (Corning, NY, EUA) com meio basal até atingirem confluência de aproximadamente 70%. Neste ponto, estas foram tripsinizadas e contadas com o auxílio da câmara de Neubauer e então replaqueadas, em duplicata, sob a densidade de 1×10^5 células em novas garrafas T25 (Corning). A cada três dias, elas eram novamente tripsinizadas, contadas e replaqueadas. Esse processo se deu a partir da passagem dois (P2) até a passagem 23 (P23).

4.3.2 Análise de Cariótipo

As células foram mantidas em cultivo com meio basal até atingirem confluência de aproximadamente 70%. Neste ponto, Demecolcina (Sigma, St. Louis, Mo., EUA), em uma concentração final de 0.07 µg/ml, foi adicionada a cultura e mantida por seis horas. Após este período, as células foram tripsinizadas, centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos, ressuspensas em 5 ml de 0.075 M KCl e incubadas por 30 minutos em banho-maria a

37°C. Em seguida, as células foram novamente centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos e 5 ml do fixador gelado foi adicionado, ressuspensando levemente o *pellet*. O fixador é composto por ácido acético e metanol, na proporção 1:3. Adicionado o fixador, as células foram mantidas em geladeira por 20 minutos. Este procedimento foi repetido duas vezes. No dia seguinte, as lâminas foram confeccionadas, coradas por meio da coloração de *Giemsa* e as metáfases celulares foram analisadas em um microscópio óptico (Nikon-Eclipse E-800).

4.3.3 Ensaios de Diferenciação

Todos os ensaios de diferenciação foram realizados em triplicata, antes e após o procedimento de criopreservação. O meio dos experimentos controles (meio basal) foi o mesmo para todas as diferenciações.

4.3.3.1 Diferenciação Osteogênica

Para diferenciação osteogênica, cerca de 5×10^3 células foram cultivadas em placas de 6 wells. Após 24 horas, o meio basal foi substituído pelo meio de diferenciação *DMEM-Low Glucose* (DMEM-LG; Gibco) suplementado com 2% de soro *Knockout* (Gibco), 1% Penicilina/Streptomicina e com os indutores osteogênicos (100 μ M dexametasona e 50 μ M de 2-fosfato ácido ascórbico, ambos da Sigma). As trocas de meio foram realizadas a cada três ou quatro dias. No 10º dia da diferenciação, ambos os meios de cultura (experimental e controle) foram refeitos sendo suplementados com 200 mM de β -Glicerolfosfato (Sigma). Após 21 dias de cultivo, as amostras foram avaliadas pela coloração de *von Kossa*, para determinar a deposição mineral, como descrito por Mambelli et al. (2009).

4.3.3.2 Diferenciação Adipogênica

Para diferenciação adipogênica, cerca de 5×10^3 células foram cultivadas em placas de 6 *wells*, com procedimentos semelhantes à diferenciação osteogênica. O meio de indução foi composto por DMEM-HG, com 2% de soro *Knockout* (Gibco), 500 μ M isobutilmetilxantina (Sigma), 10 μ M insulina (Sigma), 10 μ l dexametasona, 100 μ M endometacina (Sigma) e 1% antibiótico. A troca do meio indutor foi realizada duas vezes por semana e a cultura foi mantida por sete dias. Após este período, as células foram lavadas 3 vezes com PBS e fixadas por 60 minutos à temperatura ambiente com paraformaldeído 4%. A coloração por *Oil Red O* foi realizada, incubando as células com o corante, em temperatura ambiente por cinco minutos e após este período, o excesso deste foi retirado por meio de algumas lavagens com água destilada, como descrito por Mambelli et al. (2009).

4.3.3.3 Diferenciação Condrogênica

Para a diferenciação condrogênica, 4×10^6 células/ml foram centrifugadas, com meio basal, em um tubo de polietileno de 15 ml a 1500 rpm por 5 min. A seguir, as células foram ressuspensas em meio pré-indutor composto por DMEM-HG, com 1% *insulin transferinn selenium* (ITS, Sigma), 0,1% dexametasona, 1% piruvato de sódio (Sigma) e 0,1% 2-fosfato ácido ascórbico. A seguir, as células foram novamente centrifugadas a 500 x g por 5 min. Após terceira centrifugação, estas foram ressuspensas em meio condrogênico composto por DMEM-HG, com 1% ITS, 0,1% dexametasona, 1% piruvato de sódio, 0,1% 2-fosfato ácido ascórbico e 0,1% TGF β -1 (LGC Biotechnology, SP, Brasil). A troca do meio indutor foi realizada diariamente e a cultura foi mantida por 21 dias. Após este período, as células foram fixadas à temperatura ambiente com paraformaldeído 4% e emblocadas em parafina, para então serem cortadas e coradas com Azul de Toluidina e realizar o ensaio de

imunofluorescência utilizando anticorpos específicos (Agrecan e Colágeno tipo II, ambos da Chemicon, Temecula, CA, EUA) como descrito por Mambelli et al. (2009).

4.3.3.4 Diferenciação Miogênica

Para diferenciação miogênica, 1×10^5 células foram cultivadas em placas de 6 *wells*. Após 24 horas, o meio DMEM-HG suplementado com 10% de soro fetal bovino comum e também pelos indutores miogênicos (5% de *horse serum* e 100M de hidrocortizona, todos da Gibco) foi adicionado às culturas experimentais. As trocas de meio foram realizadas duas vezes por semana. Após 20 dias de cultivo, as amostras foram fixadas e posteriormente avaliadas por imunofluorescência utilizando os anticorpos específicos: anti-miosina e anti- α -actinina, como descrito por Zuk et al. (2002).

4.3.3.5 Diferenciação Neurogênica

Para diferenciação neurogênica, cerca de 1×10^5 células foram cultivadas em placas de 6 *wells*, com procedimentos semelhantes à diferenciação miogênica. O meio de diferenciação foi composto por DMEM-HG, com 20% de soro fetal bovino e 1mM de monoetilglicerol (Sigma). A troca do meio indutor foi realizada todos os dias e a cultura mantida por uma semana. Após este período, as células foram fixadas por 60 minutos a temperatura ambiente com paraformaldeído 4% e lavadas algumas vezes com etanol 70%. Então foi realizada a imunofluorescência utilizando anticorpos específicos anti- β -tubulina III e anti-oligodendrócito (ambos da Chemicon), como descrito por Zuk et al. (2002).

4.4 MARCAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO COM *VYBRANT*

No momento da infusão uterina, as células tronco de tecido adiposo de equinos foram marcadas com *Vybrant CFDA-SE CELL* (Nanocristal fluorescente - Excitação/Emissão máximas: 492/517 nm; cor verde; Invitrogen - n° de catálogo V12883) de acordo com as instruções do fabricante. Inicialmente, as células foram descongeladas e ressuspensas em meio de descongelamento composto por: DMEM-HG (Gibco) suplementado com 15% de SFB (Gibco), seguido de centrifugação a 1000 rpm por 5 minutos. Descartado o sobrenadante, as células foram ressuspensas em PBS pré-aquecido a 37°C e incubadas com a *probe* em uma concentração de 25 µM por 20 minutos em banho-maria também a 37°C. As células foram novamente centrifugadas, ressuspensas em meio (DMEM-HG (Gibco) + 15% SFB (Gibco) + 2% antibiótico (Gibco)) pré-aquecido e então incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente para completar a modificação da *probe*. Em seguida, as CTM foram novamente centrifugadas e ressuspensas em 20 ml de solução fisiológica 0,1% para infusão.

4.5 SINCRONIZAÇÃO DOS ANIMAIS

Para realizar a sincronização das éguas no estro, foi injetado via intramuscular (v.I.), 1 ml do hormônio Lutalyse® (PGF2alfa), entre os dias cinco e quatorze do ciclo estral, sendo o dia zero o momento da ovulação, que foi determinado através de palpação retal e ultrassonografia do ovário. Este fármaco, que age apenas em corpos lúteos maduros, foi administrado com o objetivo de promover a luteólise, ou seja, lise do corpo lúteo, bem como uma tentativa de fazer com que os animais entrem no cio juntos. Vale lembrar que o início do cio leva de 3 a 5 dias e depende dos níveis circulantes de Hormônio Folículo Estimulante (FSH), quando ocorre a luteólise. Desta forma, com no máximo duas aplicações de PGF2alfa, em cada égua, se consegue sincronizar o lote.

4.6 COLETA DAS BIÓPSIAS ENDOMETRIAIS E INFUSÃO UTERINA DAS CÉLULAS TRONCO

As éguas foram controladas através de palpação retal e ultrassonografia periodicamente. Uma vez em cio, passamos a realizar o controle de folículo, avaliando-se também, o grau de edema uterino e a presença de fluido intra-uterino, especialmente visando à detecção da ovulação. Todos os procedimentos de coleta de biópsia uterina e aplicação das células tronco foram realizados no 8º dia do ciclo (ovulação=dia zero).

Para a realização da coleta da biópsia endometrial (Figura 2), as éguas foram contidas em brete, não sendo necessária a utilização de nenhum tipo de fármacos, uma vez que são procedimentos rápidos e que não representam nenhum risco à saúde ou bem estar dos animais. Não há necessidade de jejum prévio à coleta ou infusão, nem procedimentos específicos outros do que aqueles previstos no protocolo experimental, durante ou após a realização dos mesmos.

Antes da infusão das células tronco, foram coletadas amostras para exames citológico, bacteriológico (MATTOS et al., 1984) e histopatológico (RICKETTS, 1975). Para a inoculação das células tronco, as éguas foram preparadas da mesma maneira descrita para a coleta da biópsia endometrial. Após a limpeza da área perianal (Figura 3), o material foi infundido no útero através de uma pipeta descartável, que foi passada através do colo uterino após abertura com a mão vestindo luva descartável lubrificada. Uma vez que a extremidade livre estava localizada no corno uterino direito, a pipeta foi acoplada à seringa contendo as células através de um conector de borracha estéril, sendo em seguida infundido 10 ml do volume total (20 ml) contido em seu interior. Em seguida, a extremidade livre foi colocada no corno uterino esquerdo e o restante (10 ml) do volume contido na seringa foi infundido. Imediatamente após, uma segunda seringa, contendo 3 ml de solução de cloreto de sódio a 0,9% estéril, foi acoplada à pipeta e seu volume infundido para garantir a infusão do volume contido na pipeta e no conector (Figura 4).



Figura 3 - Limpeza da região perianal



Figura 2 - Coleta das biópsias endometriais



Figura 4 - Infusão das células tronco

4.7 ANÁLISE DA CITOLOGIA ENDOMETRIAL DAS AMOSTRAS OBTIDAS ANTES E DEPOIS DE 7, 21 E 61 DIAS DA INFUSÃO DAS CÉLULAS TRONCO

Para a coleta das amostras de citologia endometrial utilizamos espéculo de *polanski*, pinça de *swab* e pinça de cérvix. Inicialmente introduzimos o espéculo, localizamos e pinçamos a cérvix, em seguida, inserimos o *swab* com auxílio da pinça, o esfregamos no endométrio e o mesmo foi retirado, protegido pela pinça para que não houvesse contaminação. Logo após a coleta, rolamos o *swab* numa lâmina de vidro e deixamos secar ao ar. Para a análise microscópica, realizamos a coloração de panótico *Pappenheim* ou mesmo que panótio rápido, a qual nos permite identificar a presença ou ausência de neutrófilos polimorfonucleares, que caracterizam a endometrite, estágio inicial da endometrose.

4.8 ANÁLISE HISTOLÓGICA DAS BIÓPSIAS UTERINAS OBTIDAS ANTES E DEPOIS DE 7, 21 E 61 DIAS DA INFUSÃO DAS CÉLULAS TRONCO

Após 7, 21 e 61 dias da infusão das CT, foram obtidas novas biópsias uterinas das regiões do corno esquerdo, corno direito e corpo uterino seguindo o mesmo protocolo descrito anteriormente. Estas amostras foram lavadas em PBS, armazenadas em paraformaldeído 10% e então processadas e incluídas em parafina. O tecido emblocado foi cortado (5 µm) sobre lâminas previamente silanizadas. Estes cortes foram lavados e corados com Hematoxilina/Eosina e também *Alcian Blue* para então ser analisado o aspecto morfológico do tecido endometrial, bem como das glândulas uterinas.

4.9 LOCALIZAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO NAS BIÓPSIAS UTERINAS

Para avaliar a capacidade das CT de enxertarem no endométrio, foi utilizado o método de fluorescência direta. Uma vez que as células já estavam marcadas com *Vybrant* (FITC) antes do momento da infusão, apenas foi pipetado, sobre as lâminas previamente preparadas, o meio de montagem específico de imunofluorescência *Vectashield* com 4',6'-*Diamidino-2-phenylindol* (DAPI, Vector Laboratories, Burlingame, CA) para que as mesmas fossem analisadas por microscopia confocal (LSM 410, Zeiss, Jena, Germany).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ISOLAMENTO, CULTURA E EXPANSÃO DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DE TECIDO ADIPOSE DE EQUINOS

As células do tecido adiposo de equinos foram isoladas com sucesso por meio do método descrito anteriormente. Todas as amostras deram origem a células com aspecto de fibroblasto e após quatro dias em cultura já podiam ser observadas as primeiras colônias de células. No quinto dia, estas células foram tripsinizadas e uma parte foi criopreservada em passagem um (P1), enquanto o restante foi novamente plaqueado em garrafas T75 visando à expansão das mesmas. (Descrição detalhada e imagens se encontram no Apêndice A).

5.2 *CELL DOUBLING*, DIFERENCIAÇÕES OSTEOGÊNICA, ADIPOGÊNICA E CONDROGÊNICA *IN VITRO*

A capacidade proliferativa das células isoladas foi estudada. Para isso, utilizamos o método já descrito anteriormente por Vidal et al. (2006), denominado curva de crescimento (ou do inglês, *cell doubling*). Observamos uma rápida expansão destas células, durante 20 repiques, sem apresentar taxa significativa de senescência e também sem alterações morfológicas.

Visando caracterizar estas células quanto a sua origem mesodérmica, iniciamos os ensaios de diferenciações. *Osteogênese*. A capacidade destas células de se diferenciarem para a linhagem osteogênica foi comprovada, após 21 dias de cultivo em todas as amostras, por meio da coloração de *von Kossa* e pela análise de imunofluorescência utilizando anticorpos específicos. Cinco dias após a indução, pudemos observar uma significativa alteração morfológica das células em cultura, que alteraram sua morfologia com aspecto de fibroblastos, para células semelhantes à osteoblastos. Após onze dias de diferenciação, observamos o início da mineralização da matriz extracelular e o mesmo se confirmou após o término do experimento, em maior quantidade. Nos

controles, também realizados em duplicata, não observamos alterações na morfologia celular e poucas células tiveram marcação positiva para *von Kossa*. **Adipogênese.** A capacidade das células isoladas de se diferenciarem para a linhagem adipogênica foi comprovada, após sete dias de cultivo, também em todas as amostras, por meio da coloração Oil Red O. Quatro dias após a indução, pudemos observar uma significativa alteração morfológica das células em cultura, as quais adquiriram morfologia semelhante à adipócitos. Nos controles, também realizados em duplicata, observamos pouca alteração da morfologia celular e nenhuma célula corou positivamente para Oil Red O. **Condrogênese.** Em relação à diferenciação condrogênica, comprovamos, por meio da coloração Azul de Toluidina e também pela expressão de marcadores específicos, a capacidade das células tronco isoladas de se diferenciarem para condroblastos. Após 21 dias de cultivo, o pellet formado foi emblocado em parafina e cortado com o auxílio de um micrótomo. Algumas lâminas foram coradas por Azul de Toluidina e pudemos observar a formação de matriz extracelular de colágeno. As demais lâminas foram analisadas por imunofluorescência e pudemos observar uma forte marcação para os anticorpos propostos. Os controles foram as células indiferenciadas, também avaliadas por imunofluorescência, utilizando os mesmos anticorpos, e como esperado, não observamos marcação (Descrição detalhada e imagens se encontram no Apêndice A).

5.3 CARIÓTIPO

A análise das lâminas obtidas demonstrou que as células tronco de tecido adiposo de equinos apresentam cariótipo normal da espécie ($2n=64$ cromossomos). Esta característica foi observada mesmo após sucessivas passagens (Figura 5).

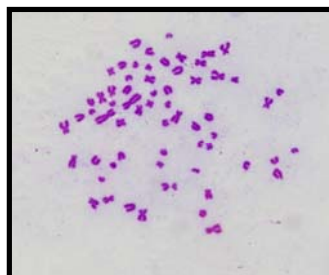


Figura 5 - Análise do cariótipo por coloração de Giemsa. Objetiva=100X

5.4 DIFERENCIAÇÃO MIOGÊNICA

Complementando os ensaios de diferenciação após a publicação do trabalho científico, verificamos que as células isoladas também são capazes de se diferenciar para células musculares. Esta capacidade foi comprovada após 30 dias de cultivo, por meio das análises de imunofluorescência e aspecto morfológico (Figura 6). Dez dias após a indução, observamos que as células em cultura alteraram a sua morfologia fibroblastóide para células mais alongadas e afiladas, sugerindo o início da diferenciação. Após 30 dias de diferenciação, comprovamos que estas células, organizadas semelhantemente a feixes musculares, eram positivas para anti- α -actinina (Figura 7a) e anti-miosina (Figura 8a). Não observamos, nos controles, alterações morfológicas e nem marcação positiva para os anticorpos propostos (Figuras 7 e 8b).

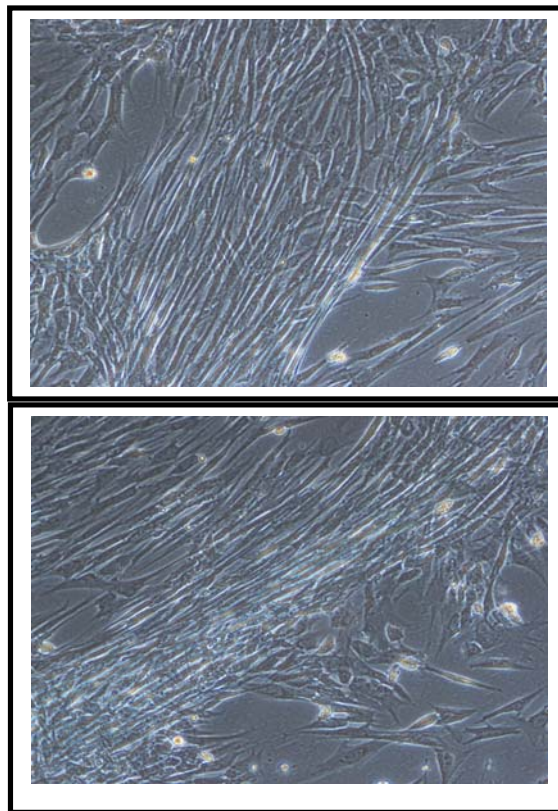


Figura 6 - Diferenciação Mio gênica. Células tronco de tecido adiposo de equinos em cultura com morfologia típica de células musculares. Objetiva=20x

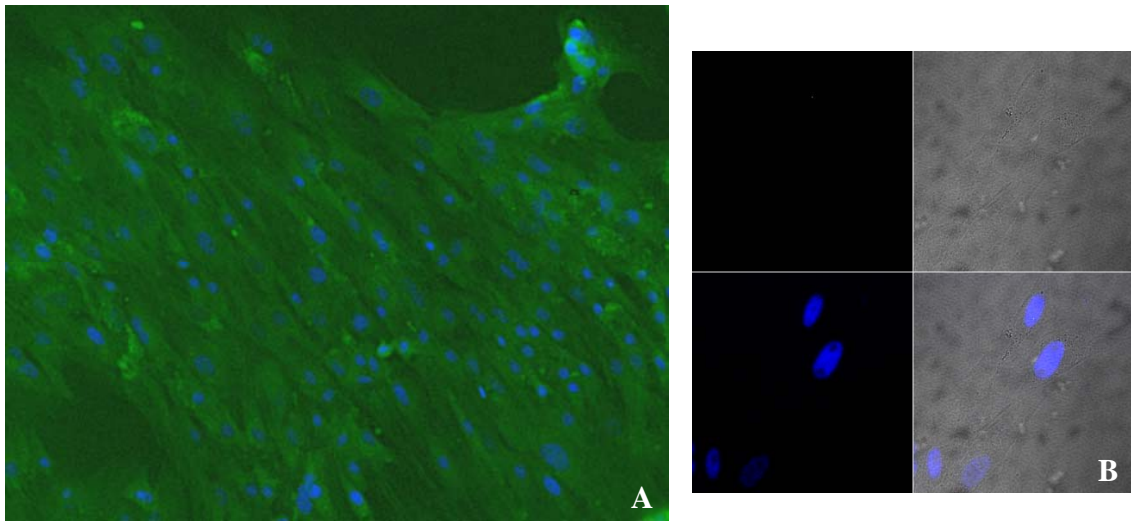


Figura 7 - Diferenciação Miogênica. Análise de imunofluorescência mostrando que as células diferenciadas apresentam marcação positiva para o anticorpo anti- α -actinina. Como esperado, os controles não expressam marcação. Núcleos corados por DAPI em azul. Objetiva=40x e 63x

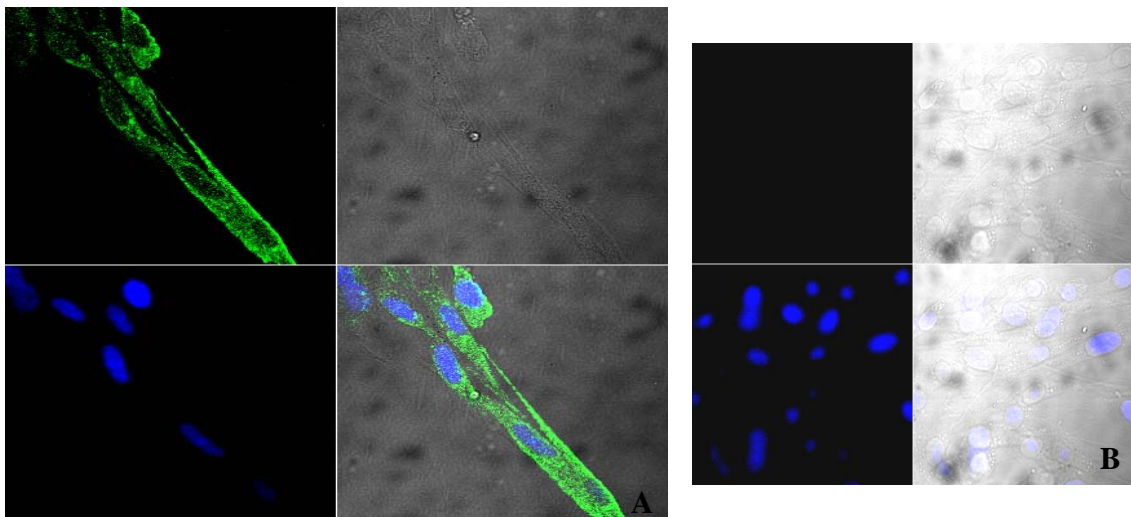


Figura 8 - Diferenciação Miogênica. Análise de imunofluorescência mostrando que as células diferenciadas apresentam marcação positiva para o anticorpo anti-miosina. Como esperado, os controles não expressam marcação. Núcleos corados por DAPI em azul. Objetiva=63x

5.5 DIFERENCIAÇÃO NEUROGÊNICA

Por último comprovamos que as células isoladas são capazes de se diferenciar para células com morfologia típica de neurônios. Esta capacidade foi demonstrada em todas as culturas, após 10 dias de cultivo com meio indutor, por meio de análises morfológicas (Figuras 9 e 11) e de imunofluorescência. Interessantemente, foi possível observar estruturas semelhantes a sinapses, sugerindo o estado funcional das células diferenciadas (Figura 10). Além disso, foi possível observar no mesmo cultivo a formação de estruturas semelhantes à neuroesferas (Figura 12). A imunofluorescência revelou que tanto as células isoladas quanto os “clusters” de células foram positivos para nestin, sendo que a neuroesfera teve marcação positiva no centro, enquanto nas periferias esta marcação era gradativamente perdida, sugerindo a maturação e diferenciação destas células ao redor destas estruturas (Figura 13). A marcação positiva para GFAP confirmou a presença de células da glia em nossos cultivos (Figura 14). As nossas células diferenciadas também foram positivas para β -tubulina III, marcador neuronal (Figura 15). Como esperado, os controles não tiveram marcação positiva para ambos os anticorpos (dados não apresentados).

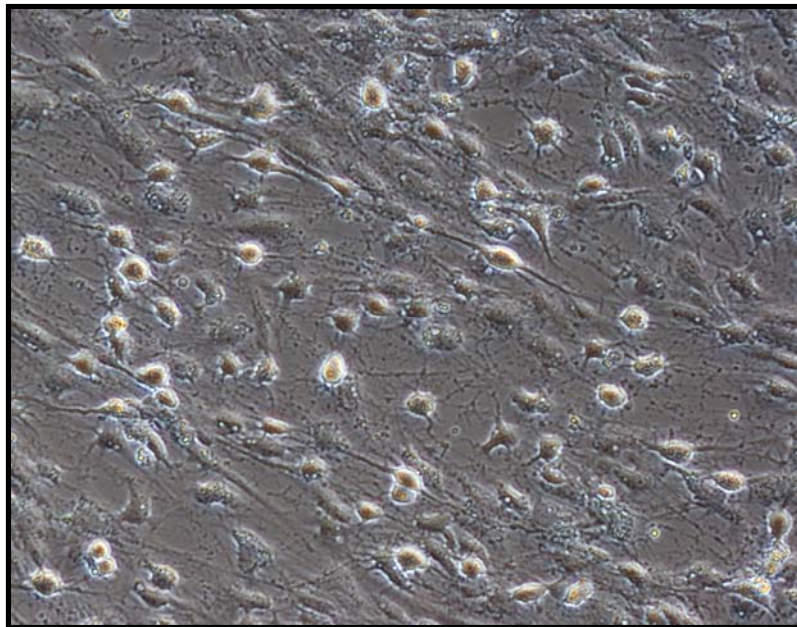


Figura 9 - Diferenciação Neurogênica. Células em cultura demonstrando morfologia semelhante a neurônios. Objetiva=40x

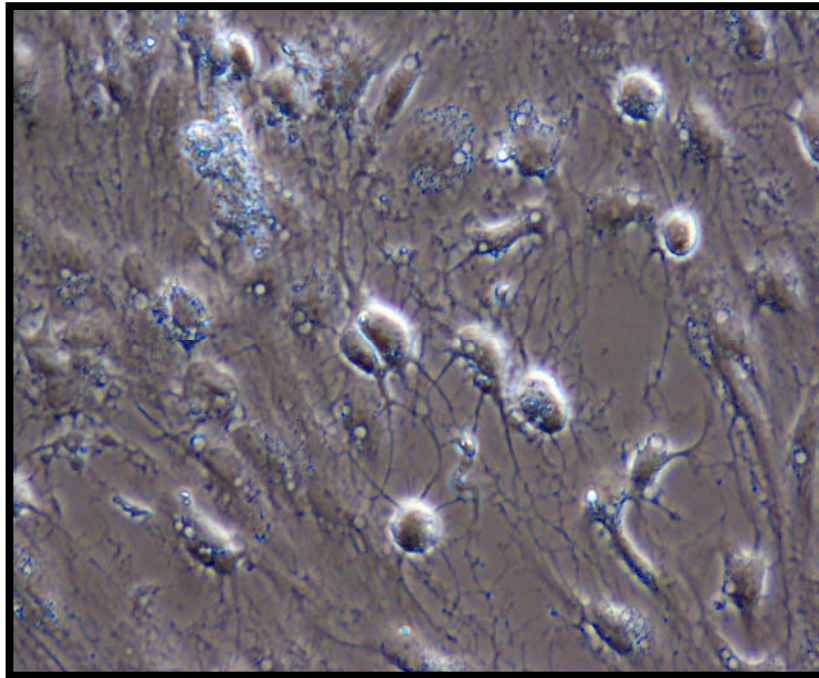


Figura 10 - Diferenciação Neurogênica. Células em cultura sugerindo, morfológicamente, a formação de sinapse. Objetiva=63x

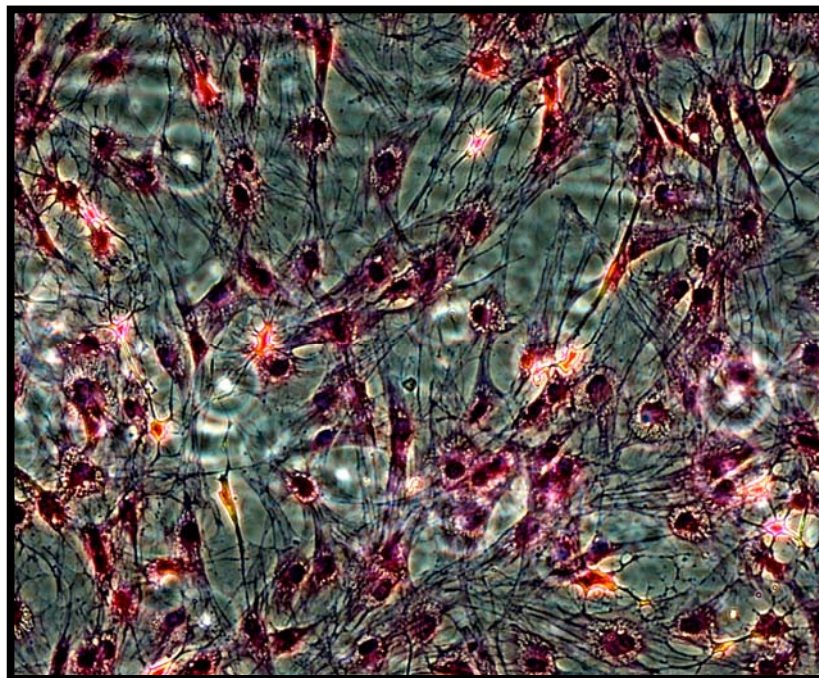


Figura 11 - Diferenciação Neurogênica. Células coradas por Hematoxilina/Eosina demonstrando morfologia semelhante a neurônios. Objetiva=20x

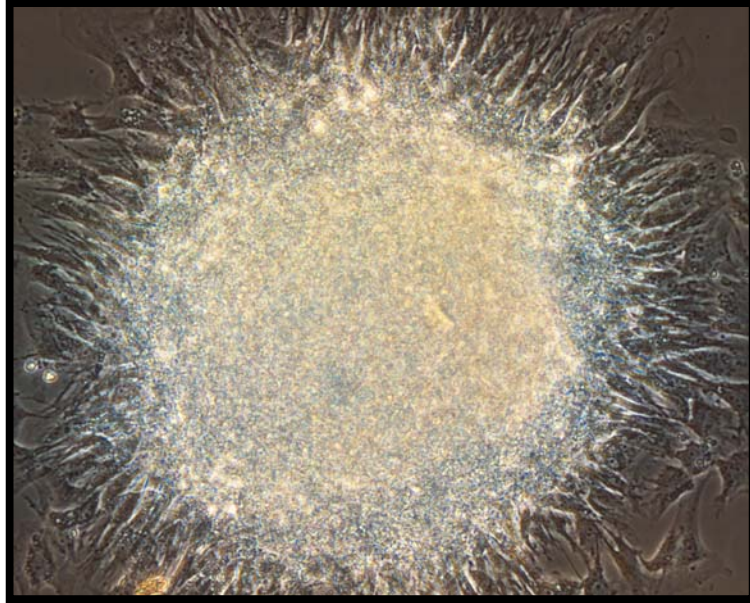


Figura 12 - Diferenciação Neurogênica. Células em cultura se diferenciaram para estrutura semelhante a neuroesfera. Objetiva=40x

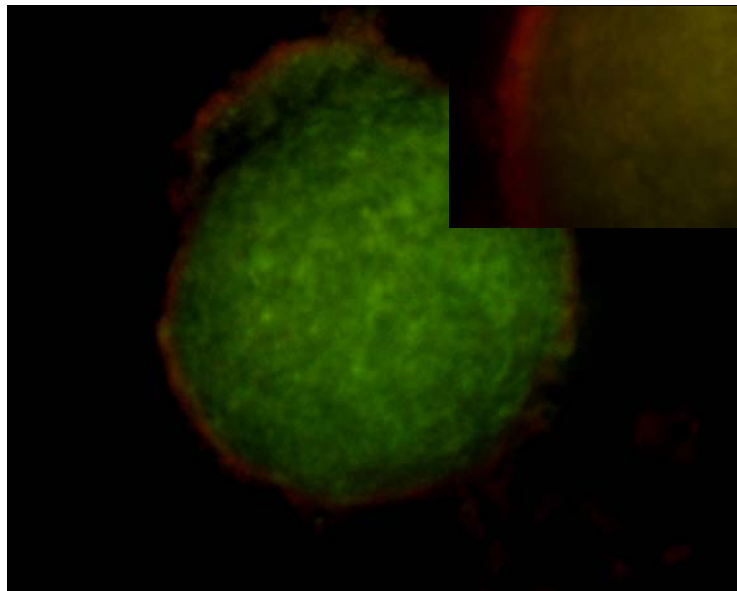


Figura 13 - Diferenciação Neurogênica. Imunofluorescência das estruturas semelhantes a neuroesferas. No centro, expressão de nestina (FITC, verde) e na periferia, núcleos corados (PI, vermelho).
Objetiva=40x e 63x

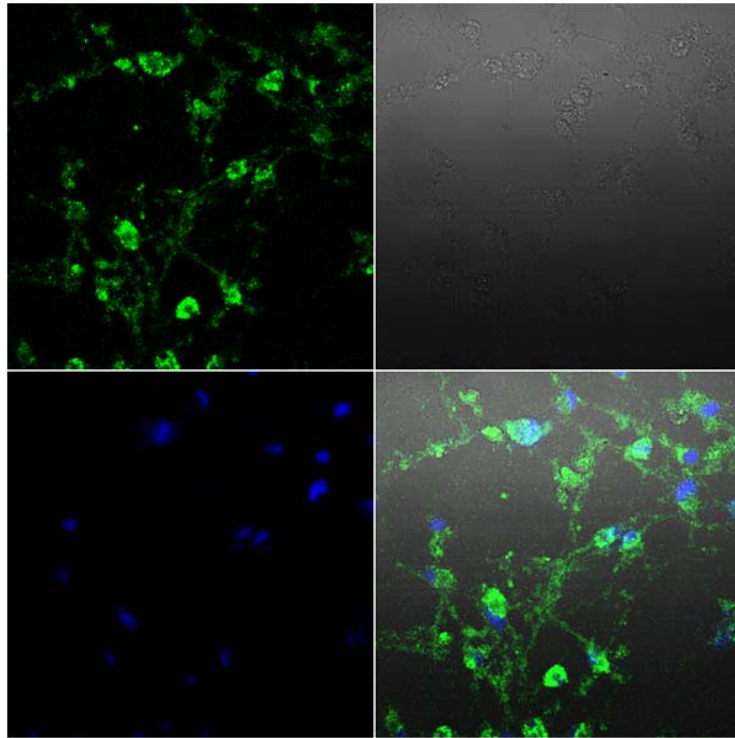


Figura 14 - Diferenciação Neurogênica. Imunofluorescência das células com morfologia semelhante a neurônios, demonstrando a expressão de GFAP. Núcleos corados por DAPI em azul. Objetiva=20x

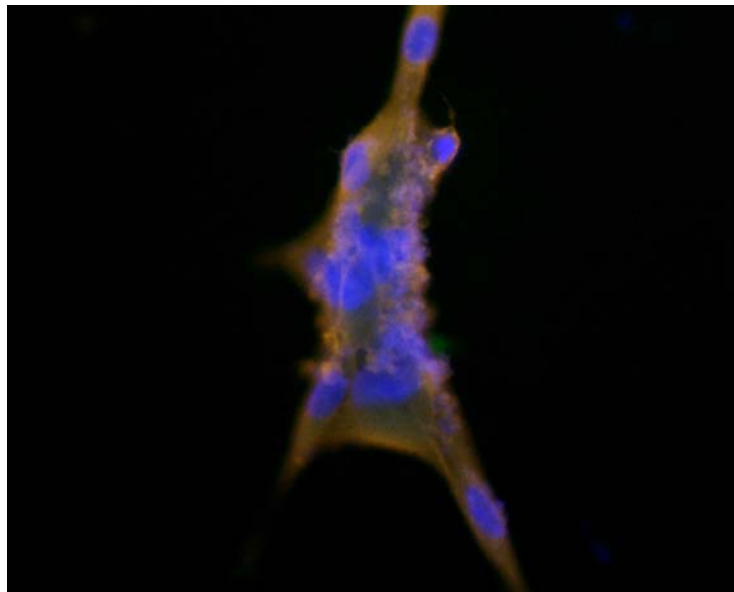


Figura 15 - Diferenciação Neurogênica. Imunofluorescência demonstrando a expressão de β -tubulina III. Núcleos corados por DAPI em azul. Objetiva=40x

5.6 CÉLULAS TRONCO MARCADAS COM VYBRANT

Com o intuito de demonstrar o padrão de marcação do Nanocristal fluorescente *Vybrant CFDA-SE CELL* nas células tronco de tecido adiposo de equinos indiferenciadas, realizamos o protocolo seguindo as instruções do fabricante. Como esperado, foi possível observar em todas as amostras, a marcação verde, pontual típica descrita na bula do produto (Figura 16).

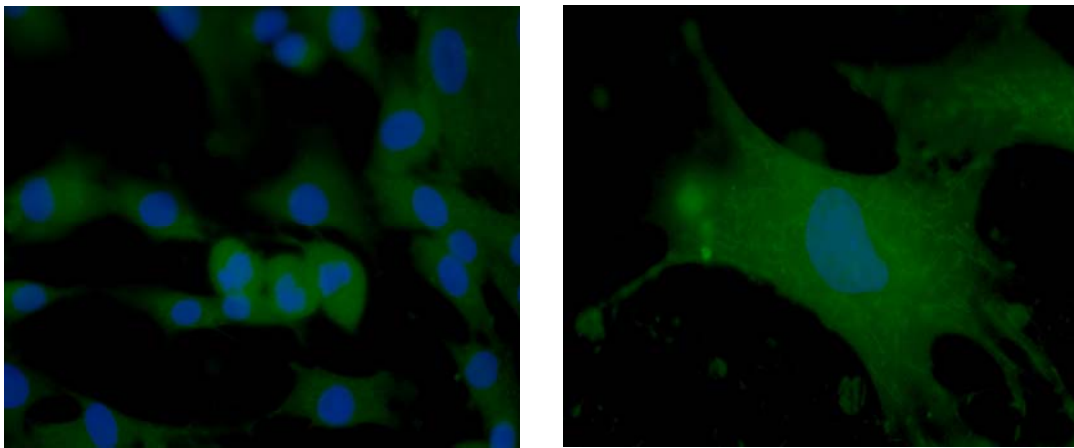


Figura 16 - Células tronco indiferenciadas marcadas com *Vybrant*. Pode ser observado o padrão de marcação pontual típico. Núcleos corados por DAPI em azul. Objetiva=63x e 100x

5.7 ANÁLISE DO ENXERTO DAS CÉLULAS TRONCO NAS BIÓPSIAS UTERINAS

Visando demonstrar que as células tronco têm capacidade de enxertar o tecido uterino das éguas estudadas, analisamos por fluorescência direta, a presença destas células marcadas por *Vybrant*, nas lâminas obtidas das biópsias sete dias após a infusão das células tronco.

Observamos a presença das células marcadas em todos os animais infundidos, bem como em quase todas as amostras analisadas, ou seja, tanto nos cornos quanto no corpo uterino, com exceção da égua Amanda (Figuras 17-20), sugerindo que as células tronco infundidas não foram

capazes de sobreviver no ambiente uterino deste animal, o útero estava em estágio muito avançado da doença o que possivelmente impossibilitou o enxerto, bem como a divisão das células. Como esperado, nos animais infundidos apenas com solução fisiológica (grupo controle), não observamos a presença das células tronco em nenhuma das biópsias analisadas (Figuras 21 e 22). Analisamos amostras do corpo uterino de todos os animais antes da infusão das células e também não observamos nenhum tipo de marcação semelhante à observada após o experimento, sendo possível visualizar somente a autofluorescência do tecido (Figuras 23 a 28).

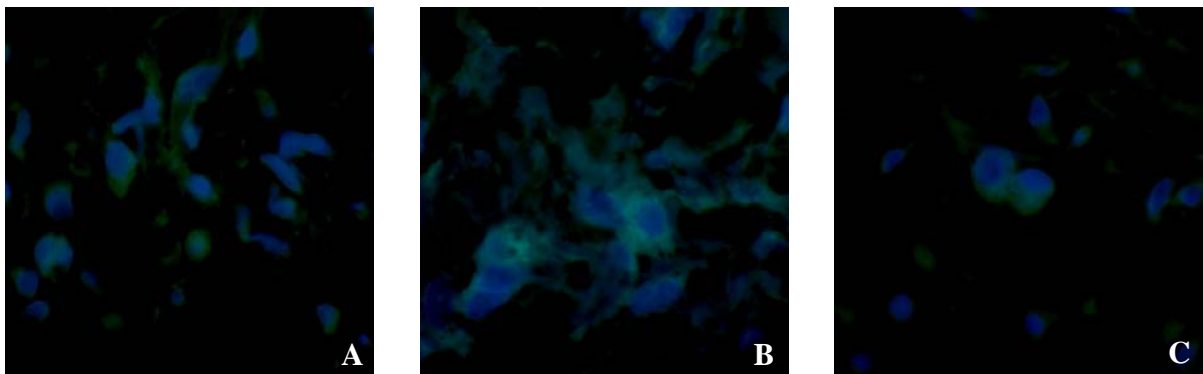


Figura 17 - Lobuna. Localização das células tronco marcadas por *Vybrant* enxertadas no tecido uterino. (A) Corpo uterino, (B) Corno direito e (C) Corno esquerdo. Núcleos corados por DAPI em azul. Objetiva=60x

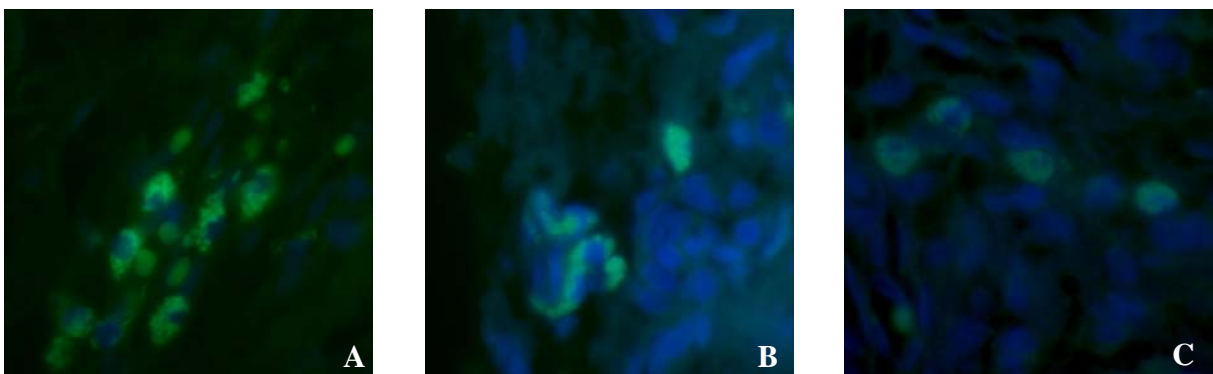


Figura 18 - Cumparsita. Localização das células tronco marcadas por *Vybrant* enxertadas no tecido uterino. (A) Corpo uterino, (B) Corno direito e (C) Corno esquerdo. Núcleos corados por DAPI em azul. Objetiva=60x

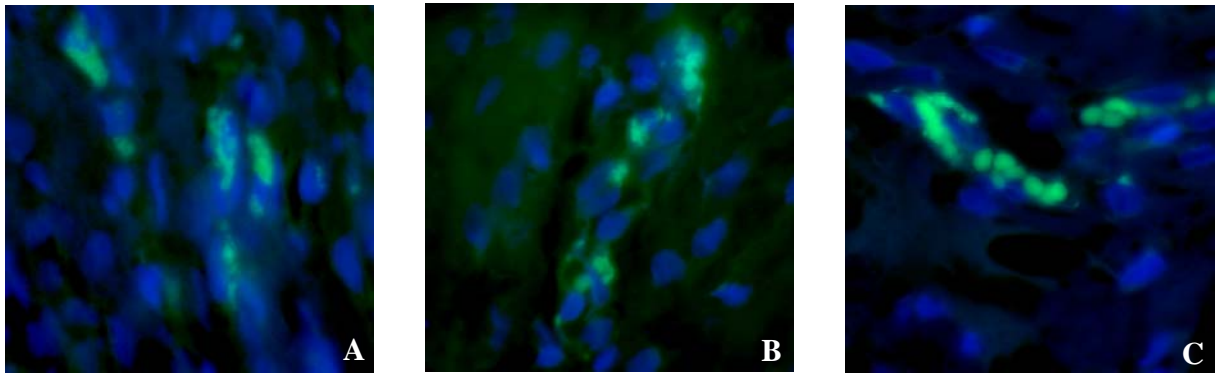


Figura 19 - Trairona. Localização das células tronco marcadas por *Vybrant* enxertadas no tecido uterino. (A) Corpo uterino, (B) Corno direito e (C) Corno esquerdo. Núcleos corados por DAPI em azul. Objetiva=60x

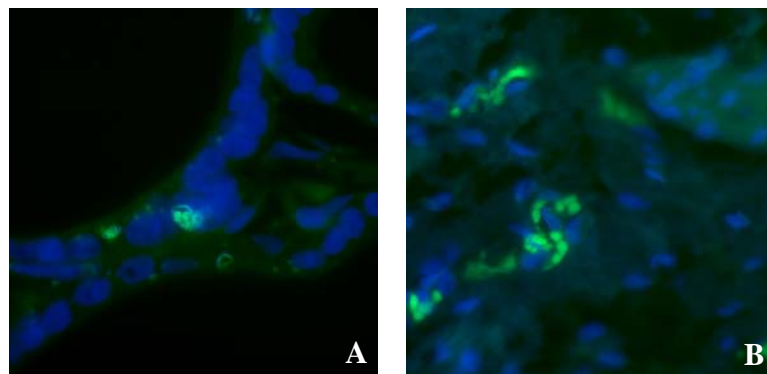


Figura 20 - Amanda. Localização das células tronco marcadas por *Vybrant* enxertadas no tecido uterino. (A) Corpo uterino e (B) Corno direito, não observamos a presença de células marcadas na amostra do corno esquerdo. Núcleos corados por DAPI em azul. Objetiva=60x e 40x.

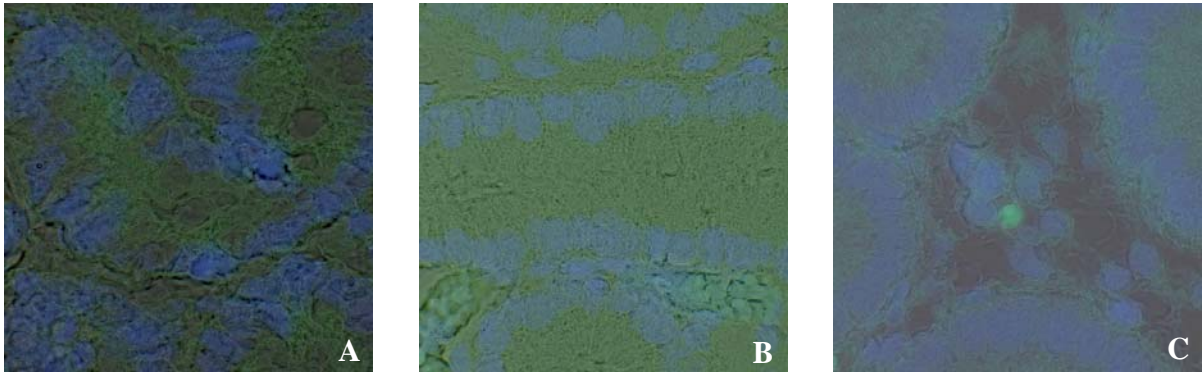


Figura 21 - Ki-Rumba. Animal controle. Não foi possível observar a presença das células marcadas no tecido uterino. (A) Corpo uterino, (B) Corno direito e (C) Corno esquerdo. Núcleos corados por DAPI em azul + contraste de fase. Objetiva=60x

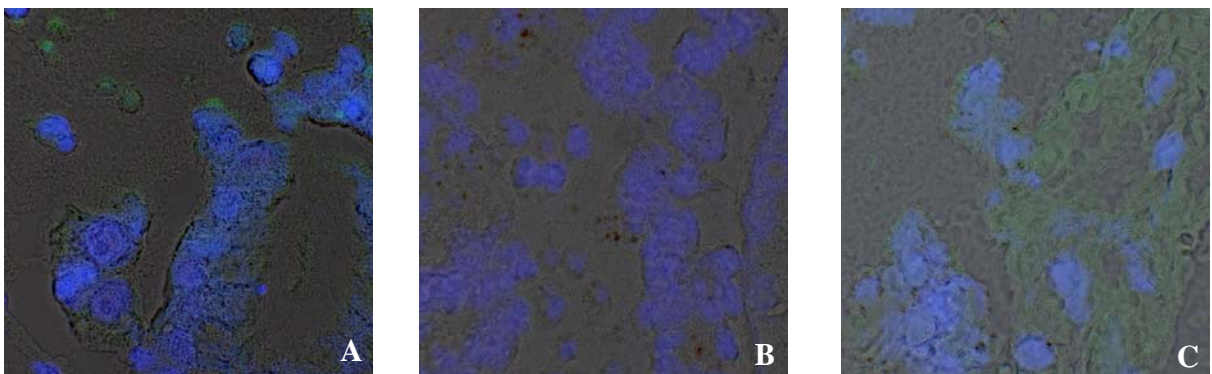


Figura 22 - Czarina. Animal controle. Não foi possível observar a presença das células marcadas no tecido uterino. (A) Corpo uterino, (B) Corno direito e (C) Corno esquerdo. Núcleos corados por DAPI em azul + contraste de fase. Objetiva=60x



Figura 23 - Lobuna. Amostra do corpo uterino antes da infusão das células. Núcleos corados por DAPI em azul. Objetiva=63x

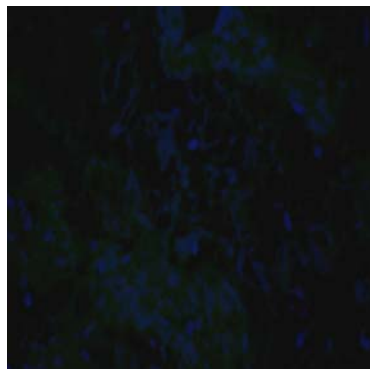


Figura 24 - Czarina. Amostra do corpo uterino antes da infusão das células. Núcleos corados por DAPI em azul. Objetiva=63x

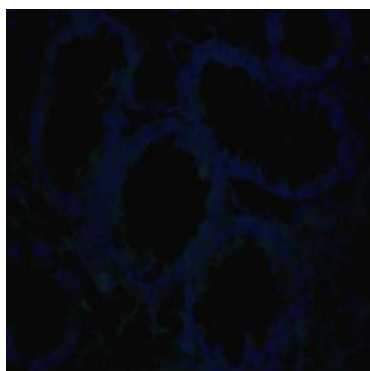


Figura 25 - Ki-Rumba. Amostra do corpo uterino antes da infusão das células. Núcleos corados por DAPI em azul. Objetiva=63x

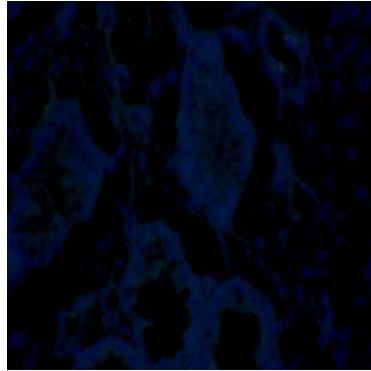


Figura 26 - Cumparsita. Amostra do corpo uterino antes da infusão das células. Núcleos corados por DAPI em azul. Objetiva=63x

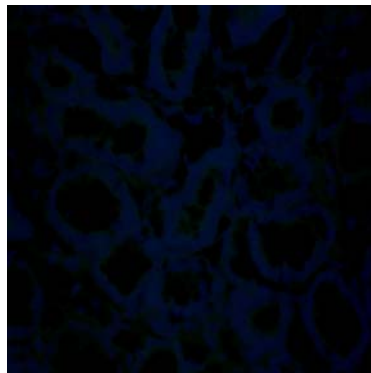


Figura 27 - Trairona. Amostra do corpo uterino antes da infusão das células. Núcleos corados por DAPI em azul. Objetiva=63x

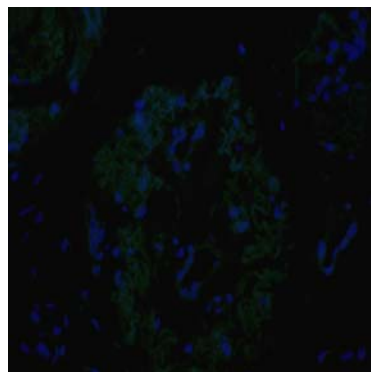


Figura 28 - Amanda. Amostra do corpo uterino antes da infusão das células. Núcleos corados por DAPI em azul. Objetiva=63x

5.8 ANÁLISE DAS CITOLOGIAS ENDOMETRIAIS

Os resultados das citologias endometriais estão apresentados no quadro 1. Os animais não apresentaram inflamação antes ou depois da coleta das biópsias endometriais, com exceção de uma das éguas do grupo controle (Czarina), que não foi infundida com as células tronco. Provavelmente, este episódio de contaminação ocorreu por conta das três coletas (corno direito, esquerdo e corpo uterino) realizadas ao mesmo tempo. Porém o sistema imunológico do próprio animal tratou deste caso, uma vez que no resultado da última coleta não foi mais observado o processo inflamatório.

| | Antes da infusão das CTs | 7 dias após a infusão | 21 dias após a infusão | 61 dias após a infusão |
|-------------------|---------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Lobuna | - | - | - | - |
| Cumparsita | - | - | - | - |
| Trairona | - | - | - | - |
| Amanda | - | - | - | - |
| Ki-Rumba | | | | |
| (Controle) | - | - | - | - |
| Czarina | | | | |
| (Controle) | - | + | + | - |

Quadro 1 - Presença (+) ou ausência (-) de neutrófilos polimorfonucleares indicando a existência ou não de processo inflamatório (Endometrite)

5.9 ANÁLISE HISTOLÓGICA DAS BIÓPSIAS UTERINAS

Com o objetivo de avaliar o aspecto morfológico do tecido uterino das éguas estudadas, realizamos análises histológicas através das colorações de Hematoxilina/Eosina e Alcian Blue nas biópsias de sete, 21 e 61 dias após a infusão das células tronco. Em relação à coloração de Hematoxilina/Eosina, observamos uma melhora significativa, quando comparado às amostras de

antes da infusão (Figuras 29-34), tanto na organização do tecido, como na morfologia das glândulas uterinas das amostras de sete dias após infusão (Figuras 35-52). Esta melhora foi confirmada, em maiores proporções, nas amostras de 21 (Figuras 53-70) e 61 dias (Figuras 71-88), respectivamente. Sendo que quando analisadas as amostras de 61 dias, as glândulas uterinas se apresentaram mais intumescidas e com aspecto mais arredondado e organizado, evolução não observada nos animais controles, nos quais os tecidos uterinos permaneceram semelhantes nas amostras de 7, 21 e 61 dias após o experimento. Resultados morfológicos semelhantes foram observados através da coloração de Alcian Blue nos dias 7, 21 e 61 após a infusão das células tronco (Figuras 89-112). Interessantemente, a égua Amanda, animal com grau de fibrose mais avançado quando comparado aos demais animais, não demonstrou alteração no aspecto morfológico, tanto do tecido quanto das glândulas uterinas, em nenhuma das biópsias analisadas após a infusão das células tronco, o que nos leva a acreditar que determinados graus de fibrose (estágio muito avançado da endometrose) não respondem a este tratamento. Talvez o ambiente seja totalmente desfavorável para o enxerto, bem como para a proliferação das células tronco.

H/E - Antes da infusão

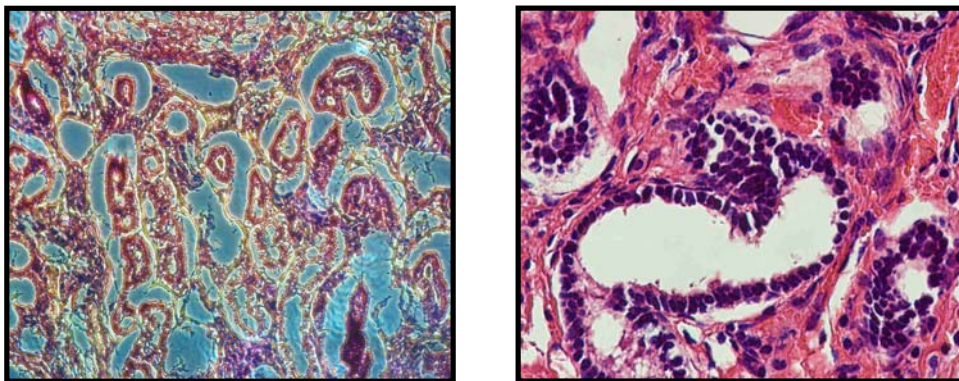


Figura 29 - Lobuna. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corpo uterino antes da infusão das células tronco. Objetiva=20x e 60x

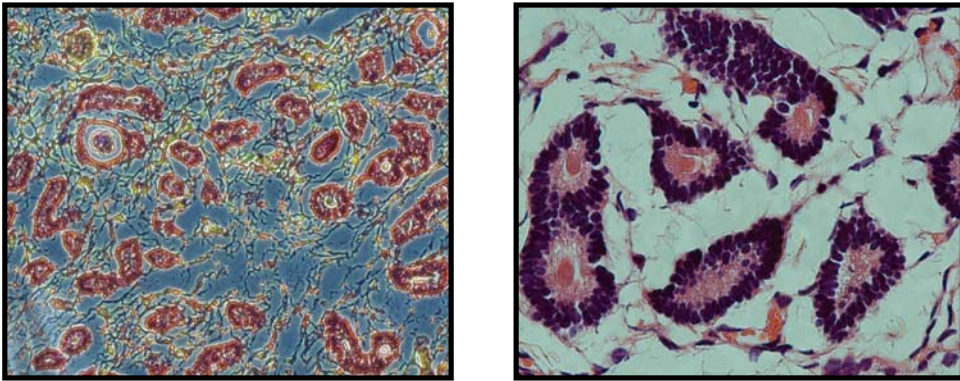


Figura 30 - Cumparsita. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corpo uterino antes da infusão das células tronco. Objetiva=20x e 60x

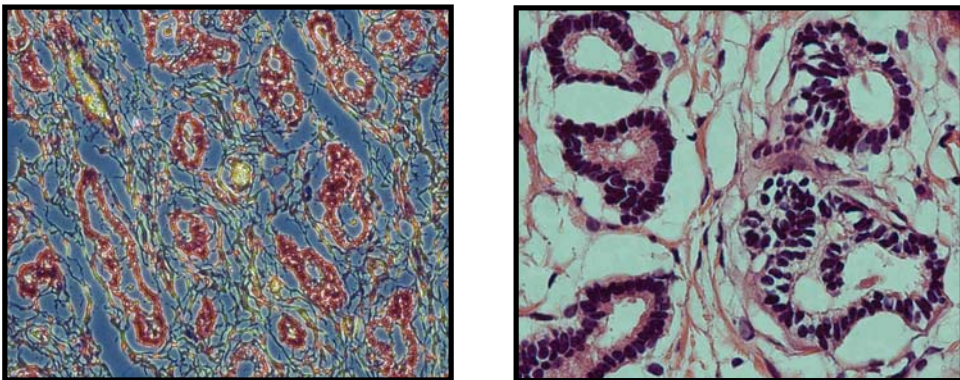


Figura 31 - Trairona. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corpo uterino antes da infusão das células tronco. Objetiva=20x e 60x

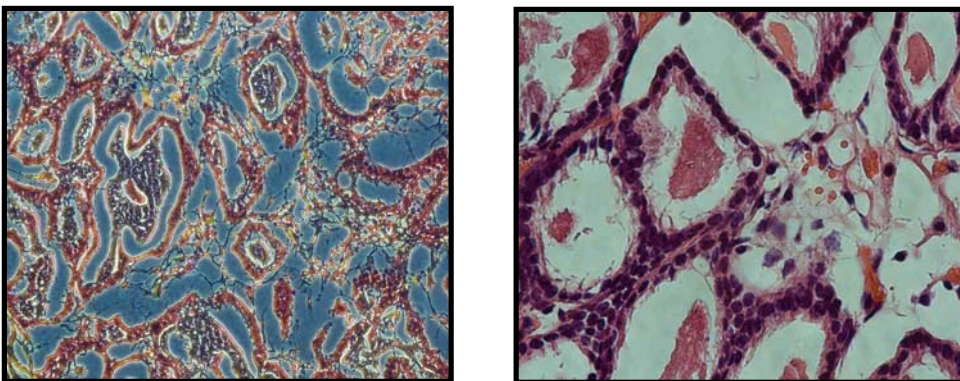


Figura 32 - Amanda. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corpo uterino antes da infusão das células tronco. Objetiva=20x e 60x

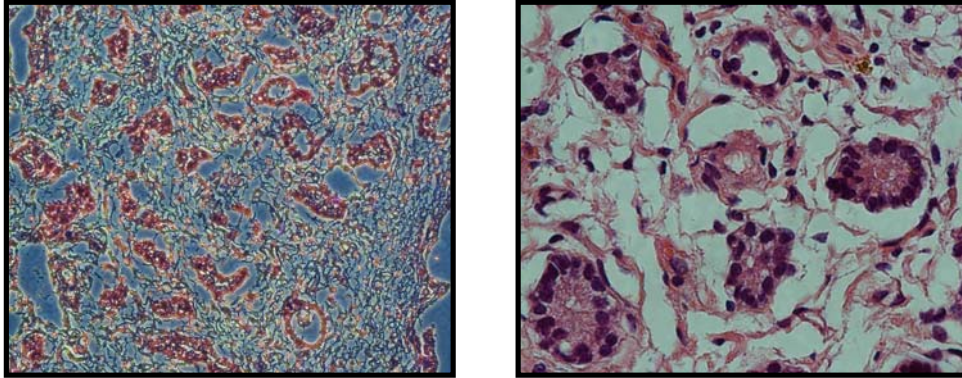


Figura 33 - Ki-Rumba. Animal controle. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corpo uterino antes do experimento. Objetiva=20x e 60x

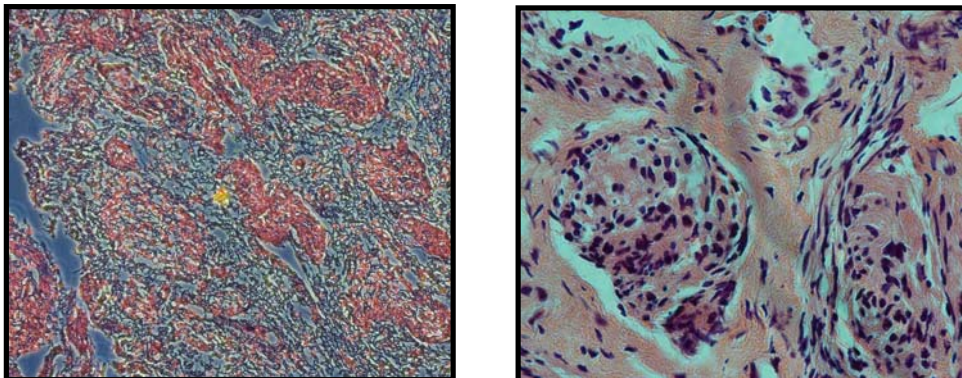


Figura 34 - Czarina. Animal controle. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corpo uterino antes do experimento. Objetiva=20x e 60x

H/E - 7 dias após infusão

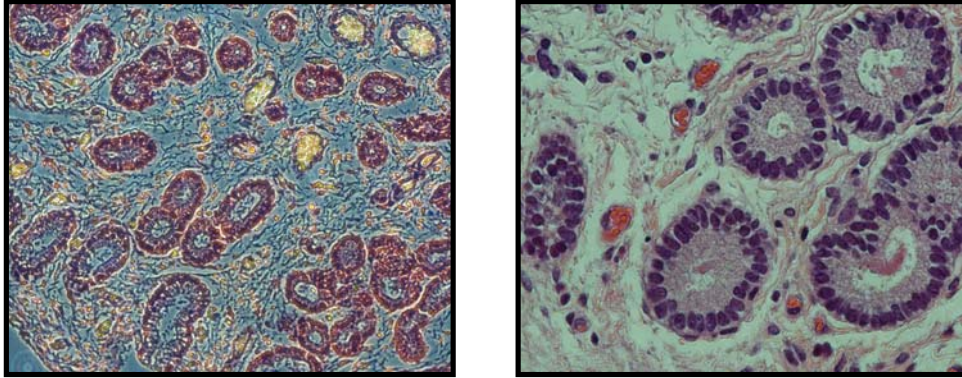


Figura 35 - Lobuna. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corpo uterino, 7 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x e 60x

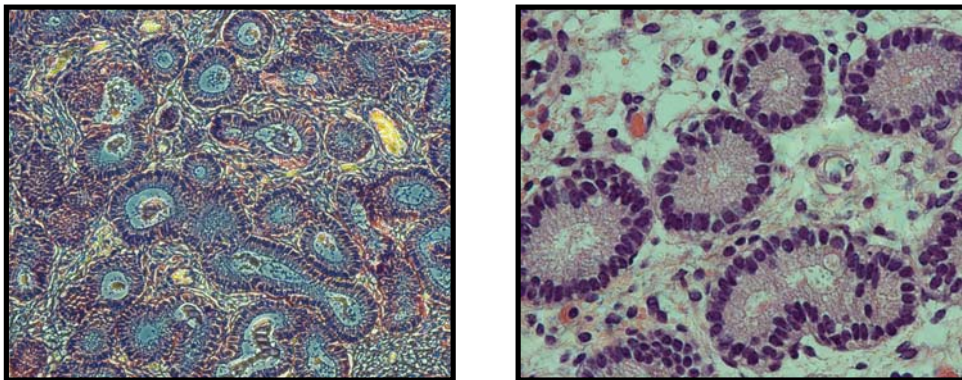


Figura 36 - Lobuna. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino direito, 7 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x e 60x

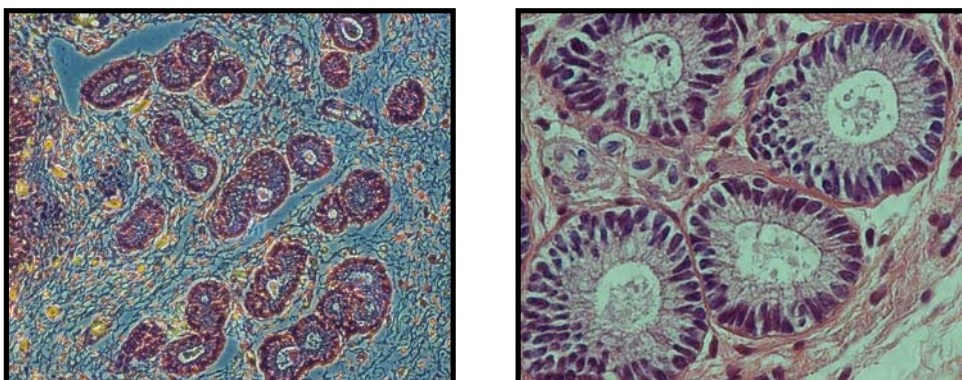


Figura 37 - Lobuna. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino esquerdo, 7 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x e 60x

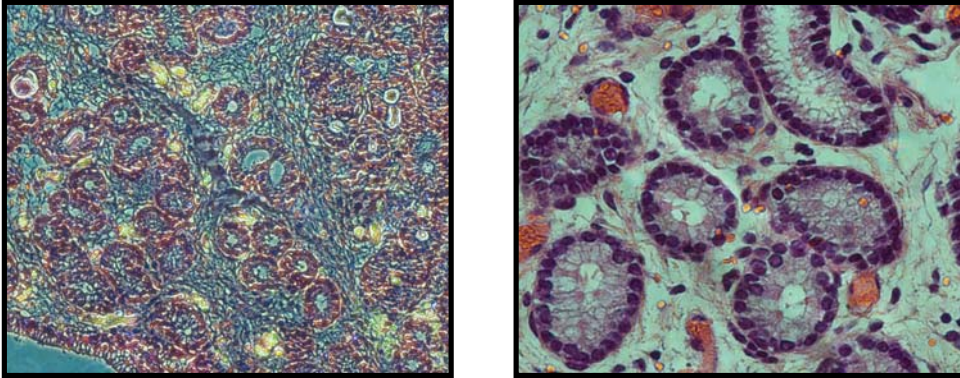


Figura 38 - Cumparsita. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corpo uterino, 7 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x e 60x

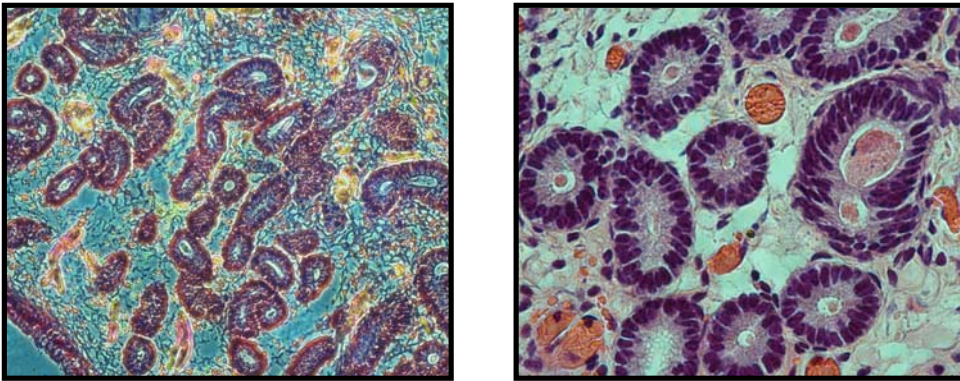


Figura 39 - Cumparsita. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino direito, 7 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x e 60x

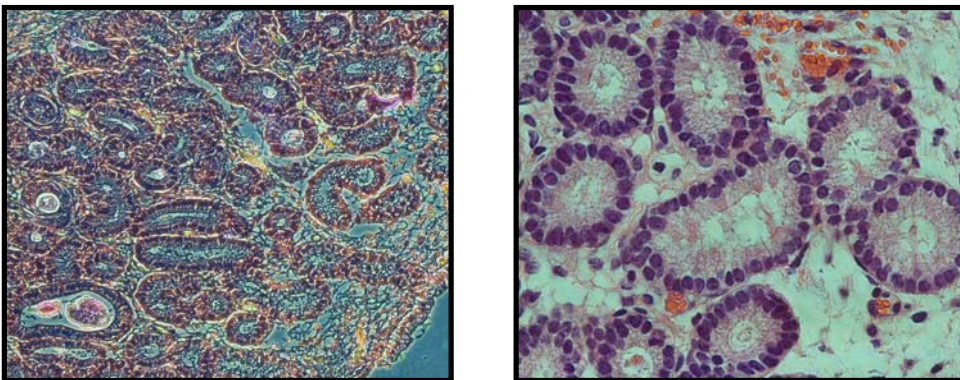


Figura 40 - Cumparsita. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino esquerdo, 7 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x e 60x

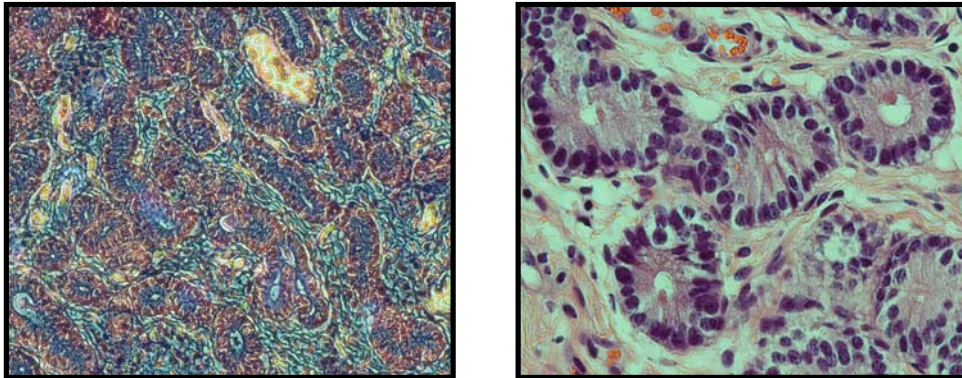


Figura 41 - Trairona. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corpo uterino, 7 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x e 60x

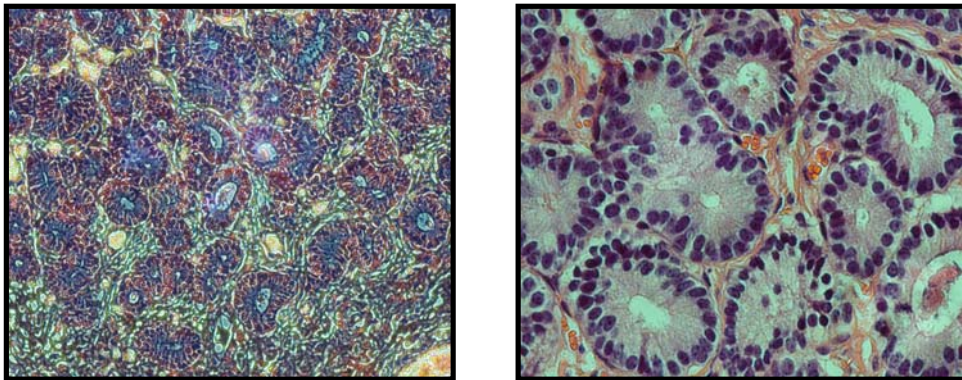


Figura 42 - Trairona. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino direito, 7 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x e 60x

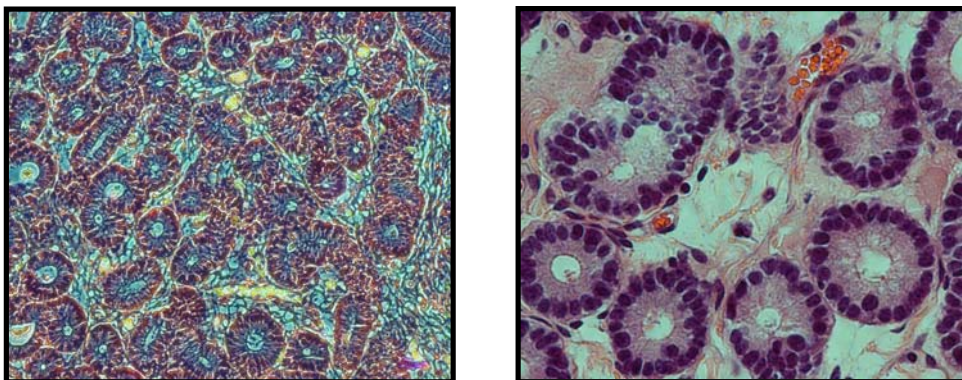


Figura 43 - Trairona. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino esquerdo, 7 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x e 60x

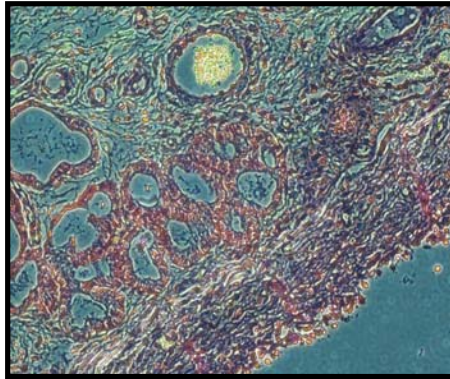


Figura 44 - Amanda. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corpo uterino, 7 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x

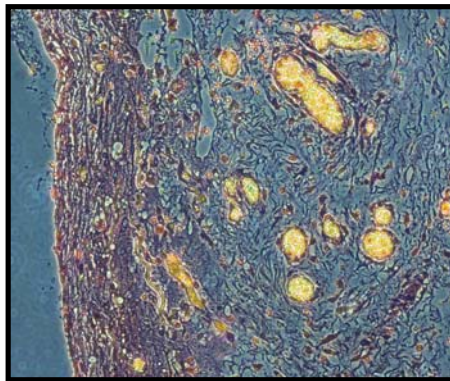


Figura 45 - Amanda. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino direito, 7 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x

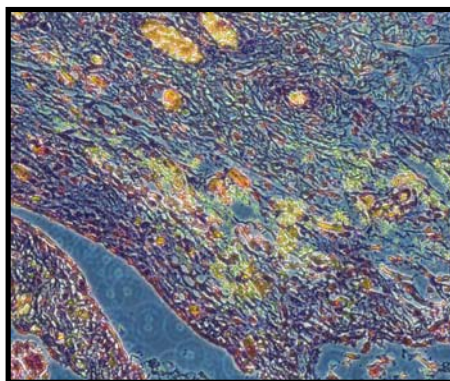


Figura 46 - Amanda. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino esquerdo, 7 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x

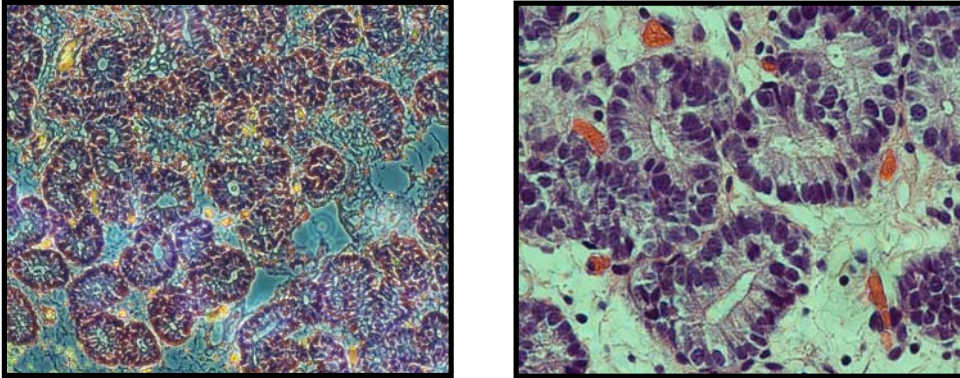


Figura 47 - Ki-Rumba. Animal controle. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corpo uterino, 7 dias após o experimento. Objetiva=20x e 63x

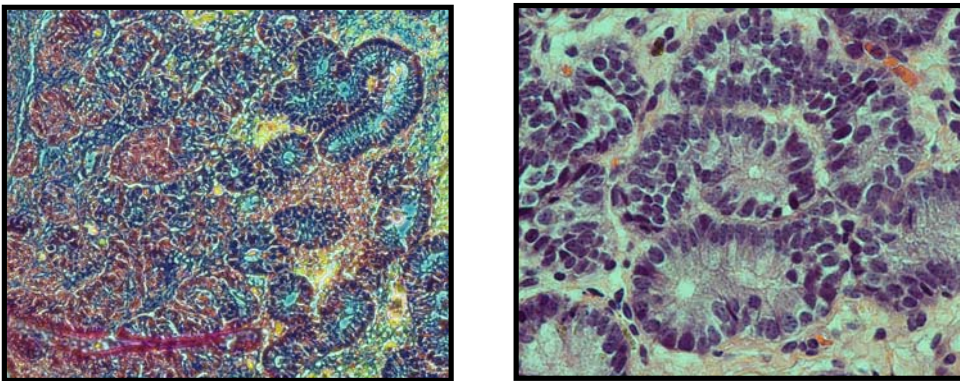


Figura 48 - Ki-Rumba. Animal controle. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino direito, 7 dias após o experimento. Objetiva=20x e 63x

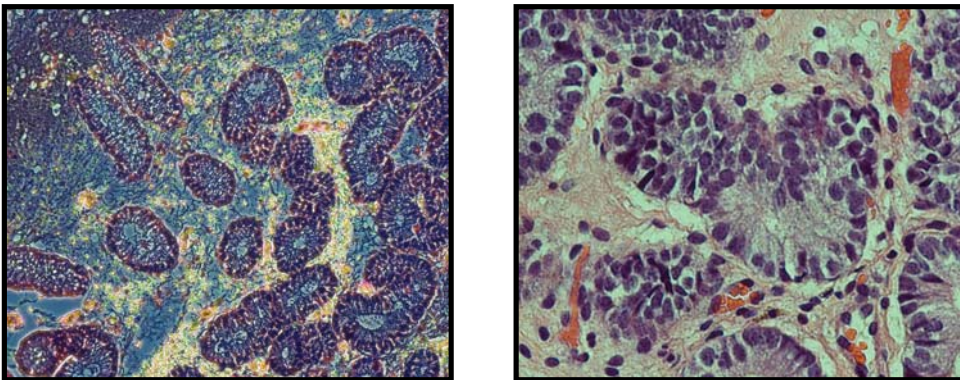


Figura 49 - Ki-Rumba. Animal controle. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino esquerdo, 7 dias após o experimento. Objetiva=20x e 63x

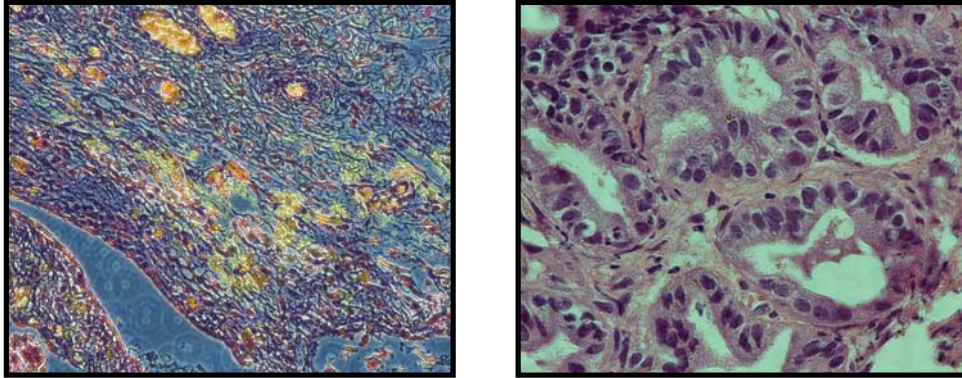


Figura 50 - Czarina. Animal controle. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corpo uterino, 7 dias após o experimento. Objetiva=20x e 63x

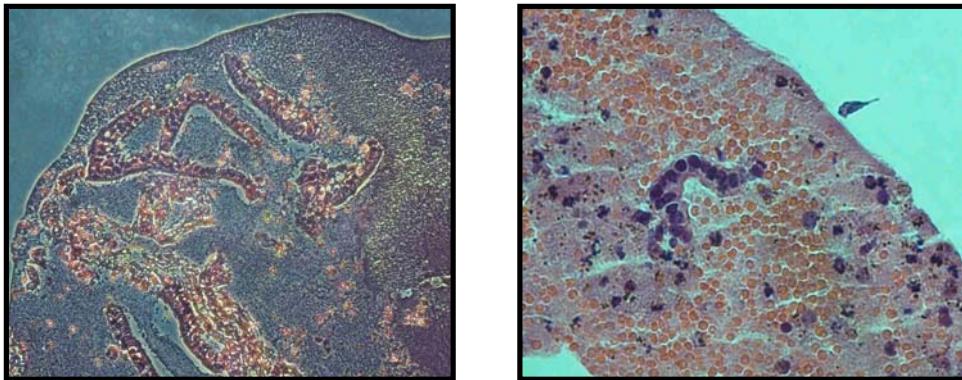


Figura 51 - Czarina. Animal controle. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino direito, 7 dias após o experimento. Objetiva=20x e 63x

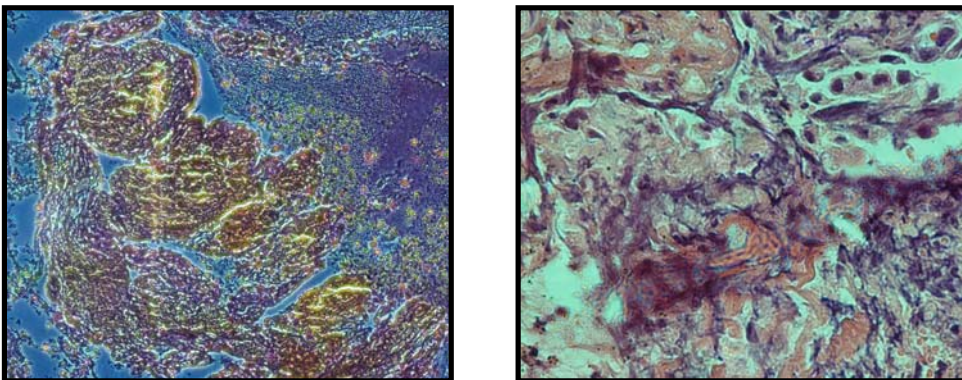


Figura 52 - Czarina. Animal controle. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino esquerdo, 7 dias após o experimento. Objetiva=20x e 63x

H/E - 21 dias após infusão

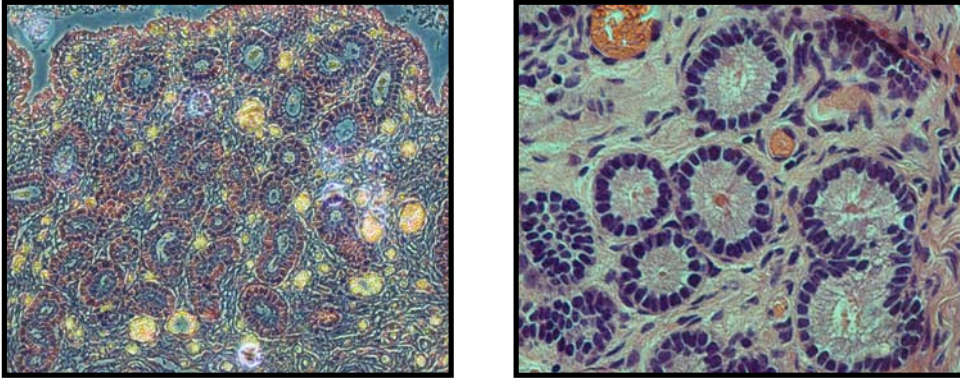


Figura 53 - Lobuna. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corpo uterino, 21 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x e 63x

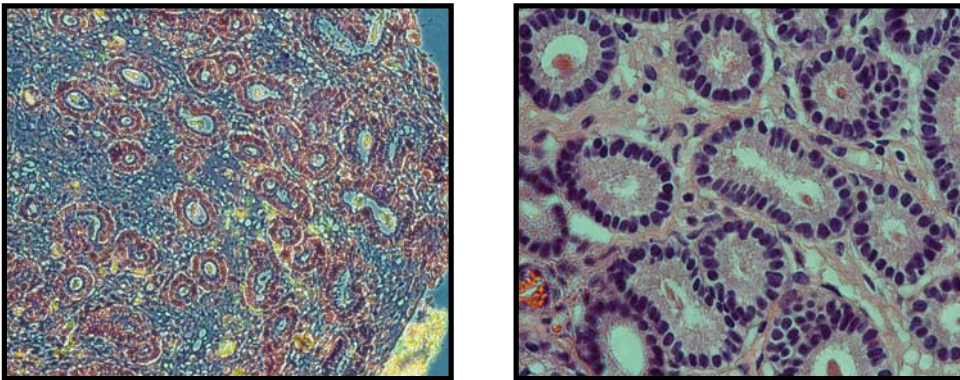


Figura 54 - Lobuna. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino direito, 21 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x e 63x

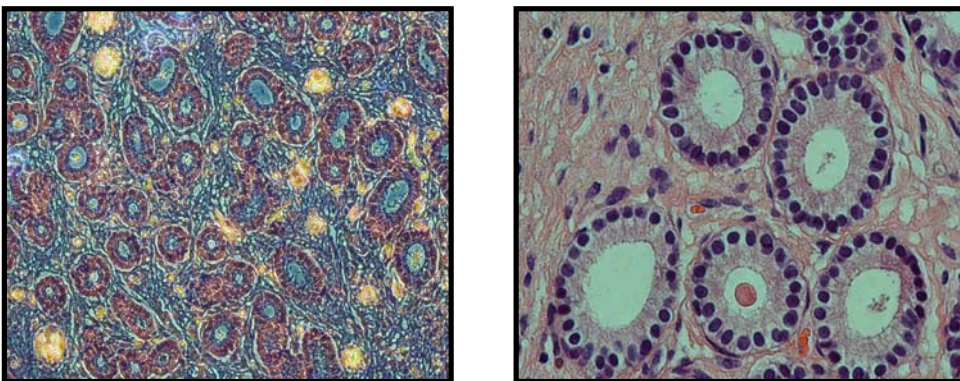


Figura 55 - Lobuna. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino esquerdo, 21 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x e 63x

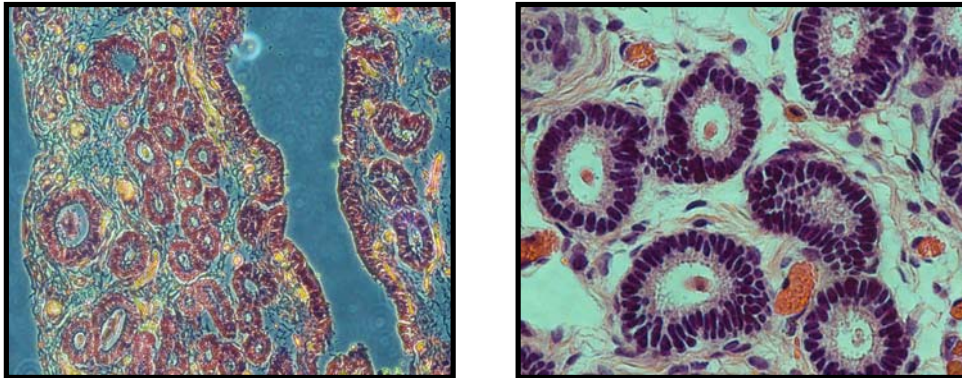


Figura 56 - Cumparsita. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corpo uterino, 21 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x e 63x

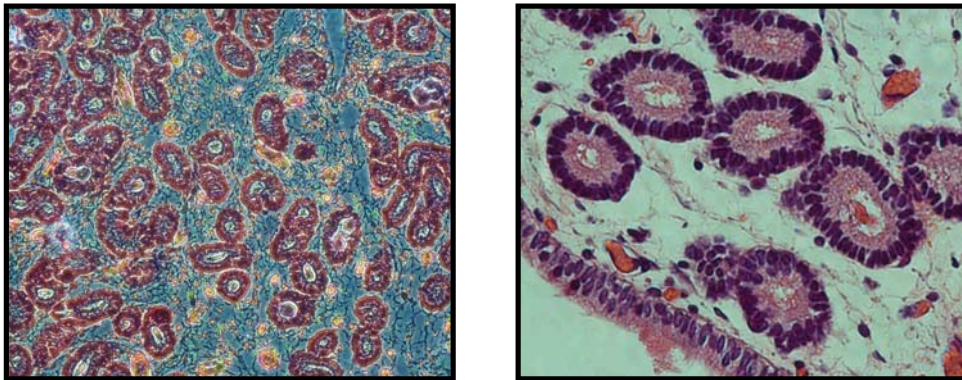


Figura 57 - Cumparsita. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino direito, 21 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x e 63x

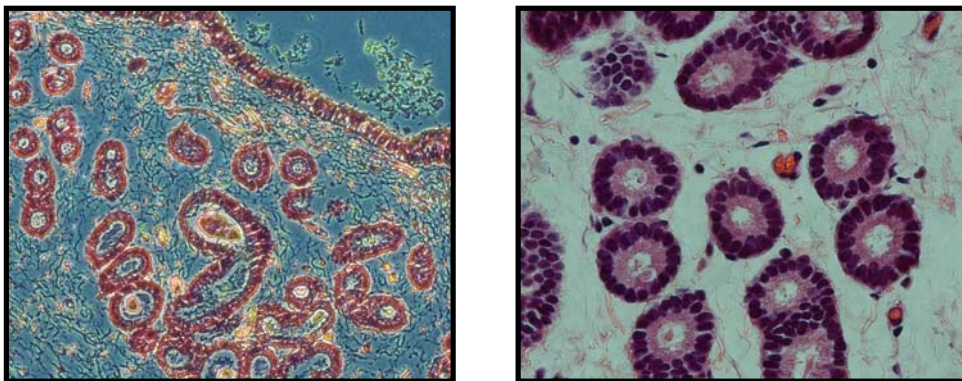


Figura 58 - Cumparsita. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino esquerdo, 21 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x e 63x

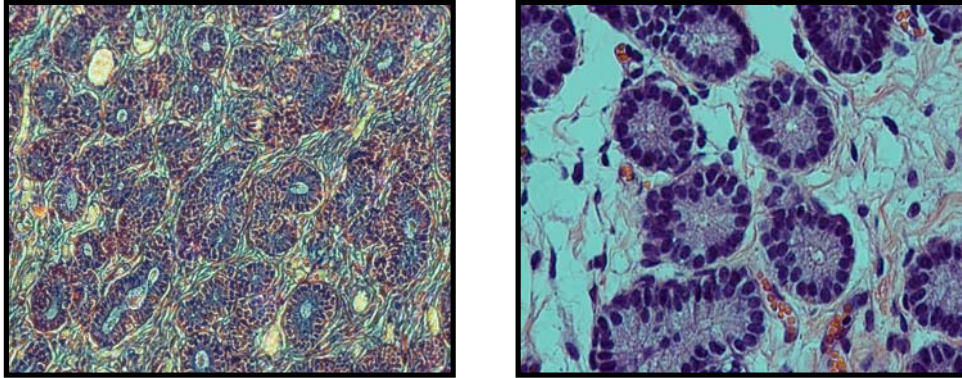


Figura 59 - Trairona. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corpo uterino, 21 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x e 63x

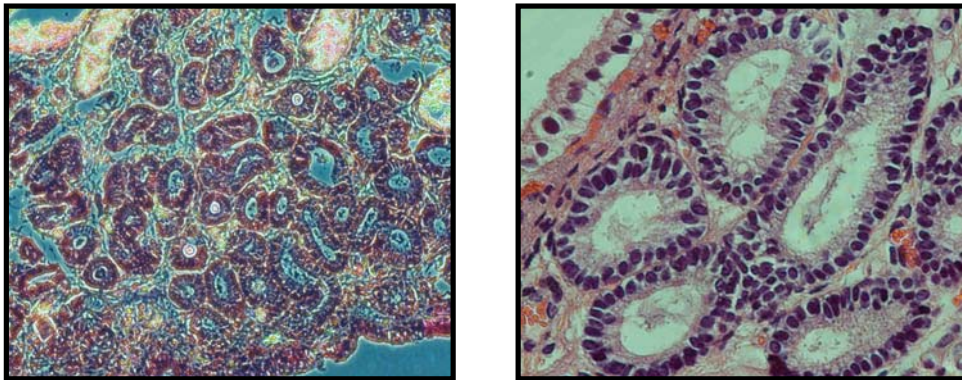


Figura 60 - Trairona. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino direito, 21 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x e 63x

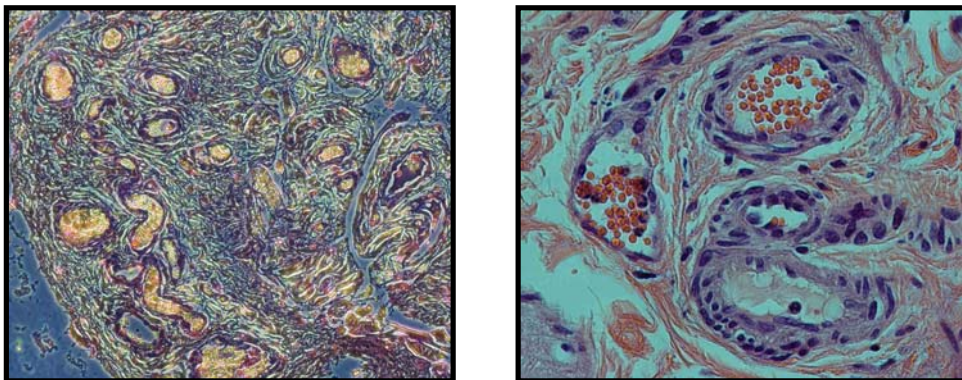


Figura 61 - Trairona. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino esquerdo, 21 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x e 63x

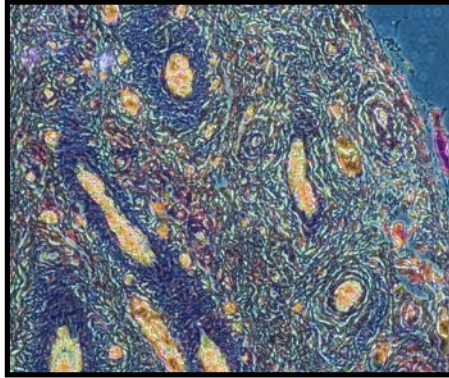


Figura 62 - Amanda. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corpo uterino, 21 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x

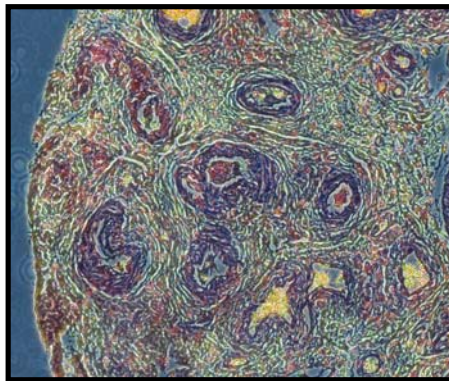


Figura 63 - Amanda. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino direito, 21 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x

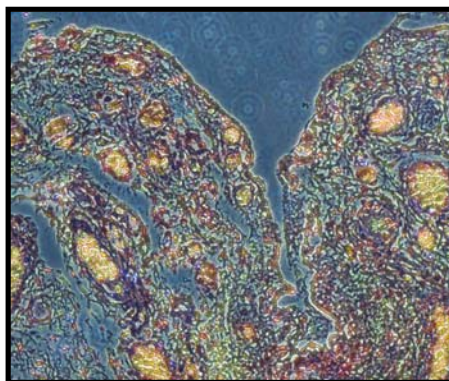


Figura 64 - Amanda. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino esquerdo, 21 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x

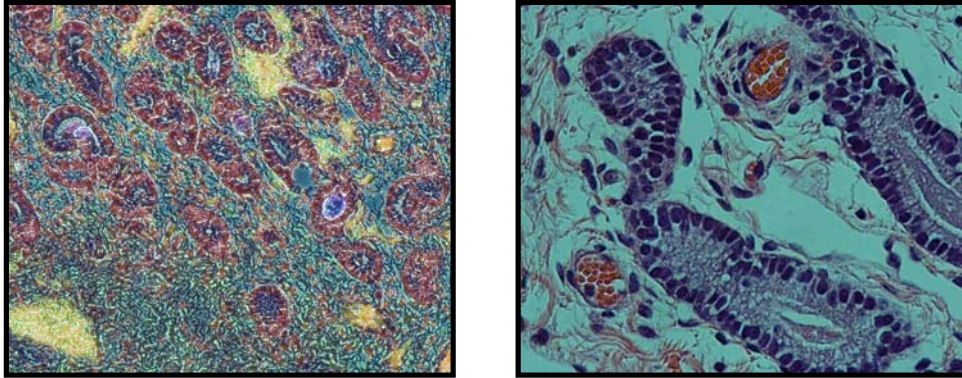


Figura 65 - Ki-Rumba. Animal controle. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corpo uterino, 21 dias após o experimento. Objetiva=20x e 63x

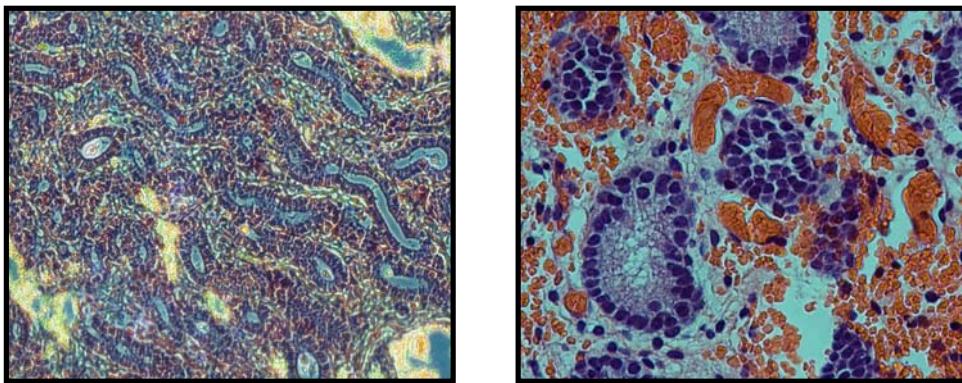


Figura 66 - Ki-Rumba. Animal controle. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino direito, 21 dias após o experimento. Objetiva=20x e 63x

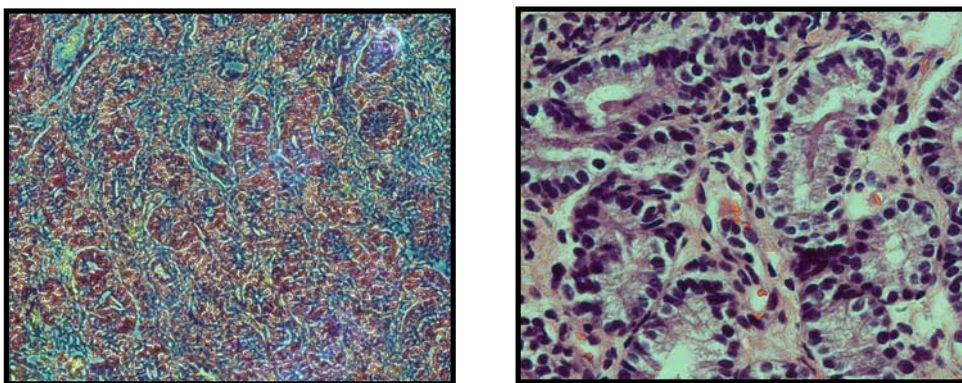


Figura 67 - Ki-Rumba. Animal controle. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino esquerdo, 21 dias após o experimento. Objetiva=20x e 63x

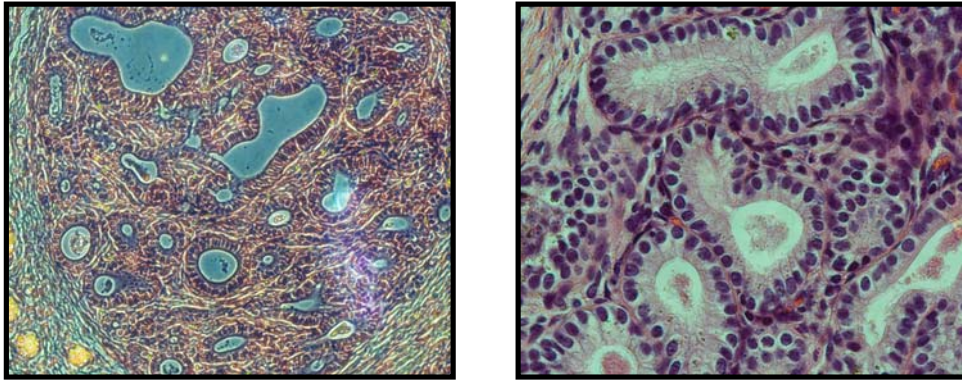


Figura 68 - Czarina. Animal controle. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corpo uterino, 21 dias após o experimento. Objetiva=20x e 63x

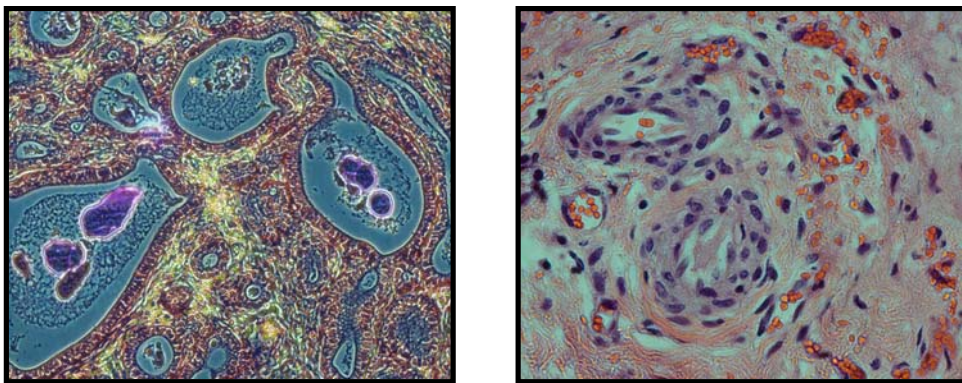


Figura 69 - Czarina. Animal controle. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino direito, 21 dias após o experimento. Objetiva=20x e 63x

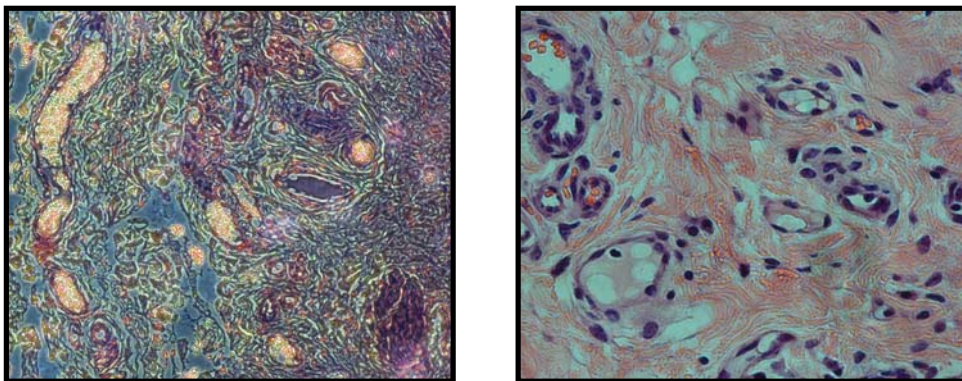


Figura 70 - Czarina. Animal controle. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino esquerdo, 21 dias após o experimento. Objetiva=20x e 63x

H/E - 61 dias após infusão

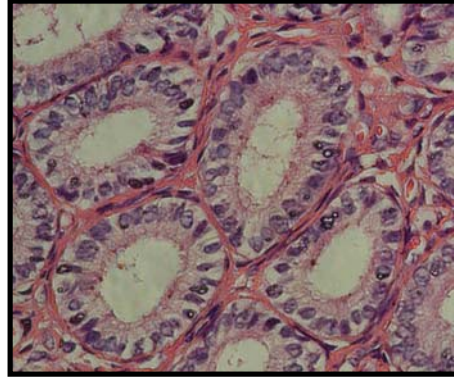


Figura 71 - Lobuna. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corpo uterino, 61 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x e 63x

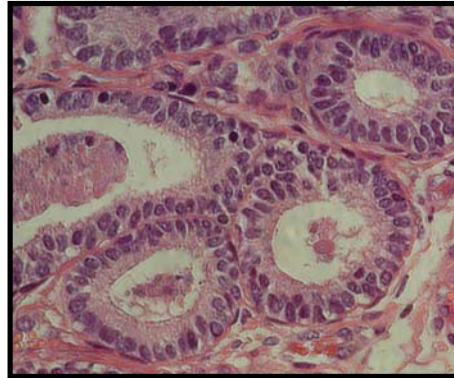
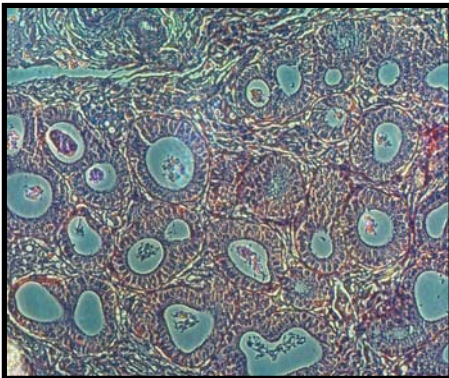


Figura 72 - Lobuna. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino direito, 61 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x e 63x

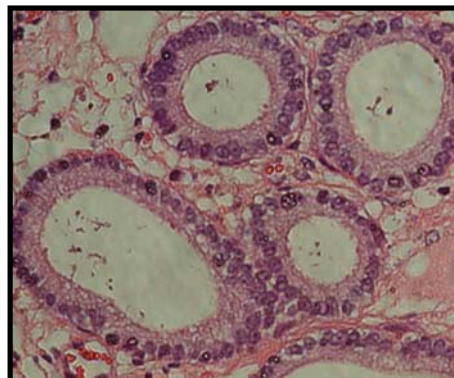
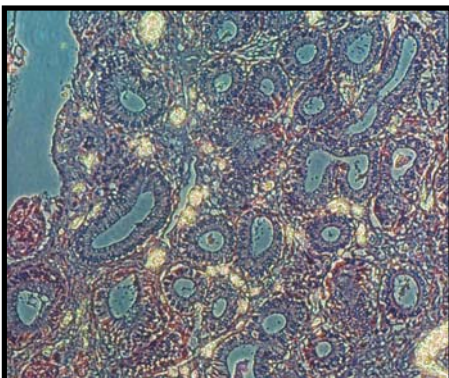


Figura 73 - Lobuna. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino esquerdo, 61 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x e 63x

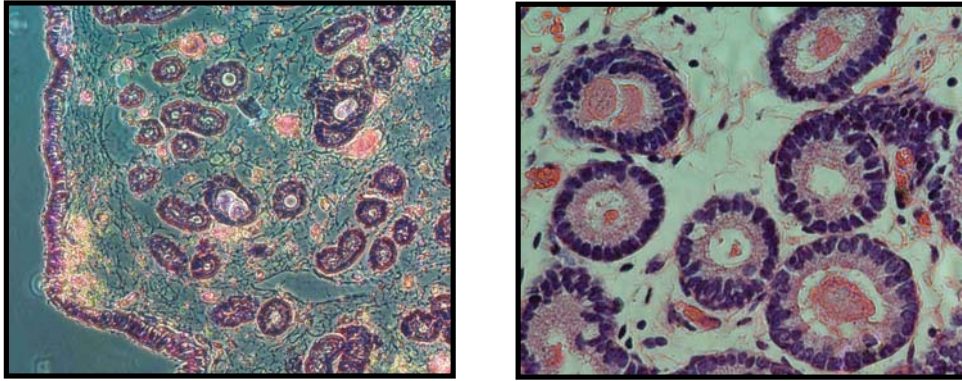


Figura 74 - Cumparsita. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corpo uterino, 61 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x e 63x

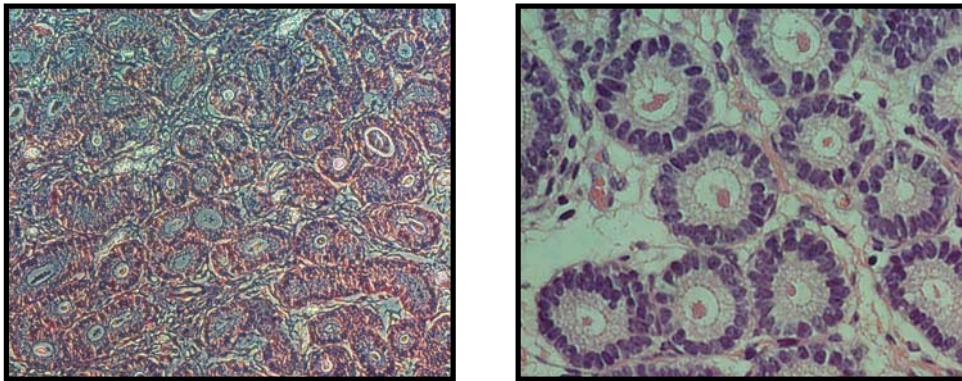


Figura 75 - Cumparsita. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino direito, 61 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x e 63x

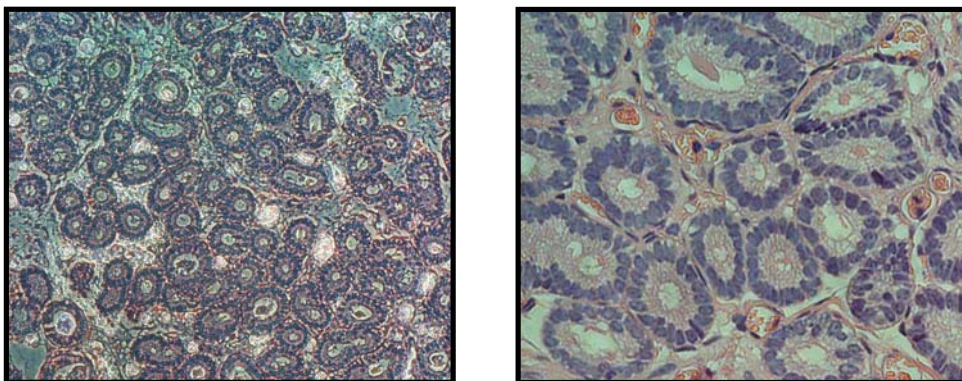


Figura 76 - Cumparsita. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino esquerdo, 61 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x e 63x

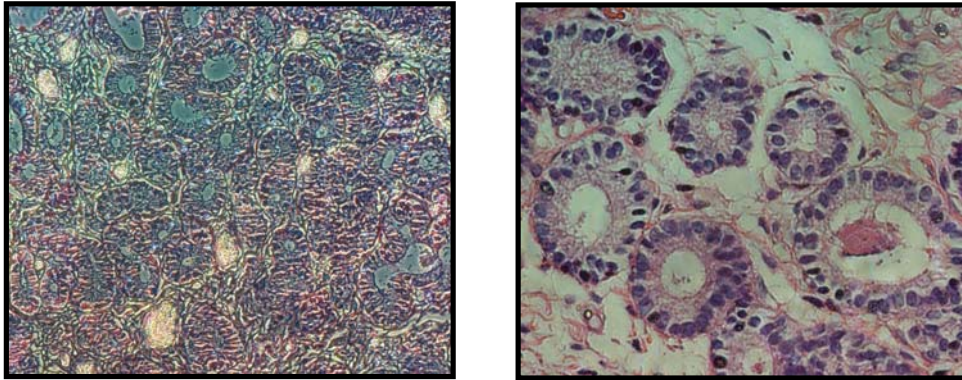


Figura 77 - Trairona. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corpo uterino, 61 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x e 63x

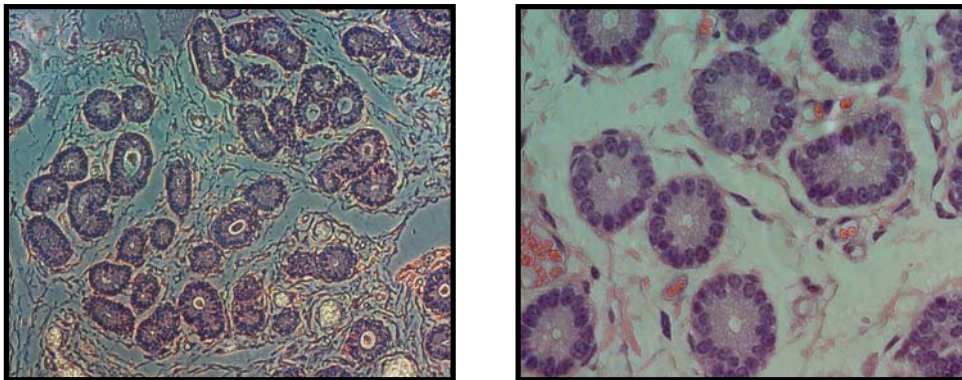


Figura 78 - Trairona. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino direito, 61 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x e 63x

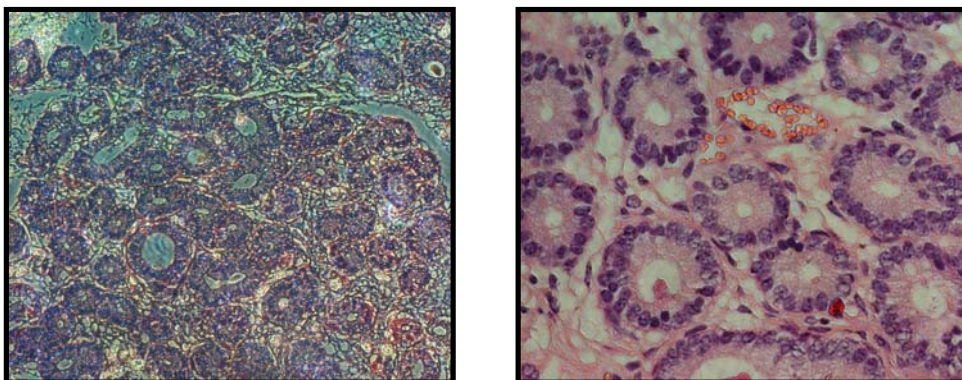


Figura 79 - Trairona. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino esquerdo, 61 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x e 63x

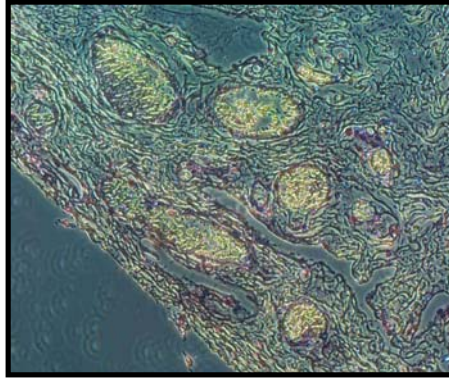


Figura 80 - Amanda. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corpo uterino, 61 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x

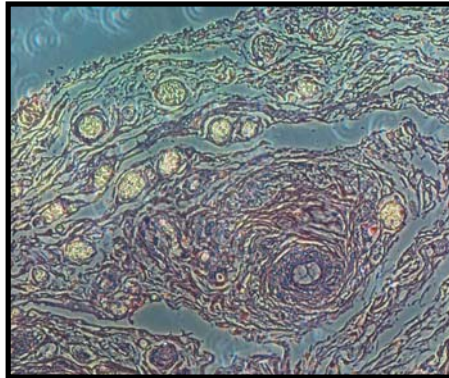


Figura 81 - Amanda. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino direito, 61 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x

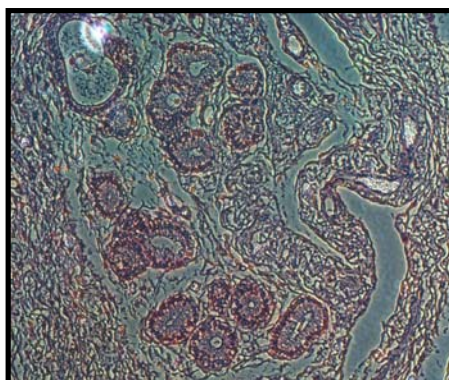


Figura 82 - Amanda. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino esquerdo, 61 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x

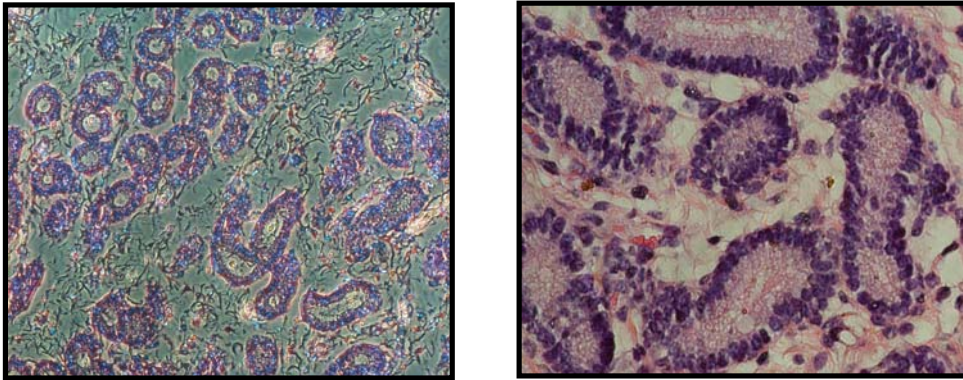


Figura 83 - Ki-Rumba. Animal controle. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corpo uterino, 61 dias após o experimento. Objetiva=20x e 63x

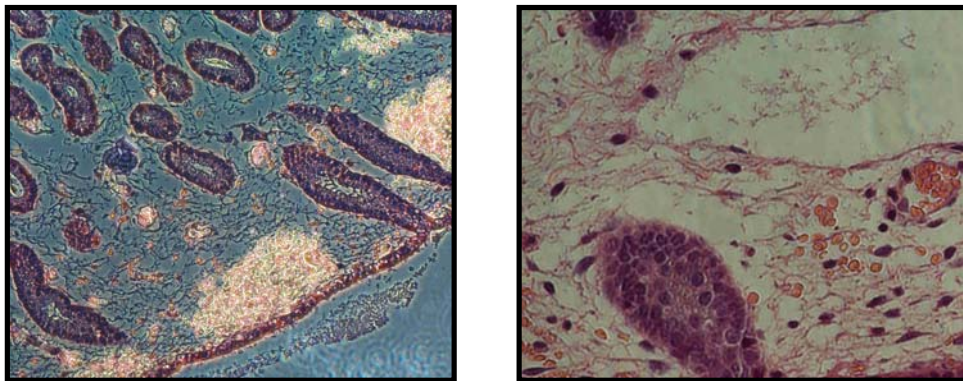


Figura 84 - Ki-Rumba. Animal controle. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino direito, 61 dias após o experimento. Objetiva=20x e 63x

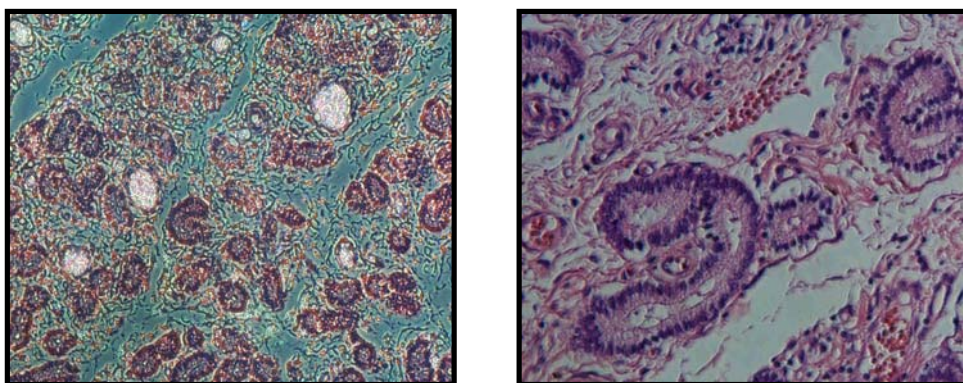


Figura 85 - Ki-Rumba. Animal controle. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino esquerdo, 61 dias após o experimento. Objetiva=20x e 63x

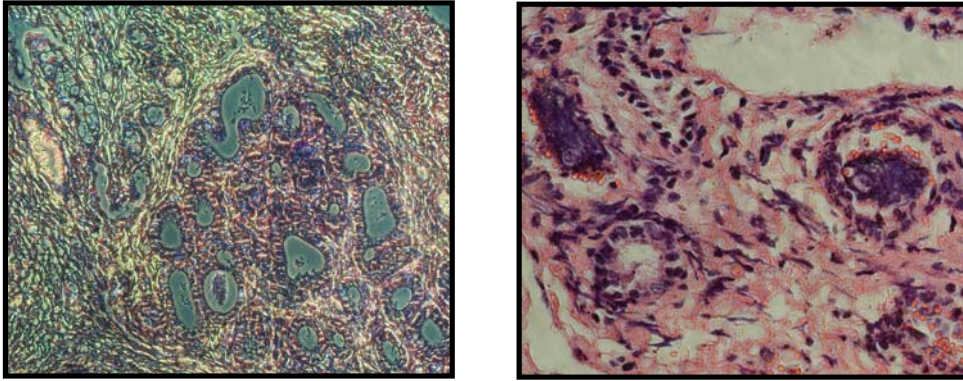


Figura 86 - Czarina. Animal controle. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corpo uterino, 61 dias após o experimento. Objetiva=20x e 63x

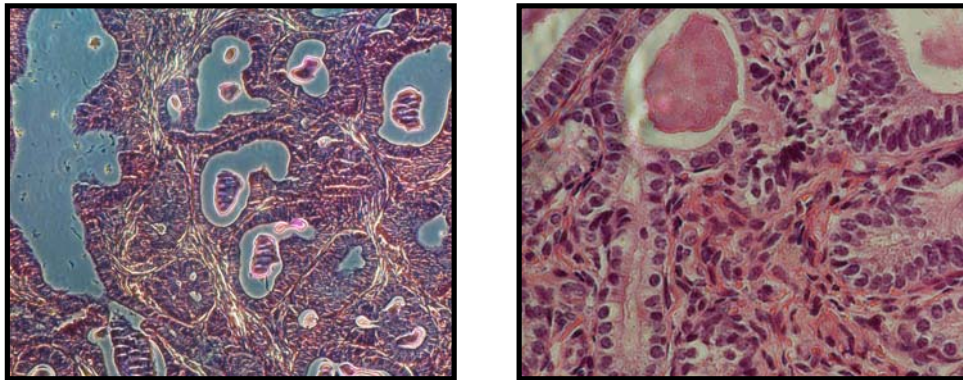


Figura 87 - Czarina. Animal controle. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino direito, 61 dias após o experimento. Objetiva=20x e 63x

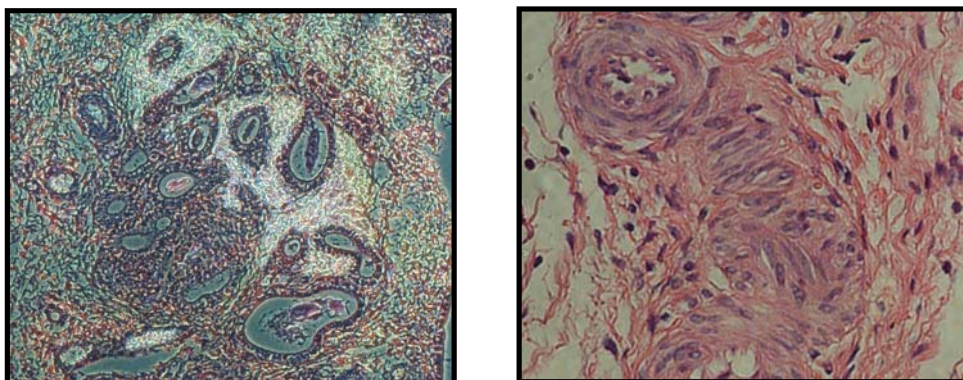


Figura 88 - Czarina. Animal controle. Coloração de Hematoxilina/Eosina na biópsia do corno uterino esquerdo, 61 dias após o experimento. Objetiva=20x e 63x

Alcian Blue - Antes da infusão

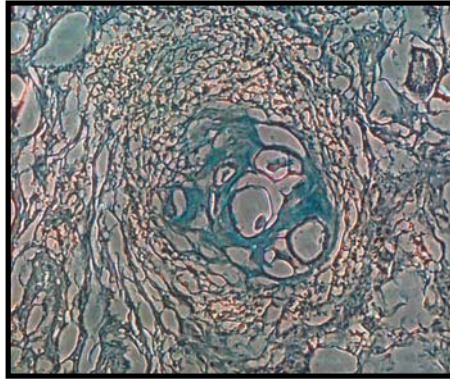


Figura 89 - Lobuna. Coloração de Alcian Blue na biópsia do corpo uterino antes da infusão das células tronco. Objetiva=20x

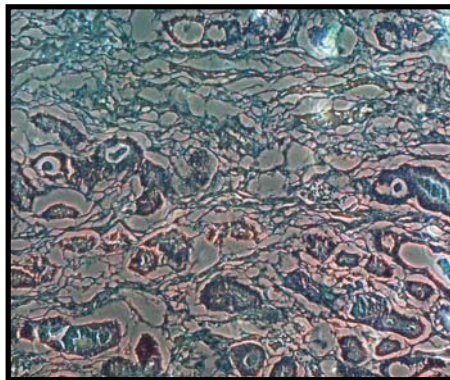


Figura 90 - Cumparsita. Coloração de Alcian Blue na biópsia do corpo uterino antes da infusão das células tronco. Objetiva=20x

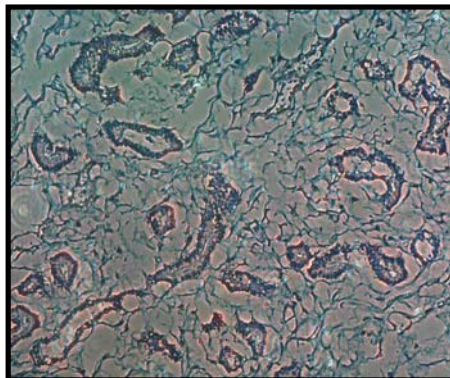


Figura 91 - Traírona. Coloração de Alcian Blue na biópsia do corpo uterino antes da infusão das células tronco. Objetiva=20x

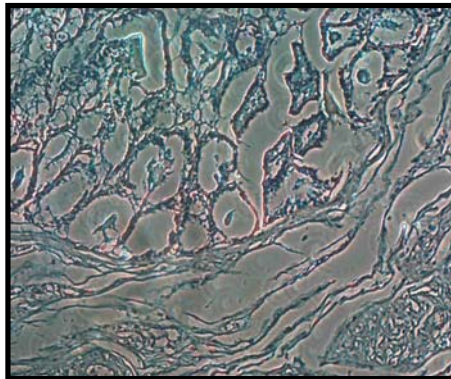


Figura 92 - Amanda. Coloração de Alcian Blue na biópsia do corpo uterino antes da infusão das células tronco. Objetiva=20x

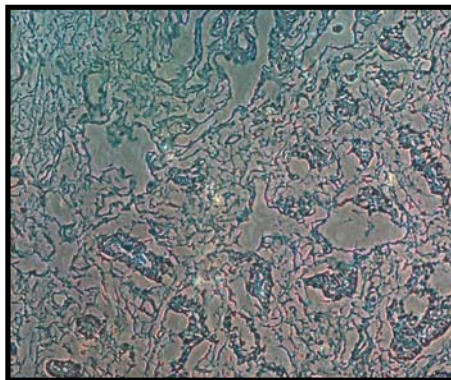


Figura 93 - Ki-Rumba. Animal controle. Coloração de Alcian Blue na biópsia do corpo uterino antes do experimento. Objetiva=20x

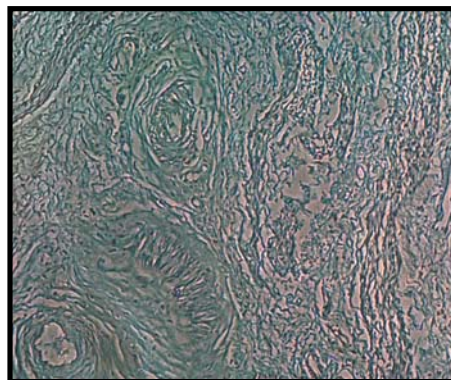


Figura 94 - Czarina. Animal controle. Coloração de Alcian Blue na biópsia do corpo uterino antes do experimento. Objetiva=20x

Alcian Blue - 7 dias após infusão

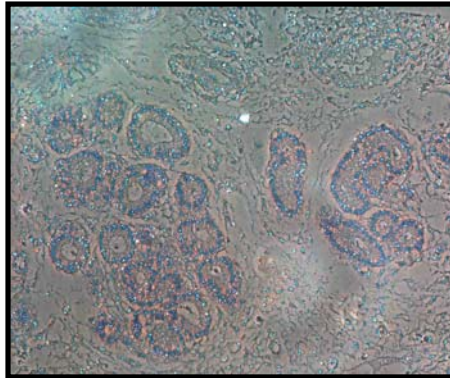


Figura 95 - Lobuna. Coloração de Alcian Blue na biópsia do corpo uterino, 7 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x

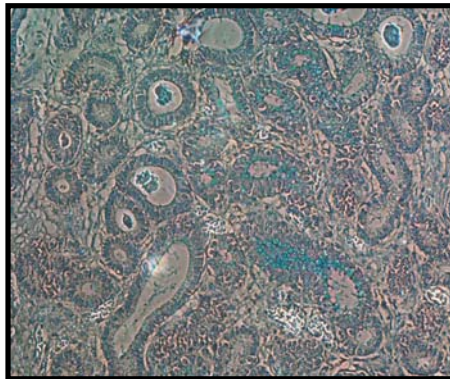


Figura 96 - Cumparsita. Coloração de Alcian Blue na biópsia do corpo uterino, 7 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x

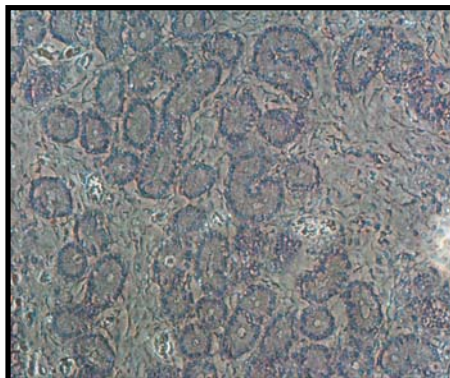


Figura 97 - Trairona. Coloração de Alcian Blue na biópsia do corpo uterino, 7 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x

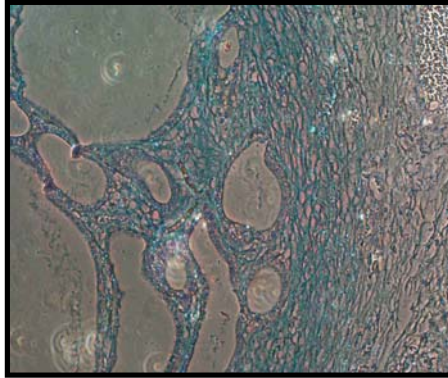


Figura 98 - Amanda. Coloração de Alcian Blue na biópsia do corpo uterino, 7 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x

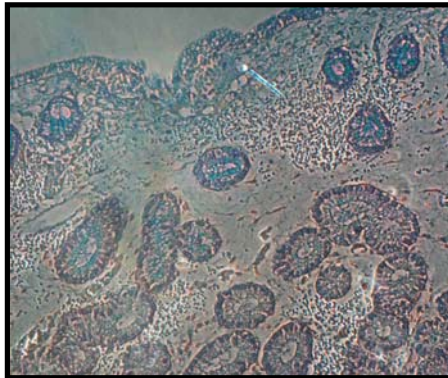


Figura 99 - Ki-Rumba. Animal controle. Coloração de Alcian Blue na biópsia do corpo uterino, 7 dias após o experimento. Objetiva=20x

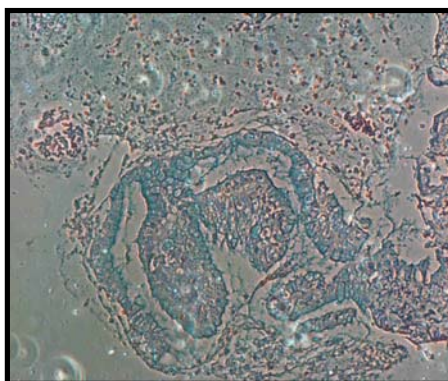


Figura 100 - Czarina. Animal controle. Coloração de Alcian Blue na biópsia do corpo uterino, 7 dias após o experimento. Objetiva=20x

Alcian Blue - 21 dias após infusão

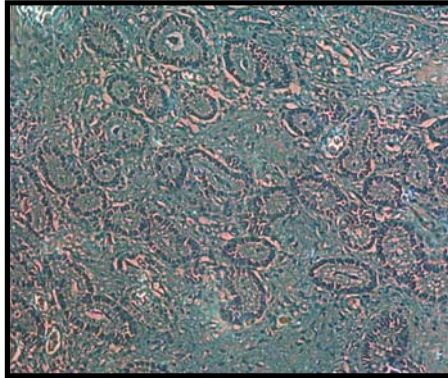


Figura 101 - Lobuna. Coloração de Alcian Blue na biópsia do corpo uterino, 21 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x

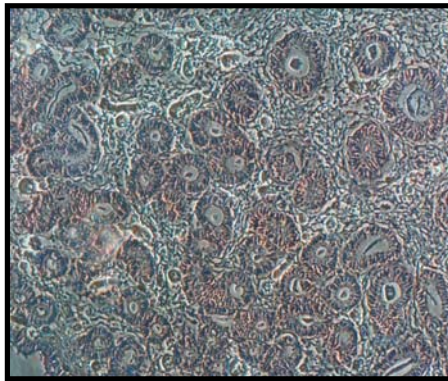


Figura 102. Cumparsita. Coloração de Alcian Blue na biópsia do corpo uterino, 21 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x

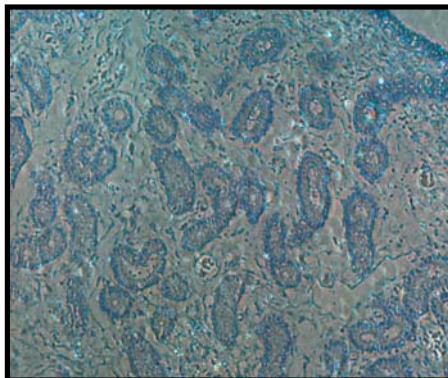


Figura 103 - Trairona. Coloração de Alcian Blue na biópsia do corpo uterino, 21 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x

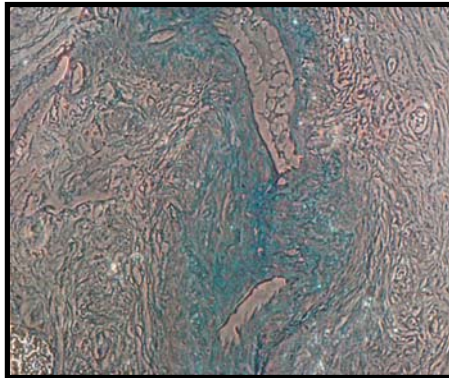


Figura 104 - Amanda. Coloração de Alcian Blue na biópsia do corpo uterino, 21 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x

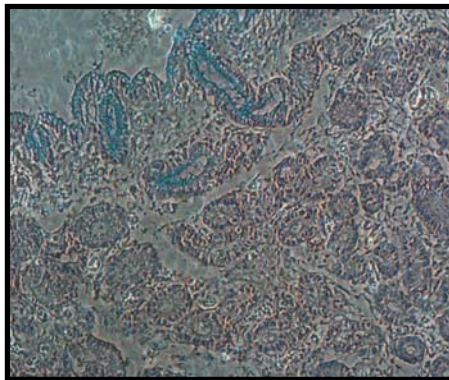


Figura 105 - Ki-Rumba. Animal controle. Coloração de Alcian Blue na biópsia do corpo uterino, 21 dias após o experimento. Objetiva=20x

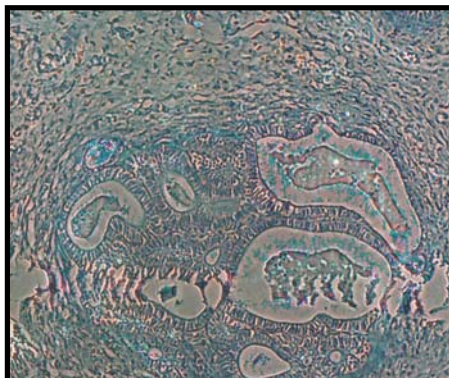


Figura 106 - Czarina. Animal controle. Coloração de Alcian Blue na biópsia do corpo uterino, 21 dias após o experimento. Objetiva=20x

Alcian Blue - 61 dias após infusão

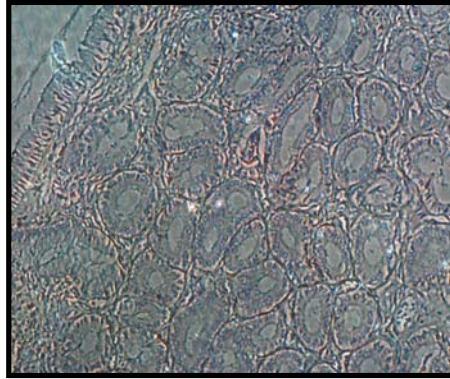


Figura 107 - Lobuna. Coloração de Alcian Blue na biópsia do corpo uterino, 61 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x

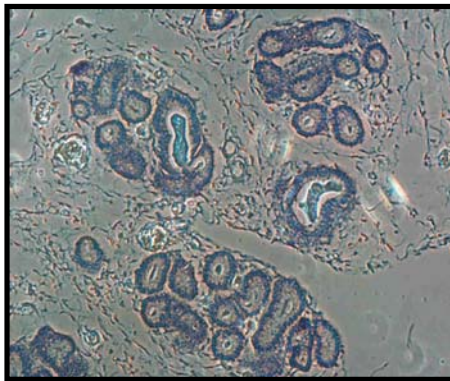


Figura 108 - Cumparsita. Coloração de Alcian Blue na biópsia do corpo uterino, 61 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x

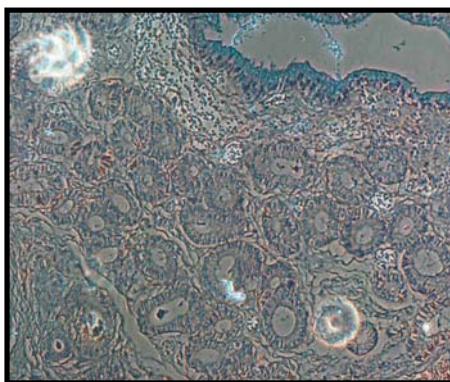


Figura 109 - Trairona. Coloração de Alcian Blue na biópsia do corpo uterino, 61 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x

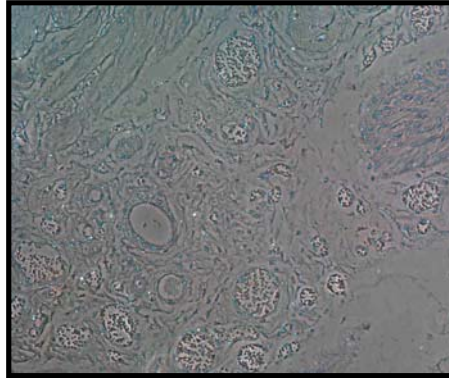


Figura 110 - Amanda. Coloração de Alcian Blue na biópsia do corpo uterino, 61 dias após a infusão das células tronco. Objetiva=20x

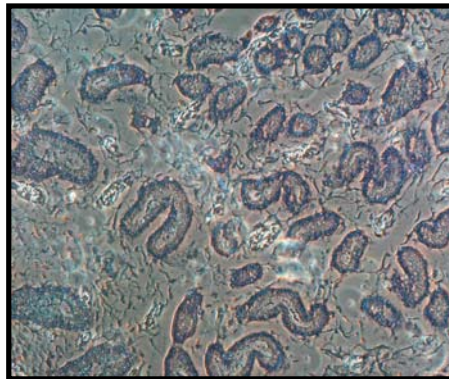


Figura 111 - Ki-Rumba. Animal controle. Coloração de Alcian Blue na biópsia do corpo uterino, 61 dias após o experimento. Objetiva=20x

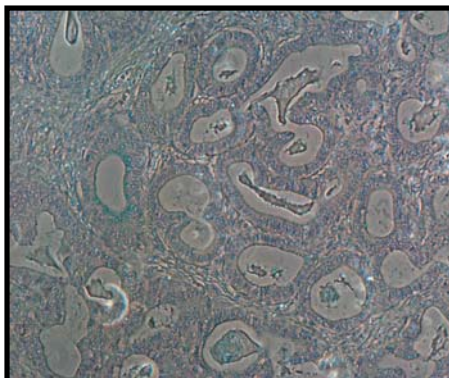


Figura 112 - Czarina. Animal controle. Coloração de Alcian Blue na biópsia do corpo uterino, 61 dias após o experimento. Objetiva=20x

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Através do presente trabalho, foi possível concluir:

1. Dando continuidade a caracterização das CT de tecido adiposo de equinos estabelecidas pelo nosso grupo, demonstramos que as mesmas apresentam características semelhantes as CT multipotentes;
2. As seis éguas utilizadas no presente trabalho não apresentaram inflamação uterina antes ou após a infusão das CT, pois as mesmas não estavam mais no estágio de endometrite, e sim, em um grau mais avançado de endometrose, portanto, o efeito anti-inflamatório das CT não poderia ser avaliado;
3. As CT de tecido adiposo de equinos têm capacidade de enxertar e se proliferar no tecido uterino de éguas afetadas pela endometrose;
4. Em estágios avançados da doença (degenerativo crônico) não observamos a presença das CT marcadas. Este dado sugere que o estado degenerativo do tecido não é um ambiente propício para o enxerto e a proliferação das CT;
5. As análises histológicas demonstraram que o aspecto morfológico e a organização do tecido, bem como, das glândulas uterinas, melhoraram significativamente após a infusão das CT. Este resultado foi observado progressivamente ao longo dos dias (após 21 e 61 dias da infusão das células);
6. No tecido periglandular fibroso, característico da endometrose, observamos uma diminuição no processo de fibrose após a infusão das CT. Nas amostras analisadas antes da infusão, o tecido se apresentou caoticamente desorganizado, e após a infusão o mesmo começou a se re organizar. Esta característica foi observada de maneira progressiva ao longo dos dias (após 21 e 61 dias da infusão das células);

7. As análises de citologia demonstraram que não houve inflamação do tecido uterino antes ou após a infusão das células, sugerindo que não há detecção de resposta imunológica nos animais que receberam as CT.

Assim, nossos dados sugerem que existem benefícios na utilização de células tronco de tecido adiposo de equinos no tratamento do tecido uterino acometido pela endometrose, que clinicamente só poderão ser validados após a prenhez dos animais.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ALVARADO, S. A. Stem cells: time to check our premises. **Cell Stem Cell**, v. 3, n. 1, p. 25-29, 2008.

ASBURY, A. C.; LYLE, S. K. Infectious causes of infertility. In: McKINNON, A. O.; VOSS, J. L.: **Equine reproduction**. Filadelfia: Lea & Febiger, p.381-391, 1993.

ASSMUS, B.; SCHÄCHINGER, V.; TEUPE, C.; BRITTEN, M.; LEHMANN, R.,; DÖBERT, N.; GRÜNWALD, F.; AICHER, A.; URBICH, C.; MARTIN, H.; HOELZER, D.; DIMMELER, S.; ZEIHNER, A. M. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction. **Circulation**, v. 106, n. 24, p. 3009-3017, 2002.

BARRY, F. P; BOYNTON, R. E.; HAYNESWORTH, S.; MURPHY, J. M.; ZAIA, J. The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105). **Biochemical Biophysical Research Communication**, v. 265, p. 134-139, 1999.

BAKSH, D.; SONG, L.; TUAN, R. S. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation and application in cells and gene therapy. **J Cell Mol Med**, v. 8, p. 301-316, 2004.

BIANCO, P.; COSSU, G. Uno, nessuno e Centomila: Searching for the identity of mesodermal progenitors. **Experimental Cell Research**, v. 251, p. 257-263, 1999.

CADARIO, M. E.; LOSINNO, L.; GIGUÈRE, S.; AGUILAR, J.; JACK, T. J.; MACPHERSON, M.; FITZPATRICK, C.; UHL, E. W. Uterine expression of fibrogenic cytokines in the mare. **Theriogenology**, v. 58, p. 449-452, 2002.

CAPLAN, A. I. Mesenchymal Stem Cells. **J Orthop Res**, v. 9, p. 641-650, 1991.

CAPLAN, A. I. Tissue engineering design for the future: new logics, old molecules. **Tissue Engineering**, v. 6, p. 1-8, 2000.

CAPLAN, A. I. Design parameters for function tissue engineering; in: Guilak, F.; Butler, D. L.; Goldstein, S. A.; Mooney, D. J. **Functional Tissue Engineering**, p. 129-138, 2003.

CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells: cells-based reconstructive therapy in orthopedics. **Tissue Engineering**, v. 11, n. 7/8, p. 1198-1211, 2005.

CAPLAN, A. I. Why are MSCs Therapeutic? New data: new insight. **J. Pathology**, 2008.

CARNEVALE, E. M.; GINTHER, O. J. Relationships of age to uterine function and reproductive efficiency in mares. **Theriogenology**, v. 37, p. 1101-1115, 1992.

CHOUMERANO, D. M.; DIMITRIOU, H.; KALMANTI, M. Stem cells: promises versus limitations. **Tissue Engineering**, v. 14, 2008.

COLTER, D. C.; CLASS, R.; DIGIROLAMO, C. M.; PROCKOP, D. J. RAPID expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. **Proceedings of the National Academic Sciences of United States of America**, v. 97, p. 3213-3218, 2000.

DELLMANN, H. D.; BROWN, E. M. Textbook of veterinary histology, **Filadélfia: Lea & Febiger**, v. 3, p. 330-334, 1987.

DOIG, P. A.; WAELCHLI, R. O. Endometrial biopsy. In: McKINNON, A. O.; VOSS J. L. **Equine Reproduction**, Filadélfia: Lea & Febiger, p. 225-233, 1993.

DORSHKIND, K. Stem cells and lineage plasticity, the challenge to existing paradigms. **Immunol Rev**, v.187, p.21-26, 2002.

FEHRER, C.; LEPPERDINGER, G. Mesenchymal stem cells aging. **Exp. Gerontology**, 2005.

FRIEDENSTEIN, A. J; CHAILAKHJAN, R. K.; LALYKINA, K. S. The development of fibroblast colonies on monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. **Cell Tissue Kinetic**, v. 3, p. 393-403, 1970.

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

FOLLMAR, K. E.; PRICHARD, H. L.; DECROOS, F. C.; WANG, H. T.; LEVIN, L. S.; KLITZMAN, B.; OLBRICH, K. C.; ERDMANN, D. Combined bone allograft and adipose-derived stem cell autograft in a rabbit model. **Ann Plast Surg**, v. 58, p. 561-568, 2007.

FORTIER, L. A. Stem cells: classifications, controversies and clinical applications. **Veterinary Surgery**, v. 34, p. 415-423, 2005.

GLEZERA, I.; TANIA MARCOURAKIS; MARIA CHRISTINA WERNECK AVELLAR; CLARICE GORENSTEIN; CRISTOFORO SCAVONE. The role of the transcription factor NF-kB in the molecular mechanisms of action of psychoactive drugs. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 22, p. 26-30, 2000.

HAN, Z. B.; CHEN, H. X.; DENG, J.X. Multipotential differentiation and potential applications of adipose-derived stem cells. **Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao**, v. 23, p. 195-201, 2007.

HERZOG, E. L.; CHAI, L.; KRAUSE, D. S. Plasticity of marrow-derived stem cells. **Blood**, v. 102, n. 10, p. 3483-93, 2003.

HOFFMANN, C.; BAZER, F. W.; KLUG, E.; ALLEN, W. R.; AUPPERLE, H.; ELLENBERGER, C.; SCHOON, H. A. Morphofunctional studies regarding the pathogenesis of the equine endometrosis with special emphasis on uterine secretions – preliminary results. **Pferdeheilkunde**. v. 19, n. 6, p. 666-669, 2003.

HOFFMANN, C.; CHRISTIN ELLENBERGER; RODRIGO COSTA MATTOS; HEIKE AUPPERLE; STEFAN DHEIN; BIRGIT STIEF; HEINZ-ADOLF SCHOON. The equine endometrosis: New insights into the pathogenesis. **Animal Reproduction Science**, p. 261-278, 2008.

KELLER, A. Avaliação Morfológica-Funcional da recuperação do endométrio equino através da infusão de neutrófilos imunocompetentes criopreservados, baseado em um modelo experimental definido. 108 f. Dissertação (Doutorado em Ciências Veterinárias) – **Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, 2004.

KENNEY, R. M. Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on embryonic death. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 172, p. 241-262, 1978.

KENNEY, R. M; DOIG, P. A. Equine endometrial biopsy. In: MORROW, D. A. **Current Therapy in Theriogenology**, W.B. Saunders Comp., p. 723-729, 1986.

KENNEY, R. M. The etiology, diagnosis and classification of chronic degenerative endometritis. In: Hughes, J.P. (Ed.), Workshop on Equine Endometritis. Newmarket, UK. **Equine Vet J**, v. 25, 1992.

IRINA KERKIS; ALEXANDRE KERKIS; DMITRI DOZORTSEV; GAËLLE CHOPIN STUKART-PARSONS; SÍLVIA MARIA GOMES MASSIRONI; LYGIA V. PEREIRA; ARNOLD I. CAPLAN; HUMBERTO F. CERRUTI. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. **Cell Tissues Organs**, v. 184, p. 105-116, 2006.

CATHERINE M KOLF; ELIZABETH CHO; ROCKY S TUAN. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: Regulation of niche, self-renewal and differentiation. **Arthritis Research Therapy**, v. 9, p. 204, 2007.

LACITIGNOLA, L.; CROVACE, A.; ROSSI, G.; FRANCIOSO, E. Cell therapy for tendinitis, experimental and clinical report. **Vet Res Commun**, v. 38, p. 33-38, 2008.

LARRÚ, M. Adult stem cells: an alternative to embryonic stem cells? **Trends Biotechnol**, v. 19, p. 487-491, 2001.

PENG LIU; ZHIHONG DENG; SHUFANG HAN; TAO LIU; NING WEN; WEI LU; XIANHUI GENG; SHA HUANG; YAN JIN. Tissue-Engineered Skin Containing Mesenchymal Stem Cells Improves Burn Wounds. **Artificial Organs**, v. 32, n. 12, p. 952-931, 2008.

LISLEY I. MAMBELLI; ENRICO J. C. SANTOS; PAULO J. R. FRAZÃO; MARIANA B. CHAPARRO; ALEXANDRE KERKIS; ANDRÉ L. V. ZOPPA; IRINA KERKIS. Characterization of Equine Adipose Tissue-Derived Progenitor Cells before and after Cryopreservation. **Tissue Engineering**, v. 15, n. 1, p. 1-8, 2009.

MARTIN, U. Method for studying stem cells: adult stem cells for lung repair. **Methods**, v. 45, p. 121-132, 2008.

MATTOS, R. C. Citologia endometrial na égua como método de diagnóstico auxiliar e complementar. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 8, n. 2, p. 83-90, 1984.

MESIMÄKI, K.; B. LINDROOS; J. TÖRNWALL; J. MAUNO; C. LINDQVIST; R. KONTIO S.; MIETTINEN; R. SUURONEN. Novel maxillary reconstruction with ectopic bone formation by GMP adipose stem cells. **Oral and Maxillofacial Surgery**, p. 1-9, 2009.

MEYER, C. Adult stem cells: agent for the future? **Pharm. Unsere. Zeit**, v. 30, p. 480, 2001.

MONTEIRO, B. G.; SERAFIM, R. C.; MELO, G. B.; SILVA, M. C. P.; LIZIER, N. F.; MARANDUBA, C. M. C.; SMITH, R. L.; KERKIS, A.; CERRUTI, H.; GOMES, J. A. P.; KERKIS, I. Human immature dental pulp stem cells share key characteristics features with limbal stem cells. **Cell Proliferation**, v. 42, p. 587-594, 2009.

NAKAGAMI, H.; MORISHITA, RYUICHI; MAEDA, KAZUHISA; KIKUCHI, YASUSHI; OGIHARA, TOSHIO; KANEDA, YASUFUMI. Adipose Tissue-Derived Stromal Cells as a Novel Option for Regenerative Cell Therapy. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 13, n. 2, p. 77-81, 2005.

NASEF, A. Immunomodulatory effect of mesenchymal stromal cells: possible mechanisms. **Regenerative Medicine**, v. 3, p. 531-546, 2008.

NEELY, D. P. Evaluation and Therapy of Genital Disease in the Mare. In: NEELY, D. P.; LIU, I. K. M.; HILLMAN, R. B. **Equine Reproduction**, Hoffmann-La Roche Inc., Nutley, New Jersey, p. 40-56, 1983.

NIEMEYER, P.; KRAUSE, U. L. F; PHILIP, KASTEN; PETER, C. KREUZ1; PHILIPP, HENLE; NORBERT, P. SÜDKAMP; ALEXANDER MEHLHORN. Mesenchymal Stem Cells-Based HLA-Independent Cell Therapy for Tissue Engineering of Bone and Cartilage. **Current Stem Cell Research e Therapy**, n. 1, p. 21-27, 2006.

PITTENGER, M. F.; ALASTAIR M. MACKAY; STEPHEN C. BECK; RAMA K. JAISWAL; ROBIN DOUGLAS; JOSEPH D MOSCA; MARK A. MOORMAN; DONALD W. SIMONETTI; STEWART CRAIG; DANIEL R. MARSHAK. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284, p. 143-147, 1999.

PITTENGER, M. F.; MARTIN, B. J. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. **Circ. Res**, v. 95, n. 1, p. 9-20, 2004.

POULSOM, R.; ALISON, M. R.; FORBES, S. J.; WRIGHT, N. A. Adult stem cell plasticity. **J Pathol**, v. 197, p. 441-456, 2002.

RAILA, G. Pathogenesis of equine endometrosis – an ultrastructural investigation. Abstract. **Pferdeheilkunde**, v. 13, p. 550-551, 1997.

RICKETTS, S. W. Endometrial biopsy as a guide to diagnosis of endometrial pathology in the mare. **J. Reprod. Fert**, v. 23, p. 341-345, 1975.

TOHMA, Y.; OHGUSHI, H.; MORISHITA, T.; DOHI, Y.; TADOKORO, M.; TANAKA, Y.; TAKAKURA, Y. Bone marrow-derived mesenchymal cells can rescue osteogenic capacity of devitalized autologous bone. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 2, p. 61-68, 2008.

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

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

VOGEL, H. J.; HUMKE, E. Der Formenzyklus der Uterindrüsen der Stute im Vergleich anderer Säugetiere und des Menschen. **Anat. Histol. Embryol.**, v. 2, p. 271-279, 1973.

ZHANG, M.; MAL, N.; KIEDROWSKI, M.; CHACKO, M.; ASKARI AT; POPOVIC, Z. B.; KOC, O.N.; PENN, M.S. SDF-1 expression by mesenchymal stem cells results in trophic support of cardiac myocytes after myocardial infarction. **FASEB Journal**, v. 21, p. 3197-3207, 2007.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; MIZUNO, H. Multi-lineage cells from human adipose tissue: implication for cell-based therapies. **Tissue Engineering**, v. 7, p. 211-228, 2001.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; ASHJIAN, P.; DE UGARTE, D.A.; HUANG, J.I.; MIZUNO, H.; ALFONSO, Z.C.; FRASER, J.K.; BENHAIM, P.; HEDRICK, M. H. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 13, p. 4279-4295, 2002.

WATSON, E. D.; SERTICH, P. L. Effect of repeated collection of multiple endometrial biopsy specimens on subsequent pregnancy in mares. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 201, n. 3, p. 438-440, 1992.

WENCESLAU, C.V.; MIGLINO, M.A.; MARTINS, D.S.; AMBRÓSIO, C.E.; LIZIER, N.F.; PIGNATARI, G.C.; KERKIS, I. Mesenchymal progenitor cells isolated from canine fetal tissues: yolk sac, liver and bone marrow. **Tissue Engineering**, 2010.

APÊNDICE

APÊNDICE A

Tissue Engineering: Part C v.15, n.1, p.1-8, 2009.

**Characterization of Equine Adipose Tissue Derived Progenitor Cells Before and After
Cryopreservation**

Lisley I. Mambelli,¹ Enrico J. C. Santos,^{1,2} Paulo J. R. Frazão,³ Mariana B. Chaparro,³ Alexandre Kerkis,² André L. V. Zoppa,³ Irina Kerkis,^{1,*}

¹Laboratory of Genetics, Butantan Institute, Sao Paulo, Brazil; ²Applied Genetics, Veterinary Activities Ltda. (Genética Aplicada), Sao Paulo, Brazil; ³Department of Surgery, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

ABSTRACT

In horses, stem cell therapies are a promising tool to the treatment of many injuries, which are common consequences of athletic endeavor, resulting in high morbidity and often compromising the performance. In spite of many advantages, the isolation of stem cells similar to human, from equine adipose tissue, occurred only recently. The aim of this study was to isolate equine adipose tissue derived progenitor cells (eAT-PC), to characterize their proliferative potential and to study their differentiation capacity before and after cryopreservation. The cells, isolated from horse adipose tissue, presented similar fibroblast-like cell morphology *in vitro*. Their proliferation rate was evaluated during 63 days (23 passages) before and after cryopreservation. After the induction of osteogenic differentiation, *von Kossa* staining, as well as, positive immunostaining studies, revealed the formation of calcified extracellular matrix confirming the osteogenic potential of these cells. Adipogenic differentiation was induced using two protocols: routine and other one developed by us, while our protocol requires a shorter time: Oil Red O staining revealed significant accumulation of lipid droplets after 7 days. Chondrogenic differentiation was observed after 21 days of induced pellet culture, as evidenced by histological (Toluidine blue) and immunohistochemistry studies. Our data demonstrate that eAT-PC can be easily isolated and

successfully expanded *in vitro*, while presenting significant proliferating rate. These cells can be maintained undifferentiated *in vitro* and can efficiently undergo differentiation at least into mesodermal derivatives. These eAT-PC properties were preserved even after cryopreservation. Our findings classify eAT-PC as a promising type of progenitor cells, which can be applied in different cell therapies in equines.

Key words: equine adipose tissue, progenitor cells, mesodermal derivatives, proliferative potential, cryopreservation

INTRODUCTION

Adult stem cells (ASC) are undifferentiated cells with self-renewal capacity, which have the ability to differentiate toward multiple cell lineages. These cells can be isolated from many tissues, for example, bone marrow¹, liver², dental pulp^{3,4}, pancreas⁵, retina^{6,7} and adipose tissue, as well⁸. Several publications evidenced that ASC reintroduced in the organism were capable to restore a tissue and its function, making it useful for tissue regeneration and further application in regenerative medicine⁹⁻¹¹.

In horses, ASC therapies are a promising tool to the treatment of many illnesses, such as arthritis, tendon lesion and suspensory ligament rupture, since these injuries are common consequences of athletic endeavor, resulting in high morbidity and often compromising the return to the same performance¹²⁻¹⁴. First, equine mesenchymal stem cells (eMSC) were isolated from bone marrow and were used to treat tendon lesion in equines, showing promising results, especially in the quality of the regenerated tissue¹⁵. Later, Koerner *et al.*¹⁶ isolated equine peripheral blood-derived progenitor's (ePBP) cells and compared them with eMSC. They found that eMSC had a higher proliferative potential and differentiation capacity *in vitro*, than ePBP cells. Independently, other group analyzed the growth characteristics and differentiation capacity of equine bone marrow (BM)-derived mesenchymal stem cells (MSC) towards osteogenic and adipogenic lineages *in vitro*, showing similar results¹⁷.

Several studies showed that human adipose tissue is a source of multipotent MSC, which can be successfully expanded *ex vivo*^{8,18,19,20}. Recently, it has been demonstrated the isolation of equine adipose tissue-derived stromal cells (eASC)²¹, which evaluated *in vitro* growth rate and showed the osteogenic and adipogenic potential of these cells.

Extending the previous finding and aiming at establishing a cell bank for further therapeutic applications in equines, the goal of our study was to isolate equine adipose tissue-derived progenitor cells (eAT-PC) and to evaluate their proliferative potential and differentiation capacity into osteogenic, chondrogenic, as well as adipogenic lineages before freezing and after thawing.

MATERIALS AND METHODS

Adipose Tissue Harvest

All studies were approved by the ethical committee of the School of Veterinary Medicine and Animal Science from University of Sao Paulo. The adipose tissue was collected from 10 horses with weights between 214 and 392 Kg, aged from 4 to 26 years old. Horses were sedated with SEDAZINE® 0.8 mg/kg intravenously, the area over adipose tissue collection was aseptically prepared and anesthesia was applied by local infiltration of 2% lidocaine. The tissue was collected from both dorsal-lateral region of the middle portion of the neck, beneath the horsehair origin and from lateral region of the tail origin, close to the semitendinosus muscle. The incision of 2-3 cm was made and pieces of fat in size of 1.5 cm² were obtained, followed by several washes of phosphate-buffered saline (PBS) 0.01M, pH 7.4, in order to remove hematopoietic cells. The subcutaneous tissue was closed with simple continuous suture (Vycril® 2.0) and the skin was closed with cruciate suture (Nylon® 2.0).

eAT-PC Isolation Method

Adipose tissues were dissected in grain sized pieces, digested at 37°C for 30 minutes with 0.075% collagenase (Type IV, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and mixed. Subsequently, basal culture medium containing Dulbecco's modified Eagle's medium-high glucose (DMEM-HG, Invitrogen), 15% fetal bovine serum (FBS, HyClone, Logan, Utah, USA), 1% antibiotic solution (Penicillin G -10.00U/ml, Amphotericin b – 25ug/ml, Streptomycin – 10.000ug/ml , 1% L - Glutamine – 200mM and 1% MEM Non-Essential Amino Acids (MEM NEAA, all reagents from Invitrogen), was added and the sample was centrifuged at 1000 rpm for 5 minutes. To complete progenitor cells isolation from primary adipocytes, the sample was briefly agitated and washed twice in PBS followed by centrifugation. Finally, a pellet was resuspended in DMEM-

HG containing 15% FBS and 1% antibiotic solution and a supernatant composed of oil and primary adipocytes was removed after centrifugation. The cell suspension, obtained from the pellet, which was composed of a stromal fraction of adipose tissue, was seeded at a density of 10^5 cell/cm² in culture wells 35 mm (Corning® Inc., Corning, NY, USA), using 2.5 ml of basal culture medium. After 24 hours, the culture was washed 3 times with PBS to remove residual non adherent cells. The cells were cultivated until they reached subconfluence before trypsinization (0.25% trypsin, Invitrogen). At this point, some of the cells were cryopreserved and the rest was expanded. During subsequent passages, the cells were seeded at a density of 10^5 cells/cm² in T25 flasks (Corning®) and maintained semi-confluent (~70-80%), in order to prevent their differentiation. They were replaced every 2-3 days and the culture medium was changed daily. The cells were incubated at 37°C in a 5% CO₂ humidified incubator.

eAT-PC were successfully isolated from 10 horses, while 3 of the cell strains, from unrelated animals, were used for further characterization.

Cell freezing and thawing

Cells were frozen and thawed according to routine protocol previously described by Kerkis *et al.*⁴. eAT-PC were frozen in a medium containing 20% FBS, 70% DMEM-HG and 10% dimethylsulfoxide (Sigma, St. Louis, Mo., USA) at a density of 5×10^5 cells/ml, and the temperature was slowly and gradually decreased at a rate of 1°C per minute until a final temperature of -70°C was reached. Thereafter, cells were transferred to liquid nitrogen. For thawing, cryo-vials with eAT-PC were placed into a 37°C water bath for 2 minutes and washed twice in 20% FBS and 70% DMEM-HG. Finally, the cells were seeded into T25 flasks using basal culture medium.

Cell growth rate

Cell growth rate was evaluated as described by Caplan²². The cells from three horses (names as CV-1, CV-2 and CV-3) were plated in T25 culture flasks using basal medium and incubated for 4 days until they reached semi-confluence. At this point, eAT-PC (passage 2, P2) were counted with a Neubauer chamber and seeded at a density of 10^5 cell/cm² into new T25 culture flasks. For the subsequent passages (P3 – P23), cells were grown for 3 days before trypsinization, in duplicate for each passage, counted and seeded into new T25 culture flasks. For

each eAT-PC strain (CV-1, CV-2 and CV-3), not only before but also after cryopreservation, the cells were counted and these values were put in a table (data not shown). After noted the number of the cells, with their corresponding passages and days of trypsinization, the average of all eAT-PC strain was taken and these values were used to build the graphic of cell growth rate.

eAT-PC differentiation assays

All differentiation assays (osteogenic, chondrogenic and adipogenic) were performed in triplicate and at least in three separate experiments using CV-1, CV-2 and CV-3. All differentiation experiments were performed before cryopreservation using cells at P7, and those after thawing, at P8 or P9.

The control culture medium used for each differentiation assays were the same (here named as basal culture medium), except for the osteogenic control medium which was supplemented with ascorbate-2-phosphate and β -glycerolphosphate (both from Sigma).

Osteogenic differentiation

The differentiation was induced by culturing eAT-PC in osteogenic medium for 21 days and examined for extra cellular matrix calcification by *von Kossa* staining as previously described by Zuk *et al.*⁸. To promote osteogenic differentiation, 5×10^3 cells/well were seeded into 6-well plates (Corning[®]) in DMEM low glucose (DMEM-LG, Invitrogen) and 2% Knockout Serum Replacement (KSR, Invitrogen) to produce subconfluent monolayer culture. After 24 hours, this medium was replaced by the same medium containing osteogenic supplements: 50 μ M ascorbate-2-phosphate and 0.1nM dexamethasone (Sigma). The medium was replaced every three days. At the day 10 of differentiation, the osteogenic medium was supplemented with 10mM β -glycerolphosphate. After 21 days, the cells were washed twice with PBS and fixed for 24 hours in 4% paraformaldehyde at 4°C. At the next day, *von Kossa* staining was performed.

Adipogenic differentiation

Two different protocols were used at the present work: one developed by our group and other, routine protocol, described previously by Zuk *et al.*⁸. According to our protocol, the cells were seeded in triplicate in 6-well plates at a density of 5×10^3 cells/well and cultured as monolayer for 72 hours in basal medium. To induce adipogenic differentiation, we used DMEM-

HG culture medium supplemented with 2% KSR, 1 μ M dexamethasone, 100 μ M indomethacin (Sigma), 0.5mM 1-methyl-3-isobutylxanthine (Sigma), 10 μ g/ml insulin (Sigma) and 1% antibiotic solution. At days 4 and 7 of differentiation, the cells were washed and fixed as described above. On the next day, Oil Red O staining was performed in order to detect intracellular lipid accumulation.

Chondrogenic differentiation

The differentiation was performed using pellet culture technique previously described by Johnstone *et al.*²³. Briefly, for the preparation of each pellet, CV-1, CV-2 and CV-3 of passage 5 were trypsinized, counted and resuspended in chondrogenic culture medium containing DMEM-HG supplemented with 6.25 μ g/ml insulin, 6.2 μ g/ml transferrin, 6.25 μ g/ml selenous acid, 5.33 μ g/ml linoleic acid (ITS, Premix, BD, USA), 0.1 μ M dexamethasone, 1mM sodium pyruvate (Invitrogen), 50 μ g/ml ascorbate-2-phosphate and with and without 0.1% TGF β 1 (R&D System, LGC Biotechnology, SP, Brazil). Aliquots of 4x10⁶ cells were spun down at 1667 rpm in 15 ml tube. Pellets were divided into 2 experimental groups (chondrogenic and basal culture medium). The cells were maintained at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂, for 21 days, by changing the chondrogenic culture medium everyday. Further, cells aggregates were embedded in paraffin and sections were stained with Toluidine blue (Sigma). The cells in the monolayer culture were also used as a control.

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry (IH) was performed using mouse anti-human chondroitin sulphate proteoglycan (aggrecan), and mouse anti-chicken collagen type II monoclonal antibodies (Chemicon, Temecula, CA, USA). Besides, it was used rabbit anti-human bone sialoprotein II polyclonal antibody, from Chemicon, Temecula, CA, USA, as well as anti-osteocalcin (LF-32) kindly provided by Dr. Larry Fisher, NIH. IH analysis was performed according to protocol of Kerkis *et al.*⁴. For IH analysis, cell differentiated in monolayer or pellet culture (chondrogenic differentiation) were embedded in Jung Tissue Freezing Medium (Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Germany) and frozen in liquid nitrogen, while undifferentiated eAT-PC in monolayer culture, incubated in basal medium, used as a control, were grown on coverslips. The

frozen sections from pellet culture and eAT-PC in monolayer culture, were washed twice in rinse buffer (TBS) (20mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.15M NaCl, 0.05% Tween-20), fixed with cold 4% paraformaldehyde for 20 minutes and washed twice in TBS. For permeabilization, 0.1% Triton (Sigma) was used. After blocking with 5% bovine serum albumin (Sigma), the sections and cells (control) were incubated with primary antibodies for 1 hour at room temperature at dilutions 1:100 for aggrecan and collagen type II, while 1:1000 for bone-sialoprotein and LF-32. After washing three times in TBS, Cy3-labeled anti-mouse and FITC-labeled anti-rabbit secondary antibodies (Chemicon) were added for 1 hour at 1:500 dilutions. The primary antibody was omitted from some slides to provide a negative control (data not shown). Microscope slides were mounted in Vectashield mounting medium with 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI, Vector Laboratories, Burlingame, CA) and analyzed under confocal microscopy with an argon laser set at 543 nm for Cy3 and at 488 nm for FITC excitation. The emitted light was filtered with 560 nm (Cy3) and 505 nm (FITC) long pass filter in a laser scan microscope (LSM 410, Zeiss, Jena, Germany). Laser was calibrated before each experiment and photo-multiplier gain and laser power were kept constant throughout each experiment.

RESULTS

In vitro eAT-PC isolation and expansion

The eAT-PC were isolated following previously described protocol²¹ and the first cells were observed 4 days after plating. At the point, when achieved semi-confluence (P1), the cells were further expanded. All eAT-PC (CV-1, CV-2 and CV-3), obtained from 3 different horses, present fibroblast-like cell morphology, which was preserved even after cryopreservation at early and late passages (Figure 1 A, B).

Cell growth rate

The proliferative capacity of CV-1, CV-2 and CV-3 was analyzed during 63 days corresponding to 23 passages. In both experiments, before freezing and after thawing, the counting started at P2 and the cells presented constant growth rate during 30 days (P12). After thawing, they showed proliferative rate decline at day 30 (P12), while those, which were not submitted to cryopreservation presented it later, at day 39 (P15) (Figure 2).

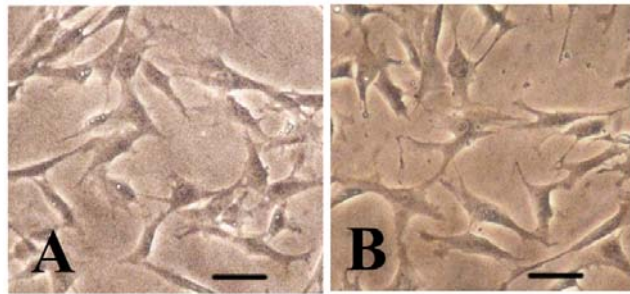


Figure 1

Figure 1. Morphology of eAT-PC. (A,B) Representative images of eAT-PC after cryopreservation, at early passage (P2) and at late passage (P20). Phase Contrast. Scale Bars: A,B=20µm.

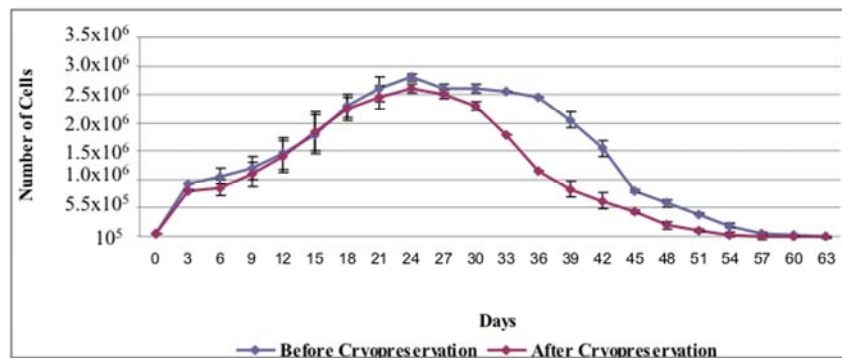


Figure 2

Figure 2. Representative graphic showing proliferating potential of eAT-PC cells during 63 days (23 passages) was built up using calculations based on Neubauer-counting chamber. After thawing, significant decline of eAT-PC proliferation was observed at day 30 (P12), while those, which were not submitted to cryopreservation, presented it later at day 39 (P15). Each black bar ($\bar{\text{I}}$) in all points of the graphic represent the standard deviation.

Osteogenic differentiation

Following induction of osteogenic differentiation, the formation of an initial mineralization of extracellular matrix was evidenced even without any staining at day 11 (Figure 3 A), which became stronger at day 21, when the major part of the cells was mineralized (Figure 3 B). Such changes were not observed in control culture after 21 days (Figure 3 C). The differentiated eAT-PC presented positive *von Kossa* staining (Figure 3 D-F). Figure 3 G, H

demonstrate the overview of osteogenic differentiation observed at day 21 in eAT-PC before (Figure 3 G) and after thawing (Figure 3 H). Note that experimental wells (upper), with osteogenic differentiation of eAT-PC (*von Kossa* staining) before cryopreservation, showed multiple focuses of mineralization and a few of such focuses can also be observed in control ones (down) (Figure 3 G), In contrast, eAT-PC induced to osteogenic differentiation after thawing (upper), did not present any evidence of mineralization in control cultures (down) (Figure 3 H). Additionally, osteogenic differentiation was confirmed using specific anti-bodies: osteocalcin, which is a noncollagenous protein found in bone and dentin, as well as bone sialoprotein II (BSP II), which is a component of mineralized tissues such as bone, dentin, cementum and calcified cartilage. Both antibodies reacted positively with differentiated eAT-PC (Figure 3 I, K), while undifferentiated cells did not present any labeling (Figure 3 J,L).

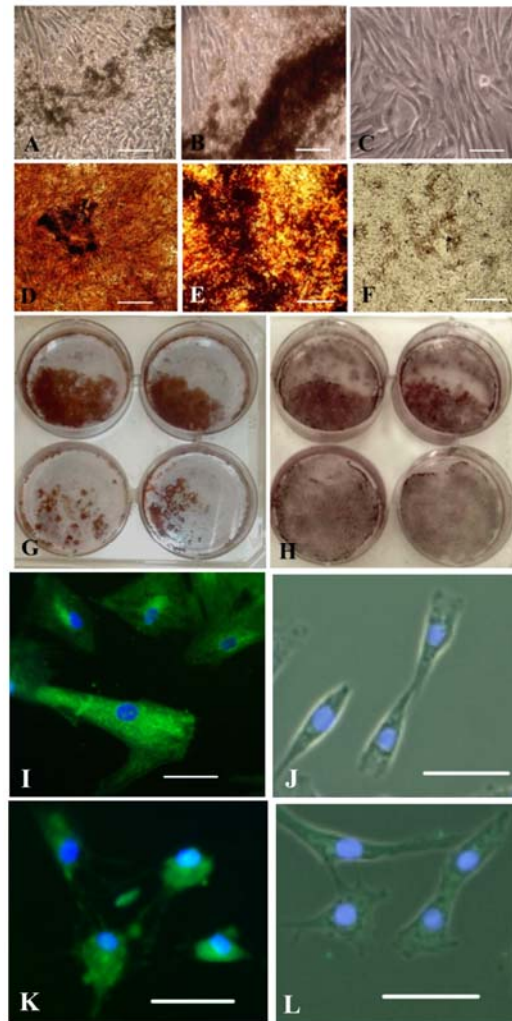


Figure 3

Figure 3. Representative image of osteogenic differentiation induced in eAT-PC before (**A-C,G**) and after (**D-F,H**) cryopreservation. (**A**) Initial mineralization of extracellular matrix observed in eAT-PC (without any type of staining) after 11 days of differentiation. (**B**) Strong mineralization observed in eAT-PC after 21 days. (**C**) The cells cultured (21 days) in control osteogenic medium did not present any signs of mineralization. *Von Kossa* staining revealed calcified extracellular matrix (arrows) in eAT-PC cultured in osteogenic medium: (**D**) at day 11 and (**E**) at day 21. (**F**) Control culture (21 days) remained *von Kossa* negative. (**G,H**) Overview of osteogenic differentiation observed at day 21 in two experimental (upper) and two control (down) wells before (**G**) and after (**H**) cryopreservation. Positive immunostaining (green) was observed in eAT-PC after induction of osteogenic differentiation (10 days) with anti-osteocalcin LF-32 (**I**) and anti-bone sialoprotein II (**K**) antibodies (both after cryopreservation). Control,

undifferentiated eAT-PC, did not react with both antibodies (**J,L**). Phase Contrast (**A-H**). Confocal microscopy: Fluorescent microscopy (**I,K**). Fluorescent microscopy + Differential interference contrast (J,L). Scale Bars: **A,B,D-F**=50 μ m; **C**=40 μ m, **I-L**=50 μ m.

Adipogenic differentiation

After induction of adipogenic differentiation before cryopreservation, the cell morphology was changed in 24 hours from the elongated fibroblastic cells to oval-shaped cells (data not shown). Following 4 days of differentiation, the vacuoles in cell cytoplasm, which stained positively by Oil Red O, were observed (Figure 4 A). At the day 7, an increasing number of the cells presented a great number of these vacuoles (Figure 4 B), while in the control culture a few cells altered their morphology and none of them were positive for Oil Red O staining after 7 days (Figure 4 C). Similar results were obtained in adipogenic differentiation after cryopreservation (Figure 4 D-F).

Chondrogenic differentiation

Pellet culture of eAT-PC was used to induce chondrogenic differentiation. The potential of eAT-PC to differentiate before and after cryopreservation along the chondrogenic lineage was characterized 21 days after the induction by the staining of extracellular cartilage matrix proteoglycans, which showed intensive Toluidine blue positive staining (Figure 4 G-H). Type II collagen, as the crucial component of extracellular cartilage matrix, and cartilage proteoglycans (aggrecan), were identified by immunohistochemistry in pellet culture after thawing (Figure 4 I, J), respectively, while undifferentiated cells, which were used as control, did not react positively with these antibodies (Figure 4 Insets in I, J). Positive immunostaining for type II collagen and aggrecan was similarly observed in differentiated eAT-PC in pellet culture before cryopreservation (data not shown).

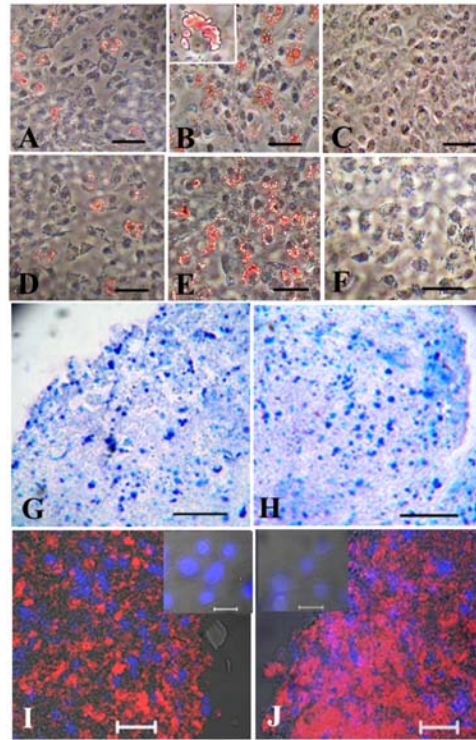


Figure 4

Figure 4. Representative image of adipogenic differentiation induced in eAT-PC before (**A-C**) and after (**D-F**) cryopreservation. Oil Red O staining showed accumulation of lipid-filled droplets (arrows) within the differentiated eAT-PC cultured in adipogenic medium during 4 (**A**) and 7 (**B**) days. Inset in (**B**) shows details of Oil Red O staining. (**C**) Control culture, 7 days after growing in basal culture medium. No Oil Red O staining has been observed. (**D,E**) Same as in (**A,B**) observed after cryopreservation. (**F**) Same as in (**C**) after thawing. Representative image of chondrogenic differentiation induced with TGF β 1 (**G-J**). Positive Toluidine blue staining observed in pellet culture of eAT-PC before (**G**) and after (**H**) cryopreservation. Positive immunostaining (red) with anti-chondroitin sulphate proteoglycan (aggrecan) (**I**) and anti-collagen Type II (**J**) antibodies (both after cryopreservation). Insets in I and J, monolayer culture of eAT-PC used as a control did not present any fluorescent signal. Nuclei stained with DAPI (blue). I,J and Insets=Confocal microscopy: Fluorescent microscopy + Differential interference contrast. Scale bars: **A-F**=20 μ m; **G,H**=100 μ m; **I,J** and Insets=10 μ m.

DISCUSSION

Several publications demonstrated that adipose tissue is a promising easily harvesting source of stem cells for therapies and cell banking^{8,18,19,20,21}. We showed that the isolation and *in vitro* expansion of eAT-PC occurred in primary cultures, corresponding to fibroblast-like cells morphology and without any kind of complications, once we established the cells from adipose tissue of all animals used in the present work. According to Vidal *et al.*²¹, eASC isolated by his group presented a continuous growing until P10. Aiming at the potential therapeutic use of eAT-PC in veterinary medicine, we analyzed their growth rate during more than 23 passages. We did not observe significant changes in growth rate of eAT-PC until P15 and P12 before and after cryopreservation, respectively. This makes reasonable banking of eAT-PC, however, further characterization is needed in order to demonstrate their therapeutic potential. Thus, based on growth rate of these cells, we decided to classify them as progenitor cells, while their self-renewing potential seems to be limited.

Recently, it has been reported the isolation of progenitor cells from equine peripheral blood. The advantage of obtaining stem cells from peripheral blood is a safe and virtually pain-free method, however, Koerner *et al.*¹⁶ confirmed that the number of stem cells obtained in this procedure, is reduced. They also showed that these cells present a low proliferative capacity and rate of viability either (approximately 50%) after cryopreservation, although other research group reported, that they presented multilineage differentiation potential under appropriate conditions²⁴. In contrast, equine BM-derived MSC presented a high proliferative capacity, as well as cell viability even after cryopreservation (approximately 90%), which, however, decline when isolated from the tissues of the increased aged horse^{16,17,25}. Our data indicate that eAT-PC present similar proliferate capacity when compared to equine BM-derived MSC.

We demonstrated that eAT-PC also showed differentiation potential similar to equine BM-derived MSC towards mesodermal derivatives. In addition, this potential of eAT-PC was preserved in different experiments performed before and after cryopreservation, as confirmed by histochemical and immunohistochemical staining. Adipogenic differentiation of eAT-PC using modified protocol, as described at the present work, can occur at the time apparently shorter than those described previously²¹. Several eAT-PC accumulate lipid droplets in cytoplasm within 4 days, and at day 7 of adipogenic differentiation, the majority of the cells present numerous lipid

droplets in the cytoplasm, while according to Vidal *et al.*²¹ this occurs only after 10 days. Furthermore, in contrast to this aforementioned work, it was not necessary the addition of rabbit serum to achieve any reliable adipogenesis or fat droplets accumulation. In addition, we showed for the first time, that eAT-PC were capable to undergo chondrogenic differentiation in pellet culture. Similar to equine BM-derived MSC, TGF β 1 was not required for chondrogenic differentiation¹⁶. Moreover, the formation of high-density micromass cultures (pellets) occurred only in the chondrogenic induction medium and not in basal one. Chondrogenic differentiation failed to occur in monolayer culture of eAT-PC even under appropriate conditions. Consequently, as control, undifferentiated eAT-PC in monolayer culture was used, which did not present positive Toluidine blue (data not shown) or IH staining, using anti-chondroitin sulphate proteoglycan (aggrecan) or anti-collagen Type II antibodies. Osteogenic differentiation was confirmed by the extracellular matrix mineralization and also by the presence of nodules positive stained by *von Kossa* as well as by positive immunostaining with anti-osteocalcin and anti-bone sialoprotein II antibodies. Although eAT-PC before cryopreservation showed the presence of some focus of mineralization in control cultures, the differentiation observed in experimental cultures was much more efficient. These results suggest that undifferentiated eAT-PC culture before cryopreservation contains several osteogenic precursor cells, which can undergo osteogenic differentiation even in basal medium. This hypothesis seems to be real, because the cells after thawing did not present signals of differentiation in control culture, suggesting that committed cells (osteogenic precursors) were eliminated during the process of cryopreservation. However, this hypothesis needs further investigation.

Currently, differentiation assays are used in order to characterize equine progenitor cells and MSC, since no specific markers have been proposed for these cells^{16,17,21,26}. We verify the expression of human MSC markers, such as CD29, CD31, CD34, CD45, CD117 and STRO-1 in eAT-PC and in human MSC, as a positive control, using flow cytometry analysis. Although we did not present here our results, no reactivity was observed between these markers and eAT-PC, while human MSC, as expected, showed positive immunostaining. It is noteworthy to highlight that previous publications showed positive reaction of human stem cells markers with equine umbilical cord-derived matrix cells and umbilical cord derived stem cell population^{27,28}. Such discrepancy with our result can be explained by the fact that eAT-PC were isolated from adipose tissue of adult horses, while those of umbilical cord from fetal tissue. Our data, taken together

with those previously published, indicate that the use of human MSC markers in equine progenitor cells and MSC isolated from different tissues and at different ages, are needed to be clarified.

We demonstrated that eAT-PC were able to differentiate into derivatives of mesoderm showing osteogenic, chondrogenic and adipogenic potential and presenting similar characteristics of eASC²¹, which can be maintained after cryopreservation. However, it is not possible to conclude if eAT-PC are the same cell population as that isolated by Vidal's team, since more detailed studies using specific markers would be necessary. Our data, taken together with previously published, strongly suggest that stem cells isolated from equine adipose tissue are a promising candidate for cell therapy, which can be used to the treatment of several injuries in equines, at least those, which need mesodermal derivatives for the repairing process. These findings will also provide the significant biological, technical and procedural knowledge for further studies towards technological advance in stem cells applications on horse health.

REFERENCES

1. Jiang Y., Jahagirdar B.N. and Reinhardt R.L. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418, 41, 2002.
2. Zheng Y.W. and Taniguchi H. Diversity of hepatic stem cells in the fetal and adult liver. *Semin Liver Dis* 23, 337, 2003.
3. Murray P.E. and Garcia-Godoy F. Stem cells responses in tooth regeneration. *Stem Cells Dev* 13, 255, 2004.
4. Kerkis I., Kerkis A., Dozortsev D., Parsons G., Massironi S., Pereira L., Caplan I. and Cerruti H. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. *Cell Tissues Organs* 184, 105, 2006.
5. Bouwens L. Transdifferentiation versus stem cell hypothesis for the regeneration of islet beta-cells in the pancreas. *Microsc Res Tech* 43, 332, 1998.
6. Boluton M. and Albon J. Stem cells in the eye. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 643, 2004.
7. Klassen H., Sakaguchi D.S. and Young M.J. Stem cells and retinal repair. *Prog Retin Eyes Res* 23, 149, 2004.
8. Zuk P.A., Zhu M. and Mizuno H. Multi-lineage cells from human adipose tissue: implication for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7, 211, 2001.

9. Caplan A.I. Tissue engineering design for the future: new logics, old molecules. *Tissue Engineering* 6, 1, 2000.
10. Caplan A.I. Design parameters for function tissue engineering; in: Guilak, F., Butler, D.L., Goldstein, S.A. and Mooney, D.J. (ed): *Functional Tissue Engineering* Springer-Verlag, New York, 129, 2003.
11. Caplan A.I. Mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics. *Tissue Engineering* 11, 1198, 2005.
12. Awad H.A., Butler D.L., Boivin G.P., Smith F.N., Malaviya P., Huibregtse B., Caplan A.I. Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon. *Tissue Eng* 5, 1999.
13. Herthel D.J. Enhanced suspensory ligament healing in 100 horses by stem cell and other bone marrow components. *AAEP Proceedings* 47, 2001.
14. Smith R.K.W., Korada M., Blunn G.W., Goodship A.E. Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. *Equine Vet J* 35, 1, 2003.
15. Smith R.K.W. and Webbon P.M. Harnessing the stem cell for the treatment of tendon injuries: heralding a new dawn? *Br J Sports Med* 39, 582, 2005.
16. Koerner J., Nesic D., Romero J.D., Brehm W., Mainil-Varlet P. and Grogan S.P. Equine peripheral blood-derived progenitors in comparison to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24, 1613, 2006.
17. Vidal M.A., Kilroy G.E., Johnson J.R., Lopez M.J., Moore R.M. and Gimble J.M. Cell growth characteristics and differentiation frequency of adherent equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity. *Veterinary Surgery* 35, 601, 2006.
18. Timper K., Seboek D., Eberhardt M., Linscheid P., Christ-Crain M., Keller U., Müller B. and Zulewski H. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. *Biochem Biophys Res Commun* 24, 1135, 2006.
19. Follmar K.E., Prichard H.L., DeCroos F.C., Wang H.T., Levin L.S., Klitzman B., Olbrich K.C. and Erdmann D. Combined bone allograft and adipose-derived stem cell autograft in a rabbit model. *Ann Plast Surg* 58, 561, 2007.
20. Han Z.B., Chen H.X. and Deng J.X. Multipotential differentiation and potential applications of adipose-derived stem cells. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 23, 195, 2007.
21. Vidal M.A., Kilroy G.E., Lopez M.J., Johnson J.R., Moore R.M. and Gimble J.M. characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: adipogenic and osteogenic

- capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Veterinary Surgery* 36, 613, 2007.
22. Caplan A.I. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 9, 641, 1991.
23. Johnstone B., Hering T.M., Caplan A.I., Goldberg V.M. and Yoo J.U. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* 238, 265, 1998.
24. Giovannini S., Brehm W., Mainil-Varlet P. and Nestic D. Multilineage differentiation potential of equine blood-derived fibroblast-like cells. *Differentiation* 76, 118, 2008.
25. Arnhold S.J., Goletz I., Klein H., Stumpf G., Beluche L.A., Rohde C., Addicks K. and Litzke L.F. Isolation and characterization of bone marrow-derived equine mesenchymal stem cells. *Am J Vet Res*. 68, 1095, 2007.
26. Koch T.G., Heerkens T., Thomsen P.D. and Betts D.H. Isolation of mesenchymal stem cells from equine umbilical cord blood. *BMC Biotechnology* 26, 1, 2007.
27. Hoynowski S.M., Fry M.M., Gardner B.M., Leming M.T., Tucher J.R., Black L., Sand T.S and Mitchell K.E. Characterization and differentiation of equine umbilical cord-derived matrix cells. *BBRC* 362, 347, 2007.
28. Reed S.A. and Johnson S.E. Equine umbilical cord blood contains a population of stem cells that express Oct4 and differentiate into mesodermal and endodermal cell types. *J Cell Physiol.* 215, 329, 2008.