

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ  
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA VIDA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**FERNANDA ZETTEL BASTOS**

**CARACTERIZAÇÃO, SEGURANÇA E POTENCIAL IMUNOMODULADOR DE  
CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS DERIVADAS DE MEDULA ÓSSEA  
DE EQUINOS**

(Characterization, safety and immunomodulatory potential of equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells)

**CURITIBA**

**2019**

**FERNANDA ZETTEL BASTOS**

**CARACTERIZAÇÃO, SEGURANÇA E POTENCIAL IMUNOMODULADOR DE  
CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS DERIVADAS DE MEDULA ÓSSEA  
DE EQUINOS**

(Characterization, safety and immunomodulatory potential of equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração Saúde, Tecnologia e Produção Animal, da Escola de Ciências da Vida da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, para obtenção do título de Doutor em Saúde, Tecnologia e Produção Animal Integrada.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Vicente Michelotto Jr.

Coorientadora: Profa. Dra. Alexandra Cristina Senegaglia

Coorientadora: Profa. Dra. Fernanda Ferreira Cruz

**CURITIBA**

**2019**



Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal  
Câmpus Curitiba

**ATA Nº 0003 E PARECER FINAL DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM  
CIÊNCIA ANIMAL DA ALUNA FERNANDA ZETTEL BASTOS**

Aos dezoito dias do mês de julho do ano de dois mil e dezenove, às 13h30, realizou-se na sala de vídeo 02, térreo do Bloco Verde, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, localizada no Campus de Curitiba, Rua Imaculada Conceição, nº 1155, Prado Velho – Curitiba – PR, a sessão fechada de defesa da tese da doutoranda Fernanda Zettel Bastos, intitulada: “CARACTERIZAÇÃO, SEGURANÇA E POTENCIAL IMUNOMODULADOR DE CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS DERIVADAS DE MEDULA ÓSSEA DE EQUINOS”. A doutoranda concluiu os créditos exigidos para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal, segundo os registros constantes na secretaria do Programa. Os trabalhos foram conduzidos pelo Professor orientador e Presidente da banca, Dr. Pedro Vicente Michelotto Junior (PUCPR), auxiliado pelos Professores Doutores Cristina de Oliveira Massoco Salles Gomes (FMVZ-USP), Marco Augusto Stimamiglio (ICC-FIOCRUZ/PR), Andréa Novais Moreno Amaral (PUCPR) e Marconi Rodrigues de Farias (PUCPR). Procedeu-se à exposição da tese, seguida de sua argüição pública e defesa. Encerrada a fase, os examinadores expediram o parecer final sobre a tese, que foi considerada Aprovada.

**MEMBROS**

**Prof Dr Pedro Vicente Michelotto Junior - Orientador**  
**Prof Dr Cristina de Oliveira Massoco Salles Gomes (USP)**  
**Prof Dr Marco Augusto Stimamiglio(ICC-FIOCRUZ/PR)**  
**Prof Dr Andréa Novais Moreno Amaral (PUCPR)**  
**Prof Dr Marconi Rodrigues de Farias (PUCPR)**

**ASSINATURA**

Proclamado o resultado, o Presidente da Banca Examinadora encerrou os trabalhos, e para que tudo conste, eu Caroline Nocera Bertton, confiro e assino a presente ata juntamente com os membros da Banca Examinadora.

Curitiba, 18 de julho de 2019.

**Caroline Nocera Bertton**  
**Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal**

**Profa. Dra. Renata Ernlund Freitas de Macedo**  
**Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal**

## SUMÁRIO

	Página
<b>DEDICATÓRIA</b> .....	vi
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	vii
<b>FORMATO DA TESE</b> .....	ix
<b>RESUMO GERAL</b> .....	x
<b>ABSTRACT</b> .....	xii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	xiv
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xvi
<b>LISTA DE QUADROS</b> .....	xvii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xviii
<b>CAPÍTULO 1: COLLECTION, PROCESSING AND FREEZING OF EQUINE BONE MARROW CELLS</b> .....	1
Abstract .....	1
1.1 INTRODUCTION .....	1
1.2 MATERIAL AND METHODS .....	3
1.2.1 Animals .....	3
1.2.2 Experimental Design .....	3
1.2.3 Bone Marrow Collection .....	4
1.2.4 Bone Marrow Processing .....	6
1.2.5 Freezing of BMMCs .....	6
1.2.6 Statistical Analyses .....	7
1.3 RESULTS .....	7
1.3.1 Bone Marrow Collection .....	7
1.3.2 Bone Marrow Processing .....	7
1.3.3 Freezing of BMMCs .....	9
1.4 DISCUSSION .....	10
1.5 CONCLUSION .....	13
1.6 REFERENCES .....	14
<b>CAPÍTULO 2: CARACTERIZAÇÃO E QUALIFICAÇÃO DE CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS DERIVADAS DE MEDULA ÓSSEA DE EQUINOS E COMPARAÇÃO DO SEU POTENCIAL IMUNOMODULADOR COM O DO MEIO CONDICIONADO</b> .....	19

Resumo .....	19
2.1 INTRODUÇÃO .....	20
2.2 METODOLOGIA .....	21
<b>2.2.1 Delineamento do estudo .....</b>	<b>21</b>
<b>2.2.2 Animais .....</b>	<b>22</b>
<b>2.2.3 Coleta de medula óssea .....</b>	<b>22</b>
<b>2.2.4 Isolamento das células mononucleares derivadas de medula óssea .....</b>	<b>23</b>
<b>2.2.5 Cultivo das células estromais mesenquimais .....</b>	<b>24</b>
<b>2.2.6 Caracterização imunofenotípica das células estromais mesenquimais .....</b>	<b>25</b>
<b>2.2.7 Análise citogenética .....</b>	<b>27</b>
<b>2.2.8 Controle microbiológico .....</b>	<b>29</b>
<b>2.2.9 Preparo do meio condicionado .....</b>	<b>29</b>
<b>2.2.10 Ensaio de inibição de linfócitos .....</b>	<b>29</b>
<b>2.2.11 Análise estatística .....</b>	<b>32</b>
2.3 RESULTADOS .....	32
<b>2.3.1 Delineamento do estudo .....</b>	<b>32</b>
<b>2.3.2 Cultivo das células estromais mesenquimais .....</b>	<b>33</b>
<b>2.3.3 Caracterização imunofenotípica das células estromais mesenquimais .....</b>	<b>33</b>
<b>2.3.4 Análise citogenética .....</b>	<b>35</b>
<b>2.3.5 Controle microbiológico .....</b>	<b>37</b>
<b>2.3.6 Ensaio de inibição de linfócitos .....</b>	<b>37</b>
2.4 DISCUSSÃO .....	42
2.5 CONCLUSÃO .....	47
2.6 REFERÊNCIAS .....	48
<b>CAPÍTULO 3: EFEITOS DAS CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS EQUINAS EM FRAGMENTOS DE PULMÃO DE CAMUNDONGO ESTIMULADOS COM LIPOPOLISSACARÍDEO OU ZYMOSAN .....</b>	<b>53</b>
Resumo .....	53
3.1 INTRODUÇÃO .....	54
3.2 METODOLOGIA .....	56
<b>3.2.1 Delineamento do estudo .....</b>	<b>56</b>

<b>3.2.2 Animais .....</b>	<b>56</b>
<b>3.2.3 Obtenção dos fragmentos de pulmão (<i>lung slices</i>) .....</b>	<b>57</b>
<b>3.2.4 Cultivo de células estromais mesenquimais equinas .....</b>	<b>58</b>
<b>3.2.5 Contração bronquial dependente do tempo (experimento 1) .....</b>	<b>59</b>
<b>3.2.6 Contração bronquial provocada por metacolina (experimento 2) .....</b>	<b>62</b>
<b>3.2.7 Secreção de TNF-<math>\alpha</math> (experimento 3) .....</b>	<b>62</b>
<b>3.2.8 Análise das imagens .....</b>	<b>65</b>
<b>3.2.9 Análise estatística .....</b>	<b>66</b>
<b>3.3 RESULTADOS .....</b>	<b>66</b>
<b>3.3.1 Contração bronquial dependente do tempo .....</b>	<b>66</b>
<b>3.3.2 Contração bronquial provocada por metacolina .....</b>	<b>68</b>
<b>3.3.3 Secreção de TNF-<math>\alpha</math> .....</b>	<b>69</b>
<b>3.4 DISCUSSÃO .....</b>	<b>71</b>
<b>3.5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>75</b>
<b>3.6 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>75</b>
<b>CAPÍTULO 4: CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>80</b>
<b>4.1 CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>80</b>
<b>4.2 CAPÍTULO 2 .....</b>	<b>80</b>
<b>4.3 CAPÍTULO 3 .....</b>	<b>81</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>82</b>

Dedico essa tese à minha mãe, que tanto apoiou e incentivou meu crescimento profissional.

## AGRADECIMENTOS

Após quatro anos de uma rotina intensa, muita leitura, trabalho, dias inteiros no laboratório, gostaria de oferecer meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que fizeram parte dessa jornada:

À minha família, especialmente minha mãe, que não me fez perder o embalo do mestrado e incentivou esse meu novo desafio.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Pedro Vicente Michelotto Jr., por todos os ensinamentos desde a época de mestrado, além da paciência, disponibilidade e encorajamento.

À minha coorientadora, Profa. Dra. Alexandra Senegaglia, pelo auxílio incansável que prestou desde a montagem do projeto, até a execução dos experimentos e desenvolvimento da tese.

À Profa. Dra. Fernanda Ferreira Cruz (UFRJ), também minha coorientadora, que além do apoio científico, foi peça importantíssima para meu estágio doutoral na Austrália.

À minha colega de doutorado, Fernanda Mendes, pelos dias de luta.

Ao Laboratório de Cultivo Celular da PUCPR, coordenado pelo Prof. Dr. Paulo Brofman, que cedeu seu espaço, e à todas as pessoas da equipe que compartilharam seus conhecimentos: Alexandra, Lidiane, Letícia, Fabiane, Felipe e Dayane.

Às equipes de genética, Duca e Isadora (PUCPR); Daniel, Amanda e Jacqueline (UFPR). Essa parte do projeto não sairia do papel se não fossem vocês.

Ao professor Saulo, que me ajudou com a estatística de todo o trabalho.

Ao grupo da Unidade Hospitalar para Equinos da Fazenda Experimental Gralha Azul (PUCPR), especialmente ao Kadu e ao Gilson, por ajudarem com os animais inseridos no projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro durante essa jornada, na forma de bolsa de doutorado.

To my new Aussie friends, Jane, Emma, Maggie, Izma and Katie (Monash University), you have made my 2 months in Australia an incredible experience! I have learnt a lot with you girls.

## FORMATO DA TESE

A presente tese é composta por capítulos. O objetivo principal do trabalho foi estudar diversos aspectos das células estromais mesenquimais equinas, visando padronizar seu processo de coleta, isolamento, cultivo e criopreservação, além de atestar sua função *in vitro*.

O capítulo 1 trata-se de artigo científico completo, publicado no periódico *Cryobiology* (<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.06.006>). O estudo investigou: a coleta de grandes volumes de medula óssea do esterno de equinos; detalhes do processamento da medula óssea e obtenção das células mononucleares derivadas de medula óssea (BMMC); e a viabilidade de criopreservação das BMMC equinas por cinco meses.

O capítulo 2 refere-se ao artigo científico completo que será submetido no periódico *Stem Cells and Development*. O estudo buscou: a caracterização imunofenotípica das células estromais mesenquimais derivadas de medula óssea (BMMSC) de equinos; a qualificação destas células para o transplante, através da análise citogenética e controle microbiológico após cultivo; e a comparação do potencial imunomodulador das BMMSC equinas com o do seu meio condicionado, através da capacidade de inibição de linfócitos *in vitro*.

O capítulo 3 aborda o estudo realizado durante estágio doutoral na Austrália, na Monash University, departamento de Farmacologia, sob supervisão da Profa. Dra. Jane Bourke, na linha de pesquisa em doenças respiratórias crônicas. O estudo utilizou o modelo de fragmentos de pulmão (*lung slices*) de camundongos para a análise da contração bronquial após estímulo com lipopolissacarídeo (LPS) ou zymosan. Também se avaliou a capacidade anti-inflamatória do tratamento com dexametasona ou células estromais mesenquimais (MSC) equinas, através da secreção de TNF- $\alpha$  pelos fragmentos de pulmão estimulados com LPS ou zymosan.

O capítulo 4 finaliza esta tese com as considerações finais, além de sugestões para estudos futuros.

## RESUMO GERAL

O uso da terapia celular em cavalos vem aumentando nos últimos anos, o que leva à uma preocupação com a padronização de técnicas e com o entendimento do mecanismo de ação das células estromais mesenquimais (MSC). O **primeiro estudo** investigou: a coleta de grandes volumes de medula óssea (MO) do esterno de cavalos em idade avançada (E1,  $n = 8$ ); a diferença entre o número de células recuperadas na primeira e na última aspiração de cada ponto de coleta de MO (E2,  $n = 8$ ); e a influência de diferentes concentrações de heparina (5, 10 e 20%) na formação de agregados celulares e a viabilidade de criopreservação das células mononucleares derivadas da medula óssea (BMMC) por 150 dias (E3,  $n = 6$ ). A coleta de 200 mL de MO foi segura e o número de células recuperadas diminuiu quando comparadas a primeira e a última aspiração de um ponto ( $41.73 \pm 18.99$  vs.  $5.88 \pm 1.66$  milhões de células por mL,  $p < 0,0001$ ). O aumento na concentração de heparina influenciou na prevenção de agregados celulares, sendo que o uso de 10% de heparina resultou na maior recuperação de BMMC. A viabilidade celular sofreu queda após 90 e 120 dias de criopreservação ( $p = 0,031$ ), mas permaneceu acima de 80% durante os 150 dias de estudo, sendo viável comercialmente. O **segundo estudo** investigou: a caracterização imunofenotípica das células estromais mesenquimais derivadas de medula óssea (BMMSC) equina por citometria de fluxo com os marcadores CD90, CD19, CD14, CD105, CD45 e HLA-DR ( $n = 4$ ); a qualificação das BMMSC através de análise citogenética com bandeamento GTG ( $n = 3$ ) e controle microbiológico após cultivo ( $n = 4$ ); e o potencial imunomodulador das BMMSC ( $n = 4$ ) e do seu meio condicionado (CM,  $n = 3$ ) através do ensaio de inibição de linfócitos *in vitro*, utilizando células mononucleares de sangue periférico (PBMC) estimuladas com fitohemaglutinina (PHA). Todos os animais apresentaram os marcadores positivos acima de 95% (CD90 e CD105), e os marcadores negativos abaixo de 10% (CD19, CD4, CD45 e HLA-DR). Das 60 metáfases analisadas, 5% apresentaram aneuploidia e não houve contaminação nas amostras analisadas. A inibição de linfócitos foi maior que 50% para os dois tratamentos e significativa quando comparados ao controle de PBMC estimuladas com PHA ( $p < 0,0001$ ). O conjunto de técnicas utilizadas no presente estudo foi efetivo em atestar a qualidade e caracterizar as BMMSC. Além disso, os resultados positivos para o CM justificam seu estudo mais aprofundado como terapêutica para doenças inflamatórias. O **terceiro estudo** utilizou um novo modelo de estudo *ex vivo* do pulmão, os fragmentos de pulmão, para investigar se o estímulo dos fragmentos de pulmão de camundongo com lipopolissacarídeo (LPS, 10  $\mu\text{g/mL}$ ) ou zymosan (100  $\mu\text{g/mL}$ ) levaria à uma contração bronquial dependente do tempo em quatro horas (E1,  $n = 5$ ) ou à uma reação de hiperresponsividade à metacolina (MCh) após incubação de 15 horas (E2,  $n = 5$ ); além de avaliar a secreção de TNF- $\alpha$  pelos fragmentos estimulados com LPS ou zymosan, e simultaneamente tratados com dexametasona (100nM) ou MSC equinas derivadas de tecido adiposo ou medula óssea ( $1 \times 10^5$  células/mL) após incubação de 15 horas (E3,  $n = 5$ ). O estímulo com LPS ou com zymosan não causou contração bronquial dependente do tempo, nem reação de hiperresponsividade à MCh. No E3, a incubação dos fragmentos de pulmão com LPS e com zymosan aumentou a secreção de TNF- $\alpha$  ( $p = 0,016$ ). O tratamento com MSC de medula óssea dos fragmentos estimulados com zymosan aumentou ainda mais a secreção de TNF- $\alpha$  ( $p = 0,032$ ), enquanto que o tratamento com dexametasona dos fragmentos estimulados com LPS reduziu a secreção de TNF- $\alpha$

( $p = 0,008$ ). Com os resultados do E3, conclui-se que o modelo de fragmentos de pulmão pode ser usado como ferramenta para avaliar respostas de imunomodulação das células residentes do pulmão.

**Palavras-chave:** citogenética; criopreservação; imunomodulação; *lung slices*; marcadores de superfície celular; terapia celular.

## ABSTRACT

The use of cell therapy in horses has been increasing in recent years, which leads to a concern with the standardization of techniques and the understanding of the mechanism of action of mesenchymal stromal cells (MSC). The **first study** investigated: the collection of large volumes of bone marrow (BM) from horses of advanced age (E1,  $n = 8$ ); the difference between the number of cells obtained from the first and last aspiration of each BM collection point (E2,  $n = 8$ ); and the influence of different heparin concentrations (5, 10 and 20%) on the formation of cell aggregates, together with the feasibility of cryopreservation of bone marrow derived mononuclear cells (BMMC) for 150 days (E3,  $n = 6$ ). Collection of 200 mL of BM was safe and the number of cells recovered decreased when comparing the first with the last aspiration of one collection point ( $41.73 \pm 18.99$  vs.  $5.88 \pm 1.66$  million cells per mL,  $p < 0.0001$ ). The increase in heparin concentration influenced the prevention of cell aggregates, and the use of 10% of heparin resulted in a greater recovery of BMMC. Cell viability fell after 90 and 120 days of cryopreservation ( $p = 0.031$ ), but remained above 80% during the 150 days of study, being commercially viable. The **second study** investigated: the immunophenotypic characterization of equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells (BMMSC) by flow cytometry with the markers CD90, CD19, CD14, CD105, CD45 and HLA-DR ( $n = 4$ ); BMMSC qualification through cytogenetic analysis with GTG banding ( $n = 3$ ) and microbiological control after culture ( $n = 4$ ); and the immunomodulatory potential of BMMSC ( $n = 4$ ) and its conditioned medium (CM,  $n = 3$ ), determined by the *in vitro* lymphocyte inhibition assay using peripheral blood mononuclear cells (PBMC) stimulated with phytohemagglutinin (PHA). All animals had positive markers above 90% (CD90 and CD105), and negative markers below 10% (CD19, CD4, CD45 and HLA-DR). Of the 60 metaphases analyzed, 5% presented aneuploidy and there was no contamination in the samples analyzed. Inhibition of lymphocytes was greater than 50% for both treatments and significant when compared to control of PHA-stimulated PBMC ( $p < 0.0001$ ). The set of techniques used in the present study was effective in attesting the quality and characterization of BMMSC. In addition, the positive results for CM justify further studies as therapeutics for inflammatory diseases. The **third study** used a new *ex vivo* model to study the lungs, the lung slices technique, to investigate whether stimulation of mouse lung slices with lipopolysaccharide (LPS, 10  $\mu\text{g/mL}$ ) or zymosan (100  $\mu\text{g/mL}$ ) would lead to a time-dependent bronchial contraction in four hours (E1,  $n = 5$ ) or a hyperresponsiveness reaction to methacholine (MCh) after a 15 hours incubation (E2,  $n = 5$ ); it also evaluated TNF- $\alpha$  secretion by the slices stimulated with LPS or zymosan, and simultaneously treated with dexamethasone (100 nM) or equine MSC derived from adipose tissue or bone marrow ( $1 \times 10^5$  cells / mL) after a 15 hours incubation (E3,  $n = 5$ ). LPS or zymosan stimulation did not cause time-dependent bronchial contraction nor hyperresponsiveness reaction to MCh. In E3, incubation of lung slices with LPS and zymosan increased TNF- $\alpha$  secretion ( $p = 0.016$ ). Treatment of the zymosan-stimulated slices with bone marrow-derived MSC further increased TNF- $\alpha$  secretion ( $p = 0.032$ ), whereas dexamethasone treatment of the LPS-stimulated slices reduced TNF- $\alpha$  secretion ( $p = 0.008$ ). With the results of E3, it can be concluded that the lung slices model can be used as a tool to evaluate immunomodulation responses of resident lung cells.

**Keywords:** cytogenetics; cryopreservation; immunomodulation; lung slices; cell surface markers; cell therapy.

## LISTA DE ABREVIATURAS

7-AAD	7-aminoactinomicina D
ADMSC	Células estromais mesenquimais derivadas de tecido adiposo (do inglês: <i>adipose-derived mesenchymal stromal cells</i> )
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APC	Aloficocianina (do inglês: <i>allophycocyanin</i> )
BM	Bone marrow
BMMC	Células mononucleares derivadas de medula óssea (do inglês: <i>bone marrow-derived mononuclear cells</i> )
BMMSC	Células estromais mesenquimais derivadas de medula óssea (do inglês: <i>bone marrow-derived mesenchymal stromal cells</i> )
CD	Grupo de diferenciação (do inglês: <i>cluster of differentiation</i> )
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CFSE	5(6)-Carboxyfluorescein diacetate <i>N</i> -succinimidyl ester
CM	Meio condicionado (do inglês: <i>conditioned medium</i> )
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CTRL	Controle
DEX	Dexametasona
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco (do inglês: <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> )
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês: <i>enzyme linked immuno sorbant assay</i> )
FISH	Hibridização in situ por fluorescência (do inglês: <i>fluorescence in situ hybridization</i> )
FITC	Isocianato de fluoresceína (do inglês: <i>fluorescein isothiocyanate</i> )
HBSS	Solução salina balanceada de Hanks (do inglês: <i>Hanks' balanced salt solution</i> )
HLA	Antígeno leucocitário humano (do inglês: <i>human leukocyte antigen</i> )
IDO	Indoleamina 2,3-dioxigenase
IL	Interleucina

IM	Intramuscular
IMDM	Meio Dulbecco's modificado por Iscove (do inglês: <i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i> )
ISCT	Sociedade Internacional de Terapia Celular (do inglês: <i>International Society for Cellular Therapy</i> )
IV	Intravenosa
KCl	Cloreto de potássio
LPS	Lipopolissacarídeo
mAb	Anticorpo monoclonal (do inglês: <i>monoclonal antibody</i> )
MCh	Metacolina (do inglês: <i>methacholine</i> )
MO	Medula óssea
MSC	Células estromais mesenquimais (do inglês: <i>mesenchymal stromal cells</i> )
P3	Terceira passagem
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico (do inglês: <i>peripheral blood mononuclear cells</i> )
PBS	Solução salina fosfatada tamponada (do inglês: <i>phosphate buffered saline solution</i> )
PE	Ficoeritrina (do inglês: <i>phycoerythrin</i> )
PE-Cy5	Ficoeritrina e cianina (do inglês: <i>phycoerythrin and cyanin dye</i> )
PHA	Fitohemaglutinina
PUCPR	Pontifícia Universidade Católica do Paraná
SBF	Soro Bovino Fetal
SD	Desvio padrão (do inglês: <i>standard deviation</i> )
TLR	Receptor tipo Toll (do inglês: <i>Toll-like receptor</i> )
TNCC	Contagem total de células nucleadas (do inglês: <i>total nucleated cell count</i> )
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa (do inglês: <i>tumor necrosis fator alpha</i> )
ZYM	Zymosan

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

	página
Tabela 1 Quantities of mononuclear cells per milliliter of bone marrow collected during multiple aspirations from the equine sternum.	9

### CAPÍTULO 2

Tabela 1 Resultados do painel de caracterização imunofenotípica e viabilidade de células estromais mesenquimais equinas derivadas de medula óssea.	35
Tabela 2 Número diploide ( $2n = 64$ ) e número fundamental ( $NF = 91$ ) observados nas metáfases de células mononucleares derivadas de medula óssea (BMMC) e de células estromais mesenquimais derivadas de medula óssea (BMMSC) de equinos.	36
Tabela 3 Observações estatísticas do ensaio de inibição de linfócitos.	39
Tabela 4 Porcentagem de inibição de linfócitos, quando incubados com células estromais mesenquimais equinas derivadas de medula óssea.	39
Tabela 5 Porcentagem de inibição de linfócitos, quando incubados com meio condicionado derivado de cultura de células estromais mesenquimais equinas de medula óssea.	40

### CAPÍTULO 3

Tabela 1 Resultados da porcentagem de contração bronquial obtidos durante ensaio de contração dependente do tempo.	68
--	----

## LISTA DE QUADROS

### CAPÍTULO 2

	página
Quadro 1 Anticorpos monoclonais utilizados para a caracterização imunofenotípica das células estromais mesenquimais equinas derivadas de medula óssea	26
Quadro 2 Anticorpos adicionados em cada tubo de citometria para marcação de células estromais mesenquimais equinas derivadas de medula óssea.	27
Quadro 3 Diluições de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) equino para o ensaio de inibição de linfócitos.	31

### CAPÍTULO 3

Quadro 1 Descrição dos diferentes tratamentos para cada um dos grupos no experimento de contração bronquial provocada por metacolina.	62
Quadro 2 Descrição dos diferentes tratamentos para cada um dos grupos no experimento de secreção de fator de necrose tumoral alfa.	63

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

	página
Figura 1	Schematic diagram of the study. 4
Figura 2	Bone marrow collection from the sternums of horses. 5
Figura 3	Bone marrow-derived mononuclear cell recovery rates. 8
Figura 4	Percentage of equine bone marrow-derived mononuclear cells viable after cryopreservation. 10

### CAPÍTULO 2

Figura 1	Delineamento do estudo experimental <i>in vitro</i> comparativo. 22
Figura 2	Cálculo da porcentagem de inibição de linfócitos. 32
Figura 3	Histogramas da caracterização imunofenotípica e viabilidade das células estromais mesenquimais de medula óssea equina. 34
Figura 4	Cariótipo de uma metáfase de célula mononuclear derivada de medula óssea equina. 36
Figura 5	Cariótipo de uma metáfase de célula estromal mesenquimal derivada de medula óssea equina em terceira passagem. 37
Figura 6	Comparação da porcentagem de proliferação de linfócitos, quando incubados com células estromais mesenquimais equinas derivadas de medula óssea (BMMSC) ou meio condicionado (CM). 38
Figura 7	Histogramas representativos do ensaio de inibição de linfócitos com células estromais mesenquimais derivadas de medula óssea equina (BMMSC). 41
Figura 8	Histogramas representativos do ensaio de inibição de linfócitos com o meio condicionado derivado de células estromais mesenquimais derivadas de medula óssea equina. 42

### **CAPÍTULO 3**

Figura 1	Delineamento dos 12 grupos analisados no experimento de secreção de TNF- $\alpha$ em fragmentos de pulmão de camundongo.	56
Figura 2	Fragmentos com 200 $\mu$ m de espessura do pulmão direito de um camundongo avaliado.	57
Figura 3	Foto da câmara de perfusão montada com um fragmento de pulmão de camundongo.	60
Figura 4	Sistema de perfusão utilizado para as curvas de contração bronquial com metacolina.	61
Figura 5	Área do lúmen de uma via aérea em fragmento de pulmão de camundongo.	65
Figura 6	Contração bronquial por metacolina em fragmentos de pulmão de camundongo.	67
Figura 7	Contração bronquial de fragmentos de pulmão em resposta à metacolina e quatro horas com estímulos, durante experimento 1.	68
Figura 8	Contração bronquial de fragmentos de pulmão em resposta à diferentes concentrações de metacolina, durante experimento 2.	69
Figura 9	Resultados de secreção de fator de necrose tumoral alfa no experimento 3.	70

# CAPÍTULO 1

## COLLECTION, PROCESSING AND FREEZING OF EQUINE BONE MARROW CELLS

Bastos, F. Z., Barussi, F. C., Santi, T. F., Vieira, B. P., Senegaglia, A. C., Cruz, F. F., Michelotto Jr, P. V. (2017). *Cryobiology*, 78, 95-100.

Doi: 10.1016/j.cryobiol.2017.06.006

### ABSTRACT

There is no consensus on aspects of equine bone marrow collection and processing. The study aimed to describe the collection of large volumes of bone marrow from horses of advanced age, with emphasis on bone marrow mononuclear cells (BMMCs) recovery and viability after cryopreservation. Fourteen horses, aged 3–24 years, were divided into three experiments. E1 studied the feasibility of collecting 200 mL from the sternums of horses of advanced age; E2 examined the number of cells obtained from the first and last syringe of each puncture; and E3 investigated the influence of heparin concentration on the prevention of cell aggregation, and cell viability after freezing in liquid nitrogen. Bone marrow aspirations were done with syringes pre-filled with Iscove's Modified Dulbecco's Medium and different concentrations of sodium heparin. BMMCs were counted, cell viability was determined, and samples were frozen. Bone marrow collection from the sternum is safe, even at large volumes and from horses of advanced age, and the number of cells recovered decreases with successive aspirations ( $p < 0.0001$ ). Heparin concentration influenced cell aggregation, and recovered cells continued to be commercially viable after 150 days in frozen storage.

**Key words:** cell therapy, cryopreservation, heparin, horse, bone marrow mononuclear cells.

### 1.1 INTRODUCTION

Cell therapy is becoming a common practice in equine clinical and surgical settings, and is more directed to musculoskeletal disorders such as tendonitis, osteoarthritis, and laminitis [20]. Its use has also been demonstrated for the treatment of respiratory diseases in horses [7]. Bone marrow mononuclear cells (BMMCs) have been widely used due to their anti-inflammatory, anti-fibrotic,

and microbicidal effects [1]. When compared to other cell types — such as mesenchymal stromal cells (MSCs) — commonly used in cell therapy studies, BMSCs have lower associated costs, lower risk of immunological reactions due to their autologous administration [15], and shorter processing time, with no need to be cultured. This enables their use on the same day of bone marrow collection; alternatively, using cryogenic storage methods, the cells can be used whenever necessary for further injections [2].

In veterinary medicine, there is still no consensus on the best type — or optimal amount — of cells to be used for each treatment [17], which makes uncertain the amount of bone marrow that should be collected. The quantity of cells required for treatment varies according to the species and diseases studied. It ranges from  $3 \times 10^6$  BMSCs to treat Wistar rats with myocardial infarction [22], to  $1 \times 10^7$  MSCs to treat horses with tendon lesions [14], to  $2 \times 10^6$  BMSCs to treat mice with experimentally induced asthma [2].

Recently, we investigated the effects of using BMSCs to treat horses with recurrent airway obstruction (RAO) or severe asthma; these animals received a minimum of  $500 \times 10^6$  cells, which were obtained from 200 mL of bone marrow collected from the sternum [7]. To date, no studies in horses have shown the quantity of cells that can be obtained from large-volume bone marrow samples, nor have studies identified the minimum number of punctures required to obtain 200 mL of bone marrow. Furthermore, some aspects of collecting bone marrow from these animals remain scarcely discussed, such as the ideal puncture location (sternum or ilium), the relationship between volume collected and the number of cells obtained, and the risks involved in the procedure [3, 13].

Therefore, the present study aimed to determine the feasibility of extracting large volumes of bone marrow from the sternum, with additional attention being paid to 1) the quantities of BMSCs that could be recovered, and 2) the extent to which these cells could be cryopreserved without losing viability.

## 1.2 MATERIAL AND METHODS

### 1.2.1 Animals

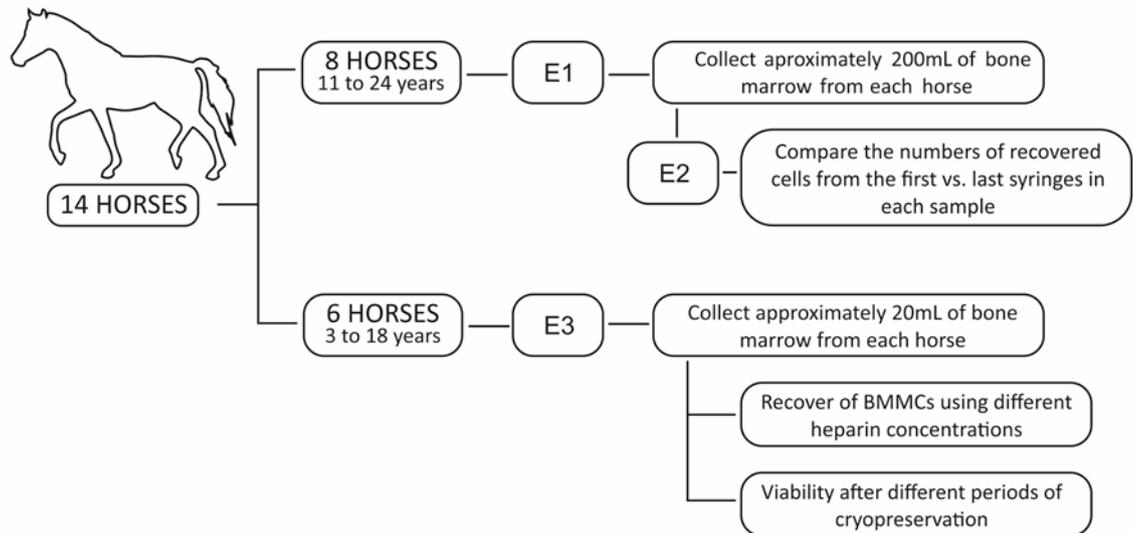
This study was approved by the Committee on Animal Experimentation of the Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Curitiba, Brazil, and is registered as numbers 788 and 988.

Fourteen mixed-breed horses, consisting of males and females, aged 3 – 24 years and weighing 340–520 kg, were studied. The animals were in good health, as verified by clinical and hematological analyses. Three months before the experiments, the animals were dewormed and vaccinated against tetanus, equine influenza, rabies, encephalitis, and herpes virus.

### 1.2.2 Experimental Design

The animals were divided into three experiments (Figure 1). To investigate the feasibility of collecting large volumes of bone marrow from horses of advanced age (which is necessary when using BMMCs to treat horses with severe asthma) [7], eight horses aged 11–24 years were enrolled in Experiment 1 (E1), and had 200 mL of bone marrow collected from their sternums. We also sought to determine whether the number of recovered BMMCs decreased during the course of a series of syringe aspirations taken from a single sternum puncture. Therefore, in Experiment 2 (E2), we focused on the bone marrow samples collected from four animals of the E1, and analyzed the first and the last syringe of each puncture to compare the number of cells recovered. After collection events occasionally resulted in cell aggregate formations and low cell recovery rates, we designed Experiment 3 (E3). In E3, six horses, aged 3 – 18 years, each had a 20 mL volume of bone marrow collected from their sternums. Three syringes were used for each horse, and each syringe contained one concentration (5%, 10%, and 20%) of heparin; this was done to determine whether cell aggregation would decline, and BMMCs recovery rates would improve, if the heparin concentration was changed. The E3 samples that were collected with the 10% heparin syringes were subsequently aliquoted and frozen in cryotubes, to determine cell viability after frozen storage in liquid nitrogen for periods of 30, 60, 90, 120, and 150 days.

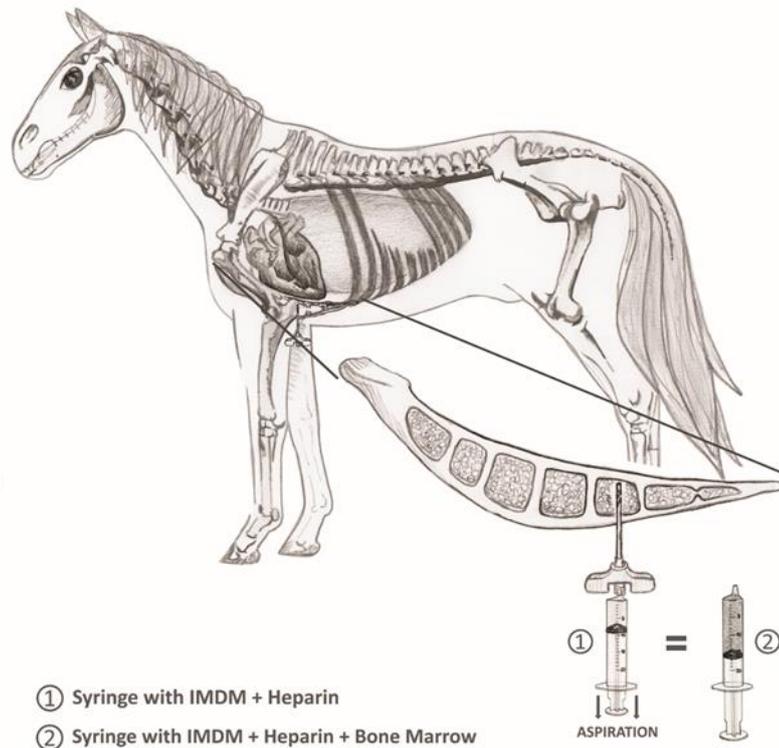
This was investigated because an important question in equestrian veterinary medicine has been whether aspirated cells from a healthy animal will remain viable if those cells are frozen for later use.



**Figure 1.** Schematic diagram of the study: 14 animals, divided into three experiments.

### 1.2.3 Bone Marrow Collection

Horses were sedated with intramuscular administration of 0.05 mg/kg of 1% acepromazine (Acepran<sup>®</sup>, Vetnil, São Paulo, Brazil). The collection site between the fourth and sixth sternbrae was the same for all experiments (Figure 2) [16], and was trichotomized, aseptically prepared, and locally anesthetized with 2% lidocaine (Lidovet<sup>®</sup>, Bravet Laboratory, Rio de Janeiro, Brazil). Sedation was complemented with intravenous administration of 0.5 mg/kg of 10% xylazine (Sedomin<sup>®</sup>, König, Buenos Aires, Argentina) with 50 mg of pethidine hydrochloride (Dolosal<sup>®</sup>, Cristália Laboratory, Itapira, Brazil). The aspiration puncture was performed using an 11G Jamshidi needle (Angiotech, Gainesville, Florida, USA).



**Figure 2.** Bone marrow collection from the sternums of horses, using 20 mL syringes pre-filled with 7 mL of Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM) and sodium heparin, to collect 7 mL of bone marrow (resulting in an IMDM-heparin/bone marrow solution with a volumetric ratio of 1:1).

For E1 and E2, a set of 29 sterile 20 mL syringes for each horse were pre-filled with 7 mL of Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM, Sigma-Aldrich, Missouri, USA) containing 1% penicillin-streptomycin (Gibco, Grand Island, New York, USA) and 0.5% of sodium heparin (Hemofol<sup>®</sup>, Cristália Laboratory, Itapira, Brazil). Each pre-filled syringe was then used to collect approximately 7 mL of bone marrow from the horse (resulting in an IMDM-heparin/bone marrow solution with a volumetric ratio of 1:1), with the final outcome being a total of 200 mL of bone marrow collected from each animal.

For E3, a set of three sterile 20 mL syringes for each horse were pre-filled with 7 mL of IMDM, 1% penicillin-streptomycin and 5%, 10%, or 20% of sodium heparin. The three syringes with different heparin concentration were randomly collected, in order to reduce the interference of the largest number of cells in the first aspiration. The bone marrow collections were in a volumetric ratio of 1:1, with the final outcome being a total of 20 mL of bone marrow collected from each animal.

After bone marrow aspiration, syringes were kept on ice during transport to the laboratory, and were processed within 2 hours of sample collection.

#### **1.2.4 Bone Marrow Processing**

Aliquots of 500  $\mu$ L of the IMDM-heparin/bone marrow samples were filtered through a 100  $\mu$ m mesh (cell strainer, BD, New Jersey, USA) to determine initial total nucleated cell count (TNCC) values using an automatic hematology analyzer (BC 2800, Mindray, Shenzhen, China). The samples were then processed according to the adapted technique of Boyum [9], using a density gradient (Ficoll/Histopaque<sup>®</sup>-1077, Sigma-Aldrich, Missouri, USA) to isolate the BMMCs. The final pellet was resuspended in IMDM, and an 500  $\mu$ L aliquot was used for post-isolation measurements of TNCC. The initial viability of BMMCs was determined using the vital dye trypan blue 0.4% (Gibco, Grand Island, New York, USA).

#### **1.2.5 Freezing of BMMCs**

The BMMCs that were isolated using 10% heparin solutions during E3 were prepared for cryopreservation in a concentration of  $5 \times 10^6$  BMMCs/mL in IMDM containing 1% penicillin-streptomycin, and a freeze medium with the final concentration consisting of the following: 10% fetal bovine serum (Gibco, Grand Island, New York, USA), and 10% dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, Missouri, USA). 2 mL of cell solutions were stored in cryovials and those were placed into paper racks at -80°C overnight – a noncontrolled-rate freezing procedure - and were then quickly transferred to liquid nitrogen until needed.

At 30, 60, 90, 120, and 150 days of cryopreservation, cells were thawed quickly in a water bath at 37°C, and were then diluted in 8.5 mL of IMDM containing 1% penicillin-streptomycin and 1.5 mL of fetal bovine serum. The resulting solutions were centrifuged at 400 g for 10 min. The pellet was then resuspended in 1 mL of IMDM, and post-cryopreservation viability was assessed by using trypan blue (0.4%) to count dead cells.

### **1.2.6 Statistical Analyses**

The data were analyzed using the GraphPad Prism 5.0 software package, and results are shown as mean  $\pm$  standard deviation (SD). Differences were considered significant when  $p < 0.05$ .

The normality of the data distribution was initially evaluated using the D'Agostino and Pearson test. Statistical analyses of E1 data were performed using mean values and the Student's *t*-test assuming unequal variances. E2 data were analyzed using the Wilcoxon signed-rank test. E3 data were analyzed using one-way ANOVA, followed by the Tukey test.

## **1.3 RESULTS**

### **1.3.1 Bone Marrow Collection**

Bone marrow sampling procedures were conducted without complications. All horses remained clinically healthy, with good appetites and no signs or expressions of pain or discomfort.

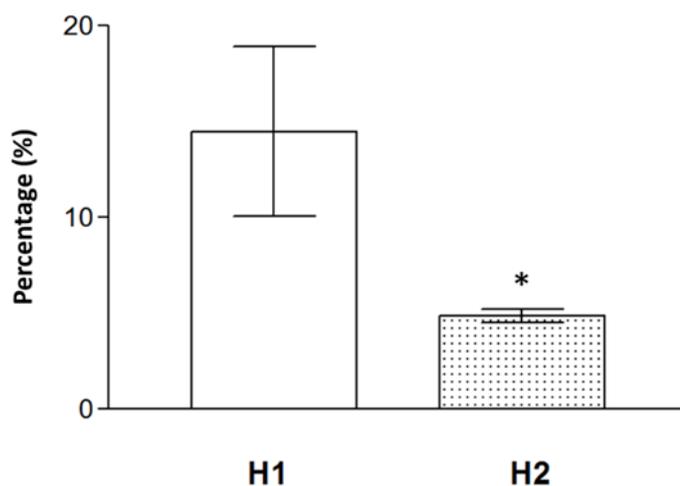
For E1, it was possible to collect the previously described bone marrow volumes from all animals, and yet safely make more than one puncture in each animal (one animal was punctured at two points on the sternum, and three were punctured at three points). During sample collection for E2, two animals were punctured at two points on the sternum, one was punctured at three points, and one at four points. The number of punctures necessary to collect the desired sample volume varied, depending on the animal.

In E3, visual examinations of the collected samples suggested that cell aggregates occurred less frequently with increased concentrations of heparin. However, this observation did not seem to correlate with the number of cells recovered after isolation; those numbers were  $5.63 \pm 1.99 \times 10^6$  cells for 5% heparin,  $9.86 \pm 6.37 \times 10^6$  cells for 10% heparin, and  $3.15 \pm 1.26 \times 10^6$  cells for 20% heparin.

### **1.3.2 Bone Marrow Processing**

When BMMCs were isolated during E1, two different situations were observed. Some samples (E1H1,  $n = 6$ ) showed lower rates of cell aggregate

formation, where aggregates were observed only when recovering mononuclear cells from the Ficoll separation gradient, and this occurred without affecting the collection process. Other samples (E1H2, n= 2) showed higher rates of cell aggregate formation, where aggregates were observed as early in the process as at the transfer of bone marrow from the syringes into the centrifuge tubes (where aggregates manifested as syringe obstructions), and where aggregates did impair mononuclear cell collection from the Ficoll separation gradient. These two situational groups also contained a variety of individual outcomes, with a coefficient of variation of 31% and 7%, respectively. The average number of BMDCs recovered after the isolation step was  $14.48 \pm 4.41\%$  for the H1 group, and  $4.85 \pm 0.35\%$  for the H2 group. Even after considering the small number of samples and the large variance within each group, there was a statistically significant difference between the two groups ( $p = 0.0032$ , Figure 3).



**Figure 3.** Bone marrow-derived mononuclear cell recovery rates from the sternums of eight horses. Group E1H1 showed lower levels of cell aggregate formation than E1H2.  $*p = 0.0032$

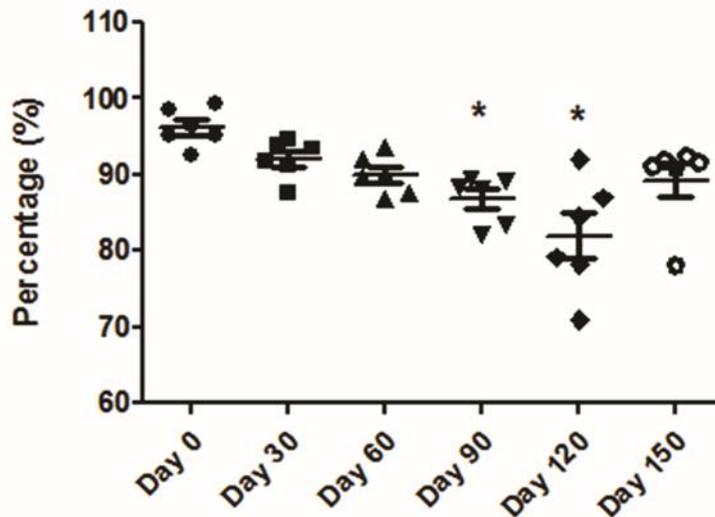
For E2, after calculating numbers of cells per milliliter of collected bone marrow obtained from the first and last syringes used to extract samples at the same puncture site (Table 1), the mean values were  $41.73 \times 10^6$  cells/mL and  $5.88 \times 10^6$  cells/mL, respectively (an 86% decrease). This constituted a significant difference ( $p < 0.0001$ ) between sample outcomes.

**Table 1.** Quantities of mononuclear cells per milliliter of bone marrow collected during multiple aspirations from one puncture site in the equine sternum. \* $p < 0.0001$

	Collection Point	First Aspiration ( $\times 10^6$ /mL)	Last Aspiration ( $\times 10^6$ /mL)
Horse 1	1 <sup>st</sup>	76.5	9.2
	2 <sup>nd</sup>	71.3	6.7
Horse 2	1 <sup>st</sup>	36.2	6.4
	2 <sup>nd</sup>	50.6	6.8
	3 <sup>rd</sup>	22.8	7.0
Horse 3	1 <sup>st</sup>	26.4	5.8
	2 <sup>nd</sup>	31.6	3.7
	3 <sup>rd</sup>	22.2	3.7
	4 <sup>th</sup>	54.8	4.7
Horse 4	1 <sup>st</sup>	29.8	6.4
	2 <sup>nd</sup>	36.8	4.3
Mean $\pm$ SD		41.73 $\pm$ 18.99	5.88 $\pm$ 1.66*

### 1.3.3 Freezing of BMBCs

In E3, cell viability after freezing decreased significantly when comparing Day 0 with Day 90 ( $p = 0.031$ ), and when comparing Day 0 with Day 120 ( $p = 0.031$ ) (Figure 4). Mean values for the proportion of viable cells observed after each period of cryopreservation were [96.20  $\pm$  0.02%], [92.28  $\pm$  0.03%], [89.92  $\pm$  0.02%], [86.78  $\pm$  0.03%], [81.96  $\pm$  0.07%], and [89.32  $\pm$  0.06%] at Days 0, 30, 60, 90, 120, and 150, respectively.



**Figure 4.** Percentage of equine bone marrow-derived mononuclear cells that were still viable after cryopreservation in liquid nitrogen for 0, 30, 60, 90, 120, and 150 days. \* $p = 0.031$  vs. Day 0.

#### 1.4 DISCUSSION

This study was conducted after members of our group encountered issues associated with the collection of large volumes of bone marrow from horses of advanced age; these included rapid sample coagulation and the loss of BMMCs viability following cryopreservation. The results of this study have enabled a better understanding of the importance of anticoagulants, the safety of collecting large volumes of bone marrow from the sternums of advanced-aged horses, and the feasibility of maintaining viable BMMCs in frozen storage until needed.

Although the sternum is a good source for sample collection, it is also a risky location — because the heart, being located just above the sternbrae indicated for collection, can be perforated during the procedure [13]. Conversely, sample collection from the iliac crest may be more difficult, may allow only smaller volumes to be collected, or may yield fewer cells [12]. For this study, the sternum was chosen as the site for bone marrow sample collection because it shows continuous hematopoietic activity throughout the life of the animal, making it the most appropriate source in middle-aged to advanced-aged animals [4].

Bone marrow samples are usually collected from horses in small volumes ranging 5 – 30 mL [3, 16]; one documented exception was a study conducted by Toupadakis [23], where 120 mL volumes were extracted from the sternum. Aspirated bone marrow volumes tend to be small because they are normally used for the culturing and expansion of MSCs. These are then used for the treatment of musculoskeletal disorders in horses, and such treatments require relatively low numbers of cells, ranging 10 – 20 × 10<sup>6</sup> [14, 20]. However, in our previous study where BMBCs were used to treat horses with severe asthma, greater numbers of mononuclear cells were required: from 5 × 10<sup>8</sup> to 1 × 10<sup>9</sup> cells [7]. Therefore, larger volumes of bone marrow must be collected — and in this study, 200mL of bone marrow were safely collected from each animal, demonstrating that this practice can be performed without posing health risks to the animals.

The rapid coagulation that can occur during equine bone marrow collection has been described [16]. However, in previous studies [6, 8], we observed that heparinization of the Jamshidi needle at the beginning of each round of bone marrow collection prevented clot formation. Also, the use of syringes containing only heparin, which is widespread in the literature [4, 12, 16], showed more cell aggregate formation than syringes containing IMDM and heparin. Nonetheless, even when we used IMDM plus heparin in all of our syringes, cell aggregate formation varied between samples taken from different animals. Some animals displayed high cell aggregation in repeated samplings, making this an individual characteristic that decreased cell recovery rates, regardless of the amounts of anticoagulant used for collection.

In E1, two different situations were observed to occur during the isolation of cells, so the animals were divided into E1H1 (with low formation of cell aggregates) and E1H2 (with high formation of cell aggregates). As it was not possible to identify a pattern associated with the differences between the groups, the differences were assumed to be occurring randomly, requiring more research using statistically larger samples to identify patterns. In the present study, the differences in the quantities of BMBCs recovered from these two groups can be attributed to the loss of cells into the aggregate formations. However, the literature also demonstrates a wide variability in the quantities of BMBCs recovered after isolation: from 9% [12] to 74% [3].

Some studies performed in humans and young horses have demonstrated that differences in the number of BMMCs recovered between the first and last aspirate from each collected site are significant [3, 18]. Therefore, it was necessary for us to demonstrate that this phenomenon also occurs in middle-aged and advanced-aged animals. We also needed to determine whether it would be feasible to collect large bone marrow volumes from relatively few collection points, making this procedure as non-invasive as possible.

The results of this study showed that the number of mononuclear cells obtained from the first bone marrow aspiration is significantly greater than that obtained from the final aspiration, corroborating previous studies. Dependent upon aspiration volume, this difference in the number of cells recovered can be explained by the progressive dilution of bone marrow with peripheral blood, which is affected by the local characteristics of blood vessels and blood flow [18]. In addition, some authors have reported individual differences among animals; in a study investigating the properties of bone marrow-derived mesenchymal stem cells taken from middle-aged horses, different rates of cell differentiation were observed among donors [10]. This may explain the differences observed during the isolation of BMMCs in E1.

A large volume of bone marrow aspirated through a small number of punctures, just reallocating the needle, can be advantageous for the patient, because this requires less time under anesthesia and results in fewer perforations, minimizing the risks caused by wound exposure during and after the procedure.

For practical reasons, the isolation of BMMCs usually results in the freezing of these cells, for use in cell therapy when needed. This affects cell apoptosis levels [21], and many studies have sought the ideal protocol for freezing. Successful cryopreservation depends on cell preparation, freezing time, culture medium, freezing medium, and factors associated with the thawing of the cells just prior to administration. The consequences of the freezing and thawing process on cellular anti-inflammatory actions are unknown; however, recent studies have showed that fresh versus thawed MSCs achieved similar effects, suggesting that both can ameliorate inflammation [11].

The present study used a protocol that employed 10% FBS and 10% DMSO, without using incremental temperatures at the beginning of the freezing process, and obtained a good cell viability after the five-month freeze period, better than what was achieved in a study conducted by Ribeiro [19]; the latter used 20% FBS and 10% DMSO, and obtained a cell viability rate of  $86 \pm 3.28\%$  after 30 days of cryopreservation. Balint [5] noted that the use of 5% DMSO and an appropriate temperature control allows up to 96% viability after thawing. This is because a high rate of cell destruction is associated with the melting heat released, if the period of transition between the liquid and solid phases is excessively extended. In addition, intracellular ice crystals, which often promote mechanical disruption of cells, are formed during the rapid freezing process. To better understand the observations reported here, further studies are needed. Studies analyzing larger numbers of animals should enable the identification of patterns associated with these outcomes and the causes of their occurrence.

## 1.5 CONCLUSION

In conclusion, this study has demonstrated the feasibility of collecting large volumes of equine bone marrow from a small number of collection sites, even in middle-aged and advanced-aged animals; however, the number of mononuclear cells recovered decreases with successive aspirations. It has also shown that the heparin concentration in the collection solution influences the formation of cell aggregates, but does not influence the isolation of BMMCs. Lastly, this study has demonstrated that the cryopreservation of BMMCs is feasible for over five months, and that while cell viability declines, it is retained to an extent that is significantly adequate to be useful in the equine clinic.

## **Competing Interests**

The authors declare that there are no competing interests.

## **Acknowledgements**

The authors thank the Regiment of Mounted Police of Parana state.

### Source of funding

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Brazil). Grant number 474631/2013-3.

### 1.6 REFERENCES

[1] S.C. Abreu, M.A. Antunes, T. Maron-Gutierrez, F.F. Cruz, L.G. Carmo, D.S. Ornellas, et al., Effects of bone marrow-derived mononuclear cells on airway and lung parenchyma remodeling in a murine model of chronic allergic inflammation, *Respir. Physiol. Neurobiol.* 175 (2011) 153-163.

[2] S.C. Abreu, M.A. Antunes, J.C. de Castro, M.V. de Oliveira, E. Bandeira, D.S. Ornellas, et al., Bone marrow-derived mononuclear cells vs. mesenchymal stromal cells in experimental allergic asthma, *Respir. Physiol. Neurobiol.* 187 (2013) 190-198.

[3] M.K. Adams, L.R. Goodrich, S. Rao, F. Olea-Popelka, N. Phillips, J.D. Kisiday, et al., Equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells (BMDMSCs) from the ilium and sternum: are there differences?, *Equine Vet. J.* 45 (2013) 372-375.

[4] A.L.G. Alves, M.E.M. Vieira, A.P.B. Barreira, L.S.L.S. Mota, M.E. Saito, A. Kohayagawa, et al., Protocolo de isolamento de células mononucleares de medula óssea de equinos [Protocol for isolation of bone marrow-derived mononuclear cells from horses]., *Veterinária e Zootecnia* 16 (2009) 650-655.

[5] B. Balint, Z. Ivanovic, M. Petakov, J. Taseski, G. Jovicic, N. Stojanovic, et al., The cryopreservation protocol optimal for progenitor recovery is not optimal for preservation of marrow repopulating ability, *Bone Marrow Transplant.* 23 (1999) 613-619.

[6] F.C.M. Barussi, Avaliação do uso de células mononucleares em equinos com obstrução recorrente das vias aéreas [Evaluation of the use of

mononuclear cells in horses with recurrent airway obstruction], Thesis, Master of Animal Science, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Brazil, 2015.

[7] F.C. Barussi, F.Z. Bastos, L.M. Leite, F.Y.I. Fragoso, A.C. Senegaglia, P.R.S. Brofman, et al., Intratracheal therapy with autologous bone marrow-derived mononuclear cells reduces airway inflammation in horses with recurrent airway obstruction, *Respir. Physiol. Neurobiol.* 232 (2016) 35-42.

[8] F.Z. Bastos, Efeitos das células mononucleares derivadas de medula óssea sobre a função do macrófago alveolar de equinos com obstrução recorrente das vias aéreas [Effects of bone marrow-derived mononuclear cells on alveolar macrophage function in horses with recurrent airway obstruction], Thesis, Master of Animal Science, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Brazil, 2015.

[9] A. Boyum , Separation of white blood cells, *Nature* 204 (1964) 793-794.

[10] J.L. Carter-Arnold, N.L. Neilsen, L.L. Amelse, A. Odoi, M.S. Dhar, In vitro analysis of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells demonstrates differences within age and gender-matched horses, *Equine Vet. J.* 46 (2014) 589-595.

[11] F.F. Cruz, Z.D. Borg, M. Goodwin, D. Sokocevic, D. Wagner, D.H. McKenna, et al., Freshly thawed and continuously cultured human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells comparably ameliorate allergic airways inflammation in immunocompetent mice, *Stem Cells Transl. Med.* 4 (2015) 615-624.

[12] U. Delling, K. Lindner, I. Ribitsch, H. Jülke, W. Brehm, Comparison of bone marrow aspiration at the sternum and the tubercosxae in middle-aged horses, *Can. J. Vet. Res.* 76 (2012) 52-56.

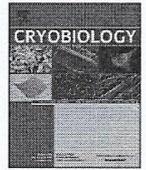
- [13] M.M Durando, L. Zarucco, T.P. Schaer, M. Ross, V.B. Reef, Pneumopericardium in a horse secondary to sternal bone marrow aspiration, *Equine Vet. Educ.* 18 (2006) 75-79.
- [14] E.E. Godwin, N.J. Young, J. Dudhia, I.C. Beamish, R.K.W. Smith, Implantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells demonstrates improved outcome in horses with overstrain injury of the superficial digital flexor tendon, *Equine Vet. J.* 44 (2012) 25-32.
- [15] C.A. Herberts, M.S. Kwa, H.P. Hermsen, Risk factors in the development of stem cell therapy, *J. Transl. Med.* 9 (2011) 1.
- [16] Y. Kasashima, T. Ueno, A. Tomita, A.E. Goodship, R.K.W. Smith, Optimisation of bone marrow aspiration from the equine sternum for the safe recovery of mesenchymal stem cells, *Equine Vet. J.* 43 (2011) 288-294.
- [17] T.G. Koch, L.C. Berg, D.H. Betts, Current and future regenerative medicine—principles, concepts, and therapeutic use of stem cell therapy and tissue engineering in equine medicine, *Can. Vet. J.* 50 (2009) 155-165.
- [18] G.F. Muschler, C. Boehm, K. Easley, Aspiration to obtain osteoblast progenitor cells from human bone marrow: the influence of aspiration volume, *J. Bone Joint Surg. Am.* 79 (1997) 1699-1709.
- [19] G. Ribeiro, C.O. Massoco, J.C. Lacerda Neto, Viabilidade celular da fração mononuclear da medula óssea e fração vascular estromal do tecido adiposo de equinos após o processo de congelamento e descongelamento [Cell viability of the mononuclear fraction of the bone marrow and stromal vascular fraction of the adipose tissue of horses after the freezing and thawing process], *Pesquisa Vet. Brasileira* 32 (2012) 118-124.

[20] L.V. Schnabel, L.A. Fortier, C.W. McIlwraith, K.M. Nobert, Therapeutic use of stem cells in horses: Which type, how, and when?, *Vet. J.* 197 (2013) 570-577.

[21] J.G. Smith, H.R. Joseph, T. Green, J.A. Field, M. Wooters, R.M. Kaufhold, et al., Establishing acceptance criteria for cell-mediated-immunity assays using frozen peripheral blood mononuclear cells stored under optimal and suboptimal conditions, *Clin. Vaccine Immunol.* 14 (2007) 527-537.

[22] L.C.G. Souza, K.A.T.D. Carvalho, C. Rebelatto C, A. Senegaglia, P. Hansen, M. Furuta, et al., A comparação entre o transplante de células-tronco mononucleares e mesenquimais no infarto do miocárdio [Comparison between the transplantation of mononuclear and mesenchymal stem cells in myocardial infarction], *Ver. Bras. Cir. Cardiovasc.* 20 (2005) 270-278.

[23] C.A. Toupadakis, A. Wong, D.C. Genetos, W.K. Cheung, D.L. Borjesson, G.L. Ferraro, et al., Comparison of the osteogenic potential of equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, umbilical cordblood, and umbilical cordtissue, *Am. J. Vet. Res.* 71 (2010) 1237-1245.



## Collection, processing and freezing of equine bone marrow cells



Fernanda Z. Bastos <sup>a,1</sup>, Fernanda C.M. Barussi <sup>a,1</sup>, Thasla F. Santi <sup>b</sup>, Bianca P. Vieira <sup>b</sup>,  
Alexandra C. Senegaglia <sup>c</sup>, Fernanda F. Cruz <sup>d</sup>, Pedro V. Michelotto Jr. <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Animal Science, School of Life Sciences - Pontifícia Universidade Católica Do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil

<sup>b</sup> Course of Veterinary Medicine, School of Life Sciences - Pontifícia Universidade Católica Do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil

<sup>c</sup> Experimental Laboratory for Cell Culture, School of Medicine - Pontifícia Universidade Católica Do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil

<sup>d</sup> Laboratory of Pulmonary Investigation, Carlos Chagas Filho Biophysics Institute, Universidade Federal Do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 24 April 2017

Received in revised form

13 June 2017

Accepted 17 June 2017

Available online 20 June 2017

#### Keywords:

Cell therapy

Cryopreservation

Heparin

Horse

Bone marrow mononuclear cells

### ABSTRACT

There is no consensus on aspects of equine bone marrow collection and processing. The study aimed to describe the collection of large volumes of bone marrow from horses of advanced age, with emphasis on bone marrow mononuclear cells (BMMCs) recovery and viability after cryopreservation. Fourteen horses, aged 3–24 years, were divided into three experiments. E1 studied the feasibility of collecting 200 mL from the sternums of horses of advanced age; E2 examined the number of cells obtained from the first and last syringe of each puncture; and E3 investigated the influence of heparin concentration on the prevention of cell aggregation, and cell viability after freezing in liquid nitrogen. Bone marrow aspirations were done with syringes pre-filled with Iscove's modified Dulbecco's medium and different concentrations of sodium heparin. BMMCs were counted, cell viability was determined, and samples were frozen. Bone marrow collection from the sternum is safe, even at large volumes and from horses of advanced age, and the number of cells recovered decreases with successive aspirations ( $p < 0.0001$ ). Heparin concentration influenced cell aggregation, and recovered cells continued to be commercially viable after 150 days in frozen storage.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Cell therapy is becoming a common practice in equine clinical and surgical settings, and is more directed to musculoskeletal disorders such as tendonitis, osteoarthritis, and laminitis [20]. Its use has also been demonstrated for the treatment of respiratory diseases in horses [7]. Bone marrow mononuclear cells (BMMCs) have been widely used due to their anti-inflammatory, anti-fibrotic, and microbicidal effects [1]. When compared to other cell types — such as mesenchymal stromal cells (MSCs) — commonly used in cell therapy studies, BMMCs have lower associated costs, lower risk of immunological reactions due to their autologous administration [15], and shorter processing time, with no need to be cultured. This enables their use on the same day of bone marrow collection;

alternatively, using cryogenic storage methods, the cells can be used whenever necessary for further injections [2].

In veterinary medicine, there is still no consensus on the best type — or optimal amount — of cells to be used for each treatment [17], which makes uncertain the amount of bone marrow that should be collected. The quantity of cells required for treatment varies according to the species and diseases studied. It ranges from  $3 \times 10^6$  BMMCs to treat Wistar rats with myocardial infarction [22], to  $1 \times 10^7$  MSCs to treat horses with tendon lesions [14], to  $2 \times 10^6$  BMMCs to treat mice with experimentally induced asthma [2].

Recently, we investigated the effects of using BMMCs to treat horses with recurrent airway obstruction (RAO) or severe asthma; these animals received a minimum of  $500 \times 10^6$  cells, which were obtained from 200 mL of bone marrow collected from the sternum [7]. To date, no studies in horses have shown the quantity of cells that can be obtained from large-volume bone marrow samples, nor have studies identified the minimum number of punctures required to obtain 200 mL of bone marrow. Furthermore, some aspects of collecting bone marrow from these animals remain scarcely discussed, such as the ideal puncture location (sternum or

\* Corresponding author. Rua Imaculada Conceição, 1155, Prado Velho, Curitiba, Paraná 80215-901, Brazil.

E-mail address: [p.michelotto@pucpr.br](mailto:p.michelotto@pucpr.br) (P.V. Michelotto).

<sup>1</sup> These authors have contributed equally to the study, and thus may be regarded as the first author.

## CAPÍTULO 2

### **CARACTERIZAÇÃO E QUALIFICAÇÃO DE CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS DERIVADAS DE MEDULA ÓSSEA DE EQUINOS E COMPARAÇÃO DO SEU POTENCIAL IMUNOMODULADOR COM O DO MEIO CONDICIONADO**

*(Characterization and qualification of equine bone marrow-derived  
mesenchymal stromal cells and comparison of its immunomodulatory potential  
with the conditioned medium)*

#### **RESUMO**

O potencial efeito imunomodulador das células estromais mesenquimais derivadas de medula óssea (BMMSC) tornam-nas atrativas para tratamentos de afecções inflamatórias em cavalos. Porém, a falta de consenso em requisitos mínimos de caracterização e qualificação, ainda é um obstáculo para utilização clínica dessas células em equinos. O objetivo do estudo foi realizar a caracterização das BMMSC equinas e sua qualificação por meio da análise citogenética e controle microbiológico; além de avaliar seu potencial imunomodulador e do seu meio condicionado (CM), através do ensaio de inibição de linfócitos *in vitro*. A medula óssea foi coletada de quatro cavalos e as BMMSC foram cultivadas até a terceira passagem, quando foram utilizadas para as análises. A caracterização imunofenotípica das BMMSC foi realizada por citometria de fluxo, utilizando os marcadores CD90, CD19, CD14, CD105, CD45 e HLA-DR. A análise citogenética foi realizada nas células mononucleares derivadas de medula óssea (BMMC) e nas BMMSC, por bandeamento GTG. O controle microbiológico foi realizado com a inoculação do meio que as células foram cultivadas nos frascos do sistema BacT/ALERT®. O CM foi obtido após cultivo das BMMSC durante 48 horas com meio livre de soro. O ensaio de inibição de linfócitos utilizou as BMMSC e o CM em co-cultura com três diferentes diluições de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) estimuladas com fitohemaglutinina (PHA). Todos os animais apresentaram os marcadores positivos acima de 95% (CD90 e CD105), e os marcadores negativos abaixo de 10% (CD19, CD14, CD45 e HLA-DR). Das 60 metáfases analisadas, 5% apresentaram aneuploidia, podendo ser atribuída a artefatos de técnica. Não houve contaminação em nenhuma das amostras analisadas. A inibição de linfócitos foi maior que 50% em todos os tratamentos e significativa quando comparados ao controle de PBMC estimuladas com PHA ( $p < 0,0001$ ). O conjunto de técnicas utilizadas no presente estudo foi efetivo em atestar a qualidade e

caracterizar as BMMSC. Além disso, os resultados positivos para o CM justificam seu estudo mais aprofundado como terapêutica para doenças inflamatórias.

**Palavras-chave:** análise citogenética; citometria de fluxo; controle microbiológico; inibição de linfócitos; secretoma; terapia celular.

## 2.1 INTRODUÇÃO

As células estromais mesenquimais (MSC) têm sido muito utilizadas em terapias regenerativas na medicina veterinária equina, com resultados bastante promissores (Schnabel *et al.*, 2013). Estudos relatam isolamentos e expansões bem-sucedidas de diversas fontes, sendo a medula óssea (MO) e o tecido adiposo as mais comuns (Fortier e Travis, 2011). Porém, ainda existe uma falta de consenso quando se trata da caracterização das MSC equinas, e muitos artigos não detalham requisitos mínimos de segurança para utilização clínica dessas células, como por exemplo o controle microbiológico e a análise citogenética.

A Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT) possui três critérios mínimos para definir uma população de MSC humanas: aderência ao plástico; diferenciação em linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica; alta expressão dos marcadores de superfície CD73, CD90 e CD105, e baixa expressão de CD34, CD45, CD14 ou CD11b, MHC-II e CD19 ou CD79α. Porém, segundo Dominici *et al.* (2006), a expressão de antígenos de superfície não é universalmente bem caracterizada e os antígenos recomendados podem não se aplicar a outras espécies. Para as MSC equinas, observa-se a dificuldade na caracterização das células pela disponibilidade limitada de anticorpos monoclonais (mAb) espécie-específicos (De Schauwer *et al.*, 2011).

Além das dificuldades para caracterização das MSC equinas, poucos estudos se preocupam em verificar a qualidade das células que serão transplantadas. Um destes controles de qualidade seria a avaliação da estabilidade cromossômica das células mantidas em cultura. Apenas um artigo reporta a citogenética de células estromais mesenquimais derivadas de medula óssea (BMMSC) (Maia *et al.*, 2013), um de MSC de cordão umbilical (Alizadeh *et al.*, 2018) e outro de MSC de sangue periférico (Martinello *et al.*, 2010). O estudo de Alizadeh *et al.* (2018), inclusive, mostra anormalidades

cromossômicas já na quinta passagem, o que torna ainda mais relevante a avaliação citogenética das células antes de seu uso clínico.

Ainda como parte da qualificação das MSC, é importante realizar testes funcionais. Por apresentar um potencial imunomodulador, avalia-se a capacidade das MSC em inibir a proliferação de linfócitos *in vitro* (Carrade *et al.*, 2012; Mareschi *et al.*, 2016). Atualmente, acredita-se que o efeito imunomodulador das MSC esteja associado à secreção de fatores solúveis ou vesículas extracelulares, mecanismo chamado de efeito parácrino (Del Fattore *et al.*, 2015; Barussi *et al.*, 2016).

A partir do momento que se dá importância aos fatores solúveis, o estudo do meio condicionado (CM) onde as células foram cultivadas ganha força. O uso do CM como um tratamento livre de células pode se tornar vantajoso quando se considera a facilidade de armazenamento, disponibilidade do produto para a terapia e eliminação do risco de formação de agregados celulares (Cargnoni *et al.*, 2012).

Contudo, hipotetizou-se que as BMMSC equinas podem ser caracterizadas e qualificadas, e que o CM derivado das BMMSC possui capacidade imunomoduladora semelhante à das BMMSC. Sendo assim, os objetivos do presente estudo foram: 1) caracterizar as BMMSC equinas; 2) qualificar estas células para o transplante através da análise citogenética e controle microbiológico após cultivo; e 3) comparar o potencial imunomodulador das BMMSC equinas com o do seu CM, através da capacidade de inibição de linfócitos *in vitro*.

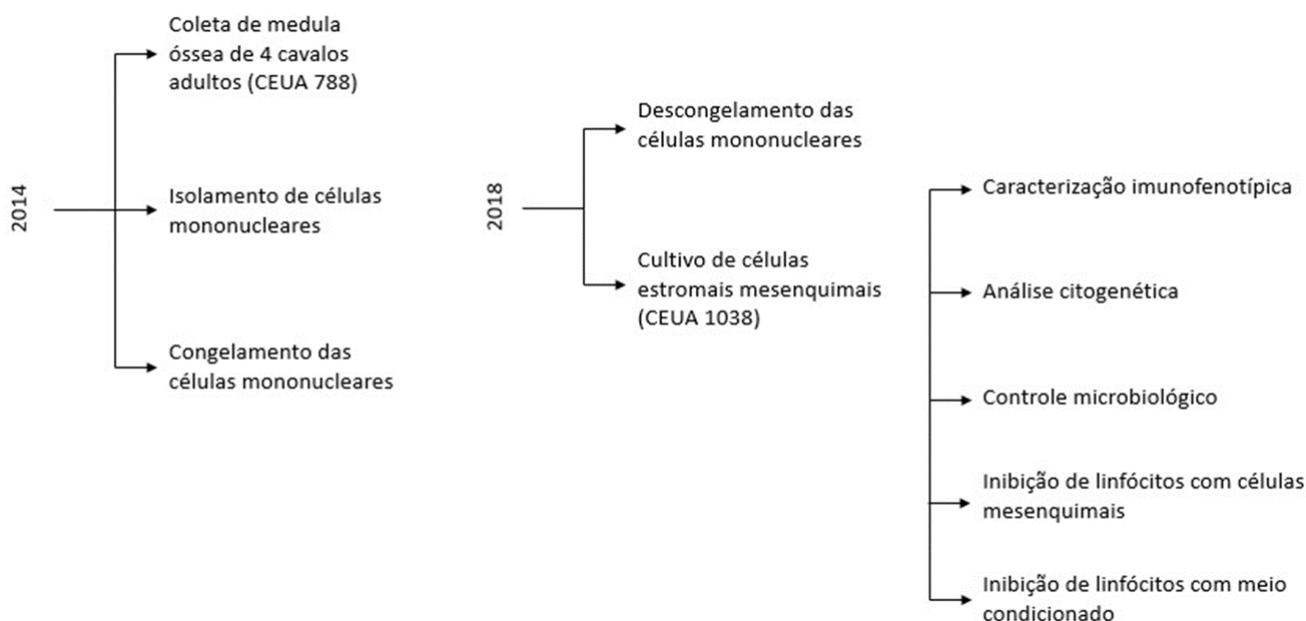
## 2.2 METODOLOGIA

### 2.2.1 Delineamento do estudo

O presente estudo apresenta-se como um estudo experimental *in vitro*, comparativo, conduzido de acordo com o esquema ilustrado na figura 1.

Em 2014 foram realizadas coletas de MO equina para dois projetos de mestrado (Barussi *et al.*, 2016; Bastos *et al.*, 2017) e as células mononucleares derivadas de medula óssea (BMMC) não utilizadas foram criopreservadas em nitrogênio líquido. Posteriormente, realizou-se um estudo

para verificar a viabilidade pós-descongelamento das BMSC congeladas (Bastos *et al.*, 2017), concluindo-se pela possibilidade de sua utilização. Assim, após descongeladas, as BMSC foram a fonte para o cultivo das MSC do presente estudo.



**Figura 1** - Delineamento do estudo experimental *in vitro* comparativo.

## 2.2.2 Animais

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), sob os números 788/2013 e 1038/2016.

Foram utilizados quatro equinos mestiços adultos para coleta de MO, dois machos e duas fêmeas, com idade média de  $14,8 \pm 8,7$  anos e peso médio de  $440 \pm 25,5$  kg. Os equinos eram provenientes do plantel da Fazenda Experimental Gralha Azul da PUCPR e estavam vacinados contra herpes vírus, influenza equina e tétano, além de apropriadamente desverminados.

## 2.2.3 Coleta de medula óssea

A coleta de MO dos quatro animais foi realizada de acordo com o protocolo de Kasashima *et al.* (2011) e Barussi *et al.* (2016). Resumidamente, os cavalos foram mantidos em jejum para sedação com 0,05 mg/kg de

acepromazina 1% via intramuscular (IM) (Acepran, Vetnil, São Paulo, Brasil). O local de coleta entre a quarta e a sexta esternebras foi tricotomizado, higienizado e anestesiado com 8 mL de cloridrato de lidocaína 2% (Lidovet, Laboratório Bravet, Rio de Janeiro, Brasil). A sedação foi complementada com 0,5 mg/kg de xilazina 10% via intravenosa (IV) (Sedomin, König, São Paulo, Brasil) e 50 mg de cloridrato de petidina IV (Dolosal, Cristália, São Paulo, Brasil).

A punção do esterno foi realizada com agulha Jamshidi 11G (Angiotech, Flórida, Estados Unidos), e a aspiração da MO foi realizada com seringas de 20 mL previamente preenchidas com 7 mL de meio Dulbecco's modificado por Iscove (IMDM, Gibco, Nova York, Estados Unidos) e 10% de heparina sódica 5000 UI/mL (Hemofol, Cristália, São Paulo, Brasil), para uma coleta de 7 mL de MO. Foram coletadas quatro seringas por animal, totalizando 28 mL do MO.

#### **2.2.4 Isolamento das células mononucleares derivadas de medula óssea**

As amostras de MO foram processadas de acordo com protocolo adaptado de Boyum (1964) para a obtenção das BMMC. O conteúdo das seringas foi filtrado em peneira celular com malha de 100 µm (EASYstrainer™, Greiner Bio-one, Frickenhausen, Alemanha) e centrifugado por 30 minutos a 650 g, em temperatura ambiente, sem freio e sem aceleração. Coletou-se a interfase do concentrado de plaquetas e células brancas, presente entre a coluna de células vermelhas e a de plasma, que foi então diluída na proporção 1:2 em meio IMDM. A suspensão foi cuidadosamente adicionada sobre o gradiente de densidade Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos) e posteriormente centrifugada por 30 minutos a 650 g, em temperatura ambiente, sem freio e sem aceleração. Coletou-se o anel de BMMC, presente entre a coluna de Histopaque e a de plasma, que foi então diluído na proporção 1:1 em meio IMDM, seguido de centrifugação por 10 minutos a 400 g, em temperatura ambiente, com freio e aceleração. O número total de células isoladas foi obtido por contagem em câmara de Neubauer (Boeco, Hamburgo, Alemanha) e as BMMC foram congeladas em criotubos (Corning, Nova York, Estados Unidos) na proporção 1:2 com meio de congelamento composto por 60% de meio IMDM, 20% de soro bovino fetal (SBF, Gibco, Nova York,

Estados Unidos) e 20% de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos), com  $20 \times 10^6$  células por criotubo. Após 24 horas em freezer a  $-80^\circ\text{C}$ , as amostras foram transferidas para o nitrogênio líquido, onde foram mantidas até o uso.

### **2.2.5 Cultivo das células estromais mesenquimais**

Aproximadamente um mês antes dos ensaios previstos, as BMMC previamente congeladas foram descongeladas e cultivadas para a obtenção das BMMSC, seguindo o protocolo adaptado de Rebelatto *et al.* (2008). Para isso, os criotubos foram descongelados em banho-maria a  $37^\circ\text{C}$  e seu conteúdo foi transferido para tubos cônicos graduados de centrifugação (Kasvi, São José dos Pinhais, Brasil) previamente preparados com 9 mL de meio IMDM suplementado com 1 mL de SBF. Os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 400 g, em temperatura ambiente, com freio e aceleração. Descartou-se o sobrenadante e o concentrado de células foi ressuspensionado em 1 mL de meio IMDM para a contagem de células em câmara de Neubauer e avaliação da viabilidade celular com azul de trypan (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos), a partir da contagem de células vivas (coloração clara) e mortas (coloração azulada).

As BMMC descongeladas foram semeadas em frascos de cultura celular de  $75 \text{ cm}^2$  (Kasvi, São José dos Pinhais, Brasil) na densidade de  $2 \times 10^5$  células vivas/ $\text{cm}^2$ , em 8 mL meio IMDM suplementado com 2 mL de SBF e 1% de penicilina e estreptomicina (Pen Strep, Gibco, Nova York, Estados Unidos). Os frascos foram mantidos em incubadora a  $37^\circ\text{C}$ , com atmosfera a 5% de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ). A primeira troca de meio ocorreu no segundo dia de cultivo, permitindo a remoção das células não aderentes. As demais trocas de meio aconteceram duas vezes por semana, até que as células atingissem 90% da confluência, quando foi realizada a primeira passagem.

Para realização da passagem, o frasco foi lavado uma vez com 5 mL de solução salina fosfatada tamponada (PBS, Gibco, Nova York, Estados Unidos) e as células foram dissociadas com a adição de 5 mL de tripsina-ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 0,25% (Gibco, Nova York, Estados Unidos). Os frascos foram mantidos em incubadora a  $37^\circ\text{C}$  por 5 minutos. Para

cessar a atividade da tripsina, utilizou-se 0,5 mL de SBF e 5 mL de meio IMDM. O conteúdo final foi transferido para tubos cônicos graduados de centrifugação, que foram centrifugados por 10 minutos a 400 g, em temperatura ambiente, com freio e aceleração. Descartou-se o sobrenadante e o concentrado de células foi ressuspendido em 1 mL de meio IMDM, prosseguindo-se com a contagem de células em câmara de Neubauer. As células foram semeadas em novos frascos de 75cm<sup>2</sup>, na densidade de 1 x 10<sup>4</sup> células/cm<sup>2</sup> e foram levadas novamente à incubadora.

As trocas de meio e passagens subsequentes seguiram o mesmo protocolo, até que as células estivessem confluentes na terceira passagem (P3), quando foram utilizadas para os ensaios.

#### **2.2.6 Caracterização imunofenotípica das células estromais mesenquimais**

A caracterização imunofenotípica das BMMSC foi realizada por citometria de fluxo, utilizando os seguintes mAb: CD90, CD19, CD14, CD105, CD45 e HLA-DR (Dominici *et al.*, 2006). O presente painel de marcadores foi montado após ensaio piloto, onde foi realizada a marcação de BMMC e BMMSC (anexo 1). Para determinar a viabilidade celular foi utilizado o corante vital 7-AAD (7-aminoactinomicina D), e a Anexina V foi utilizada para identificação e quantificação de células apoptóticas. Os anticorpos utilizados estão descritos no quadro 1. As BMMSC confluentes em P3 (tópico 2.2.5) de todos os animais ( $n = 4$ ) foram dissociadas pela ação da tripsina e, após contagem, aproximadamente 6 x 10<sup>5</sup> células foram adicionadas em cada tubo para citometria conforme quadro 2.

**Quadro 1** - Anticorpos monoclonais utilizados para a caracterização imunofenotípica das células estromais mesenquimais equinas derivadas de medula óssea.

Anticorpo	Fabricante	Clone	Fluorocromo	Produção	Reatividade	Diluição
CD90	BD Pharmingen	5E10	PE	Camundongo	Humano	1:100
CD19	Becton Dickinson	4G7	FITC	Camundongo	Humano	1:20
CD14	BD Pharmingen	M5E2	FITC	Camundongo	Humano	1:20
CD105	Invitrogen	SN6	FITC	Camundongo	Cavalo	1:5
CD45	Southern Biotech	F10-89-4	APC	Camundongo	Cavalo	1:7
HLA-DR	BD Pharmingen	TU36	PE-Cy5	Camundongo	Humano	1:33
7-AAD	BD Pharmingen	-	-	-	-	1:20
Anexina V	BD Pharmingen	-	PE	-	-	1:50

CD = grupo de diferenciação; HLA = antígeno leucocitário humano; FITC = isocianato de fluoresceína; PE = ficoeritrina; APC = alofocianina; PE-Cy5 = ficoeritrina e cianina; 7-AAD = 7-aminoactinomicina D.

Foram adicionados 500 µL de PBS nos tubos com as BMMSC, seguido de centrifugação por 5 minutos a 400 g, em temperatura ambiente, com freio e aceleração. Descartou-se o sobrenadante por inversão manual e os mAb correspondentes foram adicionados na ausência de luz, sendo homogeneizados manualmente. Os tubos foram incubados por 30 minutos no escuro e então adicionou-se 500 µL de PBS, seguido de centrifugação por 10 minutos a 400 g, em temperatura ambiente, com freio e aceleração. Descartou-se o sobrenadante e 300 µL de paraformaldeído 1% em PBS (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos) foram adicionados aos tubos de citometria. Anticorpos isotípicos de camundongo IgG1 foram utilizados como controle. Aproximadamente 100.000 células marcadas foram adquiridas pelo citômetro de fluxo FACSCalibur (BD, San Diego, Estados Unidos) e analisadas no software FlowJo® (FlowJo, LLC, Oregon, Estados Unidos).

**Quadro 2** – Anticorpos adicionados em cada tubo de citometria para marcação de células estromais mesenquimais equinas derivadas de medula óssea.

	<b>FITC</b>	<b>PE</b>	<b>PE-Cy5</b>	<b>APC</b>
<b>Tubo 1</b>	Controle autólogo			
<b>Tubo 2</b>	Controle Isotópico FITC	Controle Isotópico PE	Controle Isotópico PE-Cy5	Controle Isotópico APC
<b>Tubo 3</b>	CD14	CD90	HLA-DR	-
<b>Tubo 4</b>	CD19	Anexina V	7-AAD	CD45
<b>Tubo 5</b>	CD105	-	-	-

CD = grupo de diferenciação; HLA = antígeno leucocitário humano; FITC = Isocianato de fluoresceína; PE = ficoeritrina; APC = alofocianina; PE-Cy5 = Ficoeritrina e cianina; 7-AAD = 7-aminoactinomicina D.

### 2.2.7 Análise citogenética

A análise citogenética foi realizada nas BMMC logo após o descongelamento e nas BMMSC em P3 de três animais do estudo ( $n = 3$ ), seguindo o protocolo de Borgonovo *et al.* (2014). Para a análise das BMMC, um criotubo de cada animal foi descongelado conforme descrito no tópico 2.2.5, e as células obtidas foram semeadas em frascos de cultura celular de 75 cm<sup>2</sup> na densidade mínima de  $1 \times 10^5$  células vivas/cm<sup>2</sup>, em 8 mL de meio IMDM suplementado com 2 mL de SBF e 1% de penicilina e estreptomicina. Os frascos foram mantidos em incubadora a 37°C, com atmosfera a 5% de CO<sub>2</sub>, por 72 horas. Já para a análise das BMMSC, utilizou-se um frasco recém semeado em P3 que ficou incubado nas mesmas condições descritas acima, por 48 horas.

A interrupção mitótica das culturas foi realizada com a adição de colchicina (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos) a uma diluição final de 0,32 µg/mL. Os frascos foram mantidos em incubadora a 37°C, com atmosfera a 5% de CO<sub>2</sub>, por uma hora para as BMMC e por quatro horas para as BMMSC. Ao final da incubação, o conteúdo de cada frasco foi acondicionado em tubos cônicos graduados de centrifugação e realizou-se o protocolo padrão de dissociação das células aderentes pela ação da tripsina (tópico 2.2.5), com

o conteúdo acondicionado no tubo correspondente. Os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 400 g, em temperatura ambiente, com freio e aceleração e os sobrenadantes foram descartados.

A etapa de hipotonização foi realizada com a adição de 6 mL de solução de cloreto de potássio (KCl, Synth, São Paulo, Brasil) a 0,56% nas BMMC e 6 mL de KCl a 0,425% nas BMMSC. Os tubos foram mantidos por 20 minutos a 37°C, seguido de nova centrifugação. Os sobrenadantes foram descartados, seguido da adição de 5 mL de fixador de Carnoy 3:1 (metanol/ácido acético; Merck, Darmstadt, Alemanha/Synth, São Paulo, Brasil), gelado, tanto nas BMMC quanto nas BMMSC. Os tubos foram mantidos por 20 minutos a -8°C, seguido de nova centrifugação. Os sobrenadantes foram descartados, seguido da adição de 5 mL de fixador de Carnoy 5:2 nas BMMC e 5 mL de fixador de Carnoy 2:1 nas BMMSC. Os tubos passaram por nova centrifugação e repetiu-se o processo com o último fixador para cada tipo celular.

O concentrado de células final foi ressuspenso em fixador e realizou-se a confecção das lâminas. As lâminas foram preparadas sobre ambiente úmido a 60°C (banho-maria), com gotejamento de aproximadamente quatro gotas da amostra. Após evaporação, as lâminas foram incubadas a 60°C por 15 horas, para desidratação.

Após a desidratação, procedeu-se o bandeamento GTG (banda G com tripsina e Giemsa). Para o bandeamento, as lâminas permaneceram por cinco segundos em solução de tripsina (1:250, Gibco, Nova York, Estados Unidos), foram lavadas em solução de SBF/soro fisiológico (1:40) e em água destilada, e depois permaneceram por cinco minutos em corante Giemsa (1:20 em solução de Sorensen; Laborclin, Pinhais, Paraná). Após serem lavadas com água destilada, as lâminas secaram à temperatura ambiente.

As imagens foram capturadas em microscópio óptico Olympus (Olympus Corporation, Tóquio, Japão), acoplado à câmera bx51, com aumento de 100x. O cariótipo foi organizado manualmente com o auxílio do programa de edição de imagens Photoshop (Adobe, Califórnia, Estados Unidos), seguindo o modelo proposto por Buckland *et al.* (1976).

### **2.2.8 Controle microbiológico**

Com as BMMSC confluentes em P3 (tópico 2.2.5), coletou-se uma amostra de 2 mL do sobrenadante do cultivo celular de cada animal do estudo ( $n = 4$ ) e o volume foi inoculado diretamente no frasco com meio de cultura do BacT/ALERT® (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, França). Os frascos foram incubados por 14 dias no sistema de detecção microbiana automatizada BACT/ALERT® 3D (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, França) para obtenção do resultado do teste microbiológico para bactérias e fungos.

### **2.2.9 Preparo do meio condicionado**

Amostras de três animais foram utilizadas para obtenção do CM. As BMMSC em P3 foram semeadas em frascos para cultivo celular de 75 cm<sup>2</sup> na densidade de  $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>. Quando o cultivo atingiu 90% de confluência, cada frasco foi lavado duas vezes com 5 mL de PBS. Após, foram adicionados 15 mL de meio IMDM livre de SBF e os frascos retornaram para incubadora a 37°C, com atmosfera a 5% de CO<sub>2</sub>, onde foram incubados por 48 horas (Kay *et al.*, 2017).

Passadas as 48 horas, o meio de cultura presente nos frascos foi coletado em tubos cônicos graduados de centrifugação e processado segundo Lange-Consiglio *et al.* (2013). Os tubos foram centrifugados a 700 *g* por 10 minutos, em temperatura ambiente, com freio e aceleração. O sobrenadante foi recuperado e filtrado a 0,22 µm (Filter Upper Cups, Kasvi, São José dos Pinhais, Brasil). O CM resultante foi utilizado no ensaio de inibição de linfócitos.

### **2.2.10 Ensaio de inibição de linfócitos**

O ensaio de inibição de linfócitos foi realizado com dois tratamentos: BMMSC ( $n = 4$ ) e CM ( $n = 3$ ). Para ambos os grupos, foram utilizadas três diluições de células mononucleares de sangue periférico (PBMC): 1:2, 1:5 e 1:10. Uma placa controle foi montada com PBMC não marcadas, PBMC marcadas com 5(6)-Carboxyfluorescein diacetate *N*-succinimidyl ester (CFSE, Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos) e PBMC marcadas com CFSE e estimuladas com o mitógeno fitohemaglutinina (PHA, Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos) a 1 µg/mL.

As BMMSC confluentes em P3 (tópico 2.2.5) foram dissociadas pela ação da tripsina e diluídas à uma concentração de  $0,5 \times 10^6$  células/mL em meio IMDM com 10% de SBF. A suspensão foi semeada em placas de 24 poços (TPP, Trasadingen, Suíça), 1 mL por poço e em triplicata para cada diluição de PBMC. As placas foram incubadas por duas horas em incubadora a 37°C, com atmosfera a 5% de CO<sub>2</sub>, para adesão celular.

As PBMC foram isoladas de um único doador para todos os ensaios. O sangue foi colhido de um equino adulto jovem saudável (fêmea de 5 anos), por punção venojugular, em 10% de heparina sódica 5000 UI/mL. O material passou por centrifugação de 30 minutos a 650 g, em temperatura ambiente, sem freio e sem aceleração, para obtenção da interfase de células brancas, que foi então diluída na proporção 1:2 em meio IMDM e pipetada sobre gradiente de densidade Histopaque®-1077. Após centrifugação por 30 minutos a 650 g, em temperatura ambiente, sem freio e sem aceleração, coletou-se o anel de PBMC. As PBMC foram lavadas uma vez em meio IMDM e contadas em câmara de Neubauer.

Das PBMC obtidas,  $2 \times 10^6$  foram separadas na concentração de  $0,5 \times 10^6$  células/mL, sem marcação, para a placa controle. As demais células passaram pelo processo de marcação com CFSE como descrito a seguir. Primeiramente as PBMC foram lavadas em 10 mL de PBS e centrifugadas por 10 minutos a 400 g, em temperatura ambiente, com freio e aceleração. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 1,5 mL de PBS com 0,1% de albumina humana (Alburex 20, CSL Behring, Berna, Suíça) para, em seguida, serem marcadas com 0,5 μM de CFSE. As células foram mantidas por 10 minutos em temperatura ambiente, protegidas da luz. A marcação foi interrompida com a adição de 7,5 mL de meio IMDM suplementado com 10% de SBF gelado, seguido de incubação por 5 minutos em gelo, protegida da luz. Após nova centrifugação por 10 minutos a 400 g, foram realizadas mais duas lavagens em meio IMDM suplementado com 10% de SBF gelado. O concentrado de células final foi contado em câmara de Neubauer e as PBMC marcadas foram diluídas para uma concentração de  $0,5 \times 10^6$  células/mL.

Nesse momento, as placas do grupo CM foram preparadas com a adição de 1 mL por poço do meio condicionado de cada animal, em triplicata para cada diluição de PBMC.

Tanto para o grupo CM, quanto para o grupo BMMSC, as PBMC marcadas foram adicionadas em cada poço na diluição correspondente (quadro 3), e a proliferação de linfócitos foi induzida pelo estímulo das PBMC com 10  $\mu$ L do mitógeno PHA a 1  $\mu$ g/mL.

**Quadro 3** – Diluições de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) equino para o ensaio de inibição de linfócitos.

<b>Diluição PBMC</b>	<b>Volume de PBMC a <math>0,5 \times 10^6</math> (<math>\mu</math>L)</b>	<b>Volume de meio (<math>\mu</math>L)</b>
1:2	500	500
1:5	200	800
1:10	100	900

A placa controle e as placas dos grupos foram incubadas por cinco dias em incubadora a 37°C, com atmosfera a 5% de CO<sub>2</sub>, no escuro. No quinto dia de incubação, o conteúdo dos poços foi coletado em tubos para citometria. Cada poço foi lavado duas vezes com meio IMDM, e todo conteúdo foi coletado no tubo de citometria correspondente. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 650 g, em temperatura ambiente, com freio e aceleração, e então procedeu-se a marcação com 5  $\mu$ L do corante vital 7-AAD, conforme tópico 2.2.6. Aproximadamente 100.000 células marcadas foram adquiridas pelo citômetro de fluxo FACSCalibur e analisadas no software FlowJo®.

O cálculo da porcentagem de inibição dos linfócitos foi baseado na média da proliferação celular para as PBMC marcadas com CFSE e estimuladas com PHA, e na média da proliferação celular dos tratamentos para cada diluição, conforme figura 2. Valores de inibição superiores a 50% foram considerados efetivos.

$$\% \text{ inibição} = 100 - \frac{\text{média diluição} \times 100}{\text{média PBMC} + \text{CFSE} + \text{PHA}}$$

**Figura 2** – Cálculo da porcentagem de inibição de linfócitos baseado na média da proliferação celular para cada diluição de células mononucleares de sangue periférico (PBMC), e na média da proliferação celular para o controle de PBMC marcadas com carboxyfluorescein diacetate *N*-succinimidyl ester (CFSE) e estimuladas com fitohemaglutinina (PHA).

### 2.2.11 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no programa *GraphPad Prism* versão 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, Estados Unidos). Os dados do ensaio de inibição de linfócitos foram enquadrados como paramétricos após teste de normalidade D'Agostino e Pearson. Utilizou-se, então, a análise de variância (ANOVA *one-way*) seguida por teste de Tukey de múltipla comparação entre os grupos e entre as diluições. Os valores foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão da média (SD). Valores de  $p < 0,05$  foram considerados como significativos.

## 2.3 RESULTADOS

### 2.3.1 Delineamento do estudo

O estudo utilizou amostras congeladas de BMMC provenientes de estudos anteriores e cada animal tinha um número diferente de células disponível. Primeiramente, realizou-se a caracterização imunofenotípica, controle microbiológico e o ensaio de inibição de linfócitos com as BMMSC. A análise citogenética e a inibição de linfócitos com o CM só foram realizadas em um segundo momento, não sendo possível realizar essas análises para o animal que tinha apenas um criotubo de BMMC congelado.

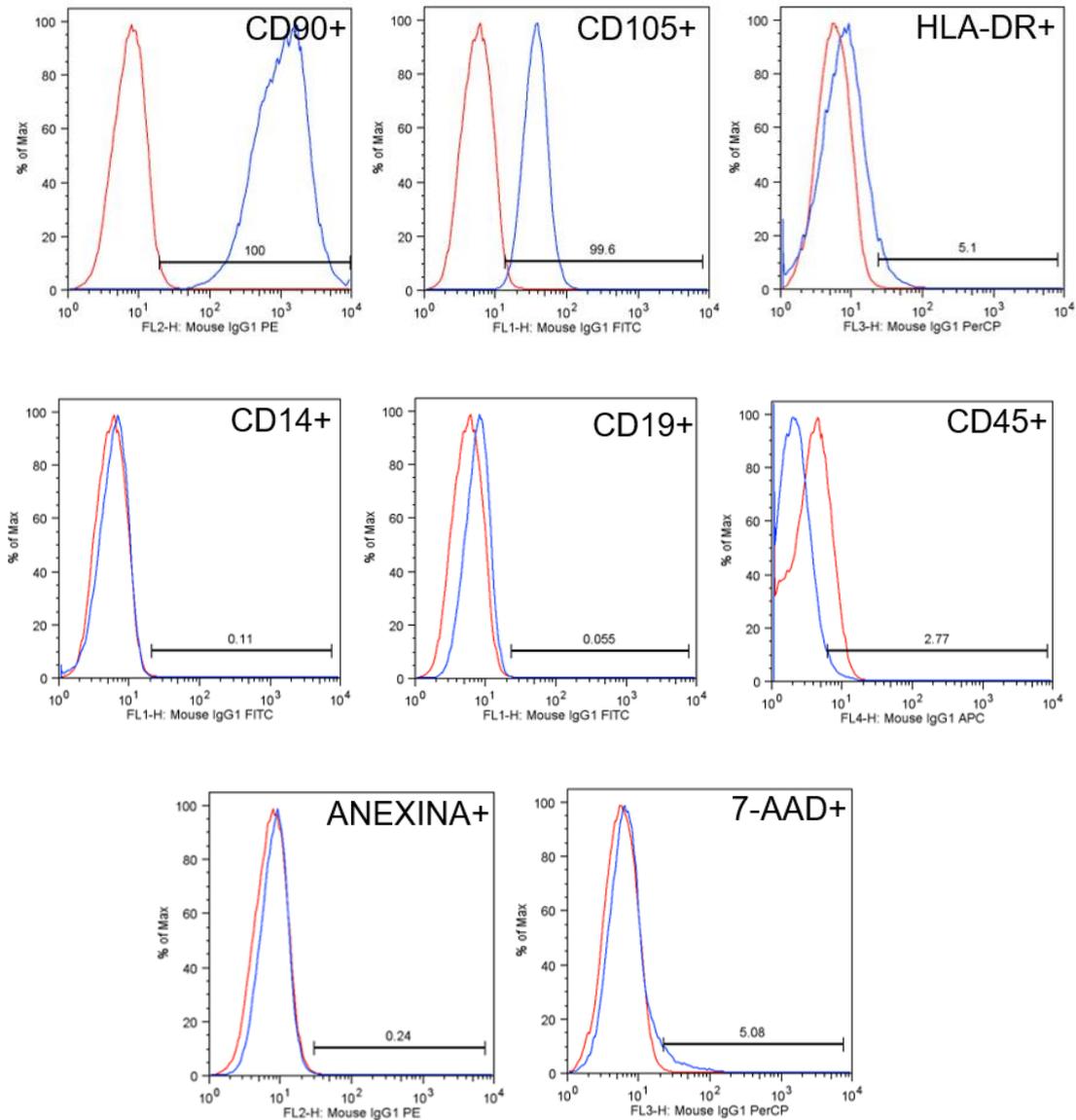
### **2.3.2 Cultivo das células estromais mesenquimais**

As BMMC estavam criopreservadas por, em média,  $52 \pm 3$  meses e apresentaram viabilidade média de  $73,43 \pm 15,47\%$  após descongelamento para cultivo das BMMSC. Todas as amostras de BMMSC cultivadas apresentaram aderência ao plástico e morfologia fibroblastóide.

### **2.3.3 Caracterização imunofenotípica das células estromais mesenquimais**

Foi conduzido um ensaio piloto para analisar a reatividade de mAb anti-humanos em BMMSC equinas (resultados apresentados no anexo 1). Após o piloto, observou-se que os mAb CD73 (BD Pharmingen, clone AD2), CD166 (BD Pharmingen, clone 3A6), CD29 (BD Pharmingen, clone MAR4), CD105 (BD Pharmingen, clone 266), e CD45 (BD Pharmingen, clone HI30) não seriam adequados para a correta caracterização imunofenotípica das MSC equinas. Após esses resultados, foram adquiridos os mAb CD105 e CD45, já conjugados a um fluorocromo, que apresentavam reatividade para cavalo. O CD90 apresentou reatividade cruzada para as BMMC e as BMMSC, porém, no período de planejamento do estudo, ainda não havia uma opção de CD90 com reatividade cruzada para cavalo. Sendo assim, o painel para caracterização imunofenotípica das MSC equinas foi planejado da seguinte maneira: CD105 e CD90 (positivos), CD45, CD14, CD19 e HLA-DR (negativos).

A caracterização imunofenotípica foi realizada com as BMMSC confluentes em P3. Em média  $594 \pm 117,8$  mil células foram adicionadas em cada tubo para citometria. Os histogramas representativos obtidos para um dos animais estão representados na figura 3, e os valores obtidos para todos os animais estão demonstrados na tabela 1.



**Figura 3** – Caracterização imunofenotípica e viabilidade das células estromais mesenquimais de medula óssea equina, avaliadas por citometria de fluxo. Histogramas representativos de uma amostra do estudo, analisadas na terceira passagem. Os picos em azul indicam a porcentagem da população positiva para cada anticorpo, enquanto os picos em vermelho indicam o controle isotípico dos anticorpos. CD90 e CD105 mostraram-se positivos, enquanto que HLA-DR, CD14, CD19 e CD45 mostraram-se negativos (baixa expressão). Anexina V e 7-AAD apresentaram valores condizentes com células em cultivo. CD = grupos de diferenciação celular; HLA = antígeno leucocitário humano; 7-AAD = 7-aminoactinomicina D.

**Tabela 1** – Resultados do painel de caracterização imunofenotípica e viabilidade de células estromais mesenquimais equinas derivadas de medula óssea.

	<b>CD90</b> (%)	<b>CD19</b> (%)	<b>CD14</b> (%)	<b>CD105</b> (%)	<b>CD45</b> (%)	<b>HLA-DR</b> (%)	<b>7-AAD</b> (%)	<b>Anexina V</b> (%)
<b>Cavalo 1</b>	100	0,21	0,44	100	8,40	0,68	4,77	0,59
<b>Cavalo 2</b>	100	0,12	0,64	99,90	8,77	8,38	4,98	1,17
<b>Cavalo 3</b>	100	0,05	0,11	99,60	2,77	5,10	5,08	0,24
<b>Cavalo 4</b>	100	0,07	0,29	100	9,73	2,75	6,72	0,66
<b>MÉDIA ± SD</b>	<b>100</b>	<b>0,11 ±</b> <b>0,07</b>	<b>0,37 ±</b> <b>0,22</b>	<b>99,88 ±</b> <b>0,19</b>	<b>7,42 ±</b> <b>3,15</b>	<b>4,23 ±</b> <b>3,30</b>	<b>5,39 ±</b> <b>0,90</b>	<b>0,66 ±</b> <b>0,38</b>

Aquisição realizada por citometria de fluxo durante a terceira passagem. Resultados apresentados como porcentagem (%) e média ± desvio padrão (SD). CD = grupo de diferenciação; HLA = antígeno leucocitário humano; 7-AAD = 7-aminoactinomicina D.

Todos os animais apresentaram os marcadores positivos acima de 70% (CD90 e CD105), e os marcadores negativos abaixo de 10% (CD19, CD14, CD45 e HLA-DR). Estes valores encontram-se em concordância com critérios de qualificação da amostra pré-estabelecidos pelo Núcleo de Tecnologia Celular da PUCPR, licenciado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), para caracterizar uma célula como MSC. A viabilidade celular ficou dentro dos valores normais para células em P3, sendo acima de 70% (porcentagem de células viáveis = 100 - leitura para 7-AAD).

### 2.3.4 Análise citogenética

Foram analisadas dez metáfases de cada amostra, totalizando 60 cariótipos (figuras 4 e 5). Os resultados das contagens de número diploide e número fundamental estão demonstrados na tabela 2.

**Tabela 2** – Número diploide ( $2n = 64$ ) e número fundamental ( $NF = 91$ ) observados nas metáfases de células mononucleares derivadas de medula óssea (BMMC) e de células estromais mesenquimais derivadas de medula óssea (BMMSC) de equinos.

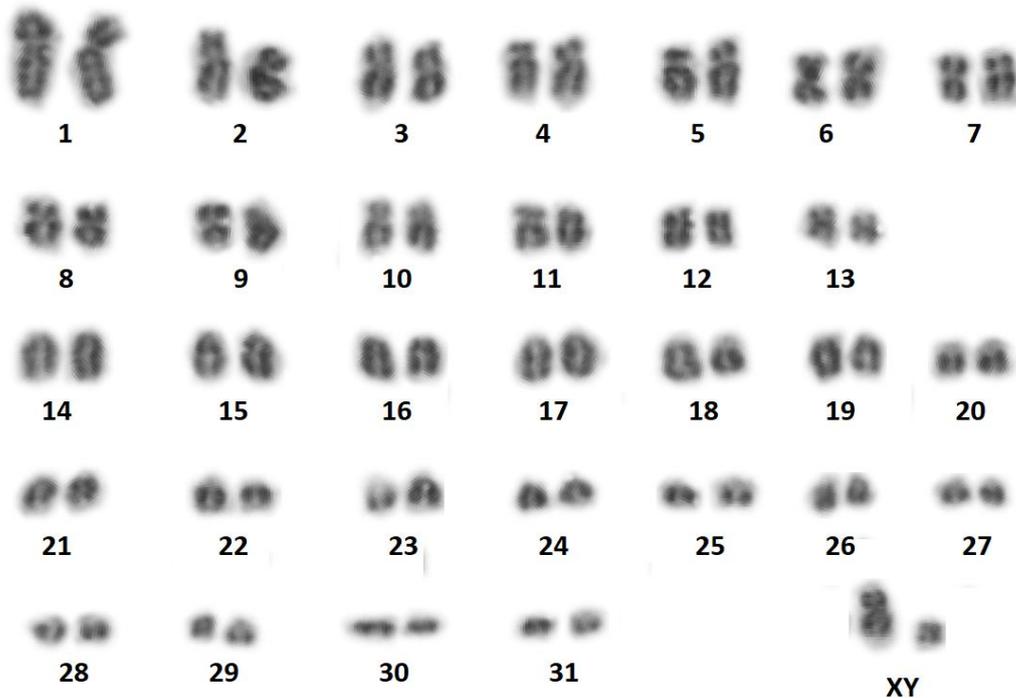
	<b>Cavalo 1</b>	<b>Cavalo 1</b>	<b>Cavalo 2</b>	<b>Cavalo 2</b>	<b>Cavalo 3</b>	<b>Cavalo 3</b>
	<b>BMMC</b>	<b>BMMSC</b>	<b>BMMC</b>	<b>BMMSC</b>	<b>BMMC</b>	<b>BMMSC</b>
<b>2n</b>	$64 \pm 0$	$63,9 \pm 0,32$	$64 \pm 0$	$63,9 \pm 0,32$	$63,9 \pm 0,32$	$64 \pm 0$
<b>NF</b>	$91 \pm 0$	$90,9 \pm 0,32$	$91 \pm 0$	$90,9 \pm 0,32$	$90,9 \pm 0,32$	$91 \pm 0$

Resultados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.

De um total de 60 metáfases analisadas, três apresentaram falta de um cromossomo (uma metáfase de BMMSC do cavalo 1, uma de BMMSC do cavalo 2 e uma de BMMC do cavalo 3), em pares distintos, o que equivale a 5% de aneuploidia.



**Figura 4** – Cariótipo de uma metáfase de célula mononuclear derivada de medula óssea equina ( $2n = 64$ ).



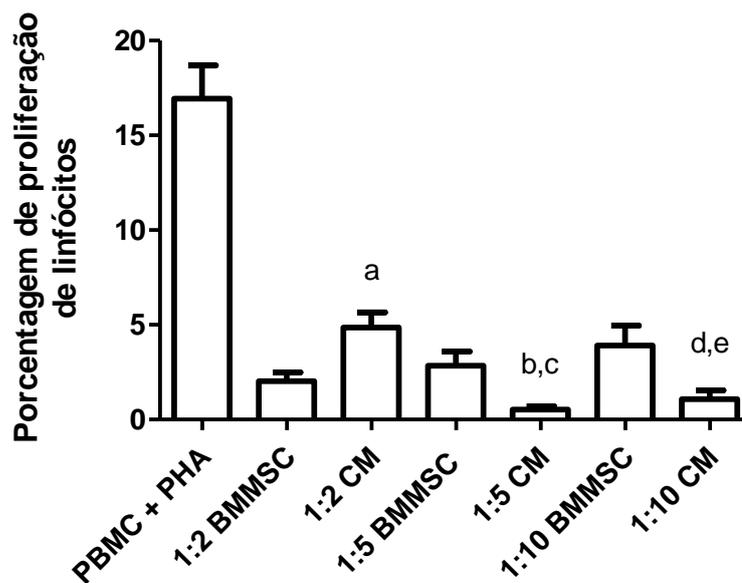
**Figura 5** - Cariótipo de uma metáfase de célula estromal mesenquimal derivada de medula óssea equina em terceira passagem ( $2n = 64$ ).

### 2.3.5 Controle microbiológico

A análise do controle microbiológico foi realizada no meio de cultivo das BMMSC em P3. A leitura para bactérias aeróbias foi realizada após sete dias de incubação, e para fungos, após 14 dias de incubação. Os resultados foram negativos para todas as amostras analisadas.

### 2.3.6 Ensaio de inibição de linfócitos

A inibição da proliferação de linfócitos foi efetiva tanto no ensaio utilizando as BMMSC, quanto com o CM, apresentando inibição maior que 50%. Os resultados estão demonstrados como porcentagem de proliferação na figura 6 e tabela 3, e como porcentagem de inibição nas tabelas 4 e 5.



**Figura 6** – Comparação da porcentagem de proliferação de linfócitos, quando incubados com células estromais mesenquimais equinas derivadas de medula óssea (BMMSC) ou meio condicionado (CM), e diferentes diluições de células mononucleares de sangue periférico (PBMC - 1:2, 1:5 e 1:10) estimuladas com fitohemaglutinina (PHA). As PBMC estimuladas com PHA foram utilizadas como controle. A proliferação dos linfócitos diminuiu significativamente com todos os tratamentos comparados ao controle ( $p < 0,0001$ ). <sup>a</sup>  $p = 0,005$  vs. 1:2 BMMSC; <sup>b</sup>  $p = 0,018$  vs. 1:5 BMMSC; <sup>c</sup>  $p < 0,0001$  vs. 1:2 CM; <sup>d</sup>  $p = 0,048$  vs. 1:10 BMMSC; <sup>e</sup>  $p = 0,001$  vs. 1:2 CM.

**Tabela 3** – Observações estatísticas encontradas no ensaio de inibição de linfócitos.

<b>Comparação</b>	<b>Média ± SD</b>	<b>Valor de p</b>
1:2 BMMSC vs. PBMC + PHA	2,02 ± 1,57% vs. 16,93 ± 4,31%	< 0,0001
1:2 CM vs. PBMC + PHA	4,86 ± 2,37% vs. 16,93 ± 4,31%	< 0,0001
1:5 BMMSC vs. PBMC + PHA	2,84 ± 2,62% vs. 16,93 ± 4,31%	< 0,0001
1:5 CM vs. PBMC + PHA	0,53 ± 0,46% vs. 16,93 ± 4,31%	< 0,0001
1:10 BMMSC vs. PBMC + PHA	3,92 ± 3,60% vs. 16,93 ± 4,31%	< 0,0001
1:10 CM vs. PBMC + PHA	1,07 ± 1,33% vs. 16,93 ± 4,31%	< 0,0001
1:5 CM vs. 1:5 BMMSC	0,53 ± 0,46% vs. 2,84 ± 2,62%	0,018
1:10 CM vs. 1:10 BMMSC	1,07 ± 1,33% vs. 3,92 ± 3,60%	0,048
1:5 CM vs. 1:2 CM	0,53 ± 0,46% vs. 4,86 ± 2,37%	< 0,0001
1:10 CM vs. 1:2 CM	1,07 ± 1,33% vs. 4,86 ± 2,37%	0,001

Diferentes diluições de células mononucleares de sangue periférico (PBMC - 1:2, 1:5 e 1:10) estimuladas com fitohemaglutinina (PHA) foram incubadas com células estromais mesenquimais equinas derivadas de medula óssea (BMMSC) ou meio condicionado (CM). As PBMC estimuladas com PHA foram utilizadas como controle. Valores de porcentagem de proliferação de linfócitos. SD = desvio padrão.

**Tabela 4** – Porcentagem de inibição de linfócitos, quando incubados com células estromais mesenquimais equinas derivadas de medula óssea.

	<b>PBMC 1:2</b>	<b>PBMC 1:5</b>	<b>PBMC 1:10</b>
<b>Cavalo 1</b>	97,36	81,06	64,57
<b>Cavalo 2</b>	77,37	62,43	55,13
<b>Cavalo 3</b>	84,58	93,04	94,84
<b>Cavalo 4</b>	95,45	96,25	92,91
<b>Média ± SD</b>	<b>88,69 ± 9,41</b>	<b>83,20 ± 15,31</b>	<b>76,86 ± 20,03</b>

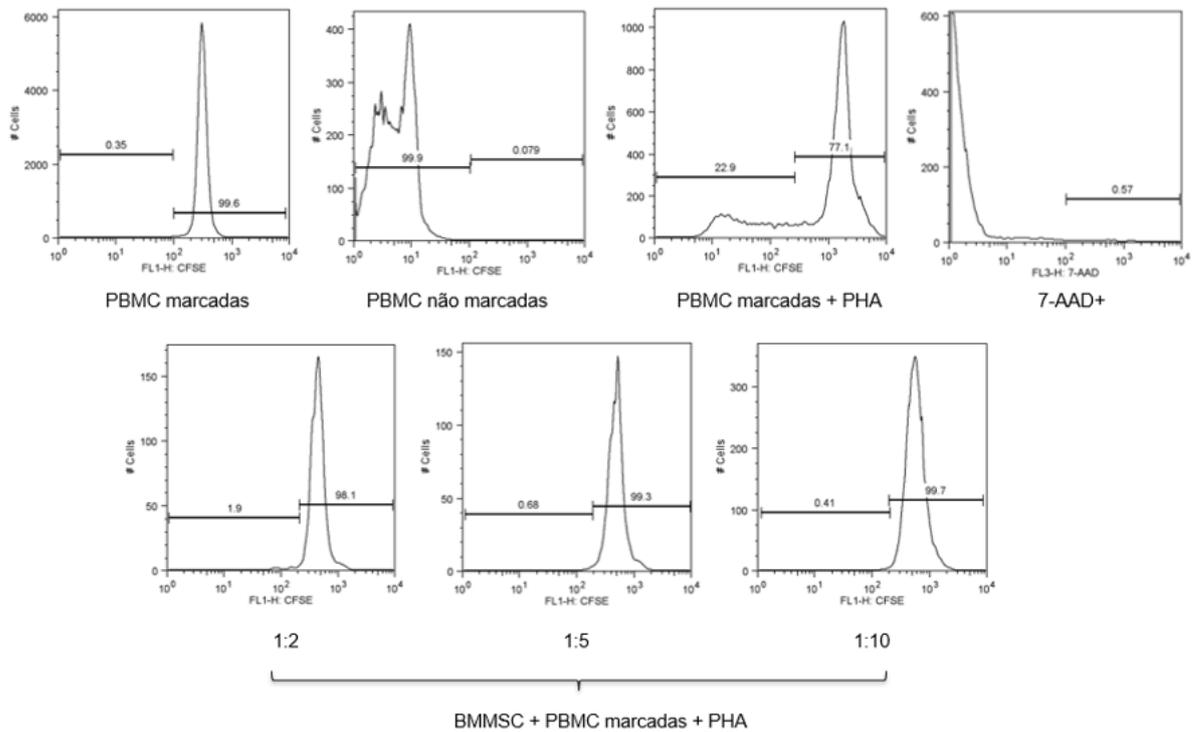
Foram utilizadas diferentes diluições de células mononucleares de sangue periférico (PBMC - 1:2, 1:5 e 1:10) estimuladas com fitohemaglutinina (PHA). SD = desvio padrão.

**Tabela 5** – Porcentagem de inibição de linfócitos, quando incubados com meio condicionado derivado de cultura de células estromais mesenquimais equinas de medula óssea.

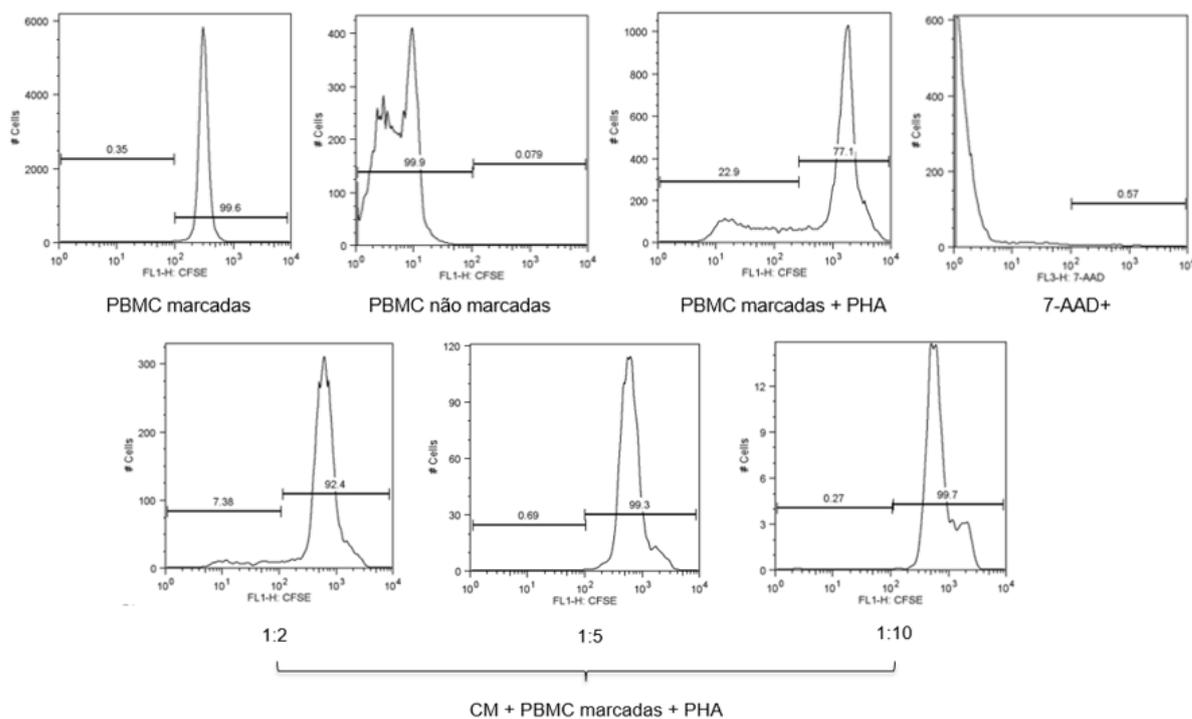
	<b>PBMC 1:2</b>	<b>PBMC 1:5</b>	<b>PBMC 1:10</b>
<b>Cavalo 1</b>	59,64	95,35	97,05
<b>Cavalo 2</b>	68,58	96,28	98,59
<b>Cavalo 3</b>	85,59	98,92	81,27
<b>Média ± SD</b>	<b>71,27 ± 13,18</b>	<b>96,85 ± 1,85</b>	<b>92,30 ± 9,59</b>

Foram utilizadas diferentes diluições de células mononucleares de sangue periférico (PBMC - 1:2, 1:5 e 1:10) estimuladas com fitohemaglutinina (PHA). SD = desvio padrão.

Os histogramas obtidos para um dos animais, tanto para as BMMSC, quanto para o CM, estão representados nas figuras 7 e 8.



**Figura 7** – Histogramas representativos do ensaio de inibição de linfócitos com células estromais mesenquimais derivadas de medula óssea equina (BMMSC), utilizando diferentes diluições de células mononucleares de sangue periférico (PBMC – 1:2, 1:5, 1:10) estimuladas com fitohemaglutinina (PHA) e marcadas com 5(6)-Carboxyfluorescein diacetate *N*-succinimidyl ester (CFSE). Os resultados indicam uma diminuição na proliferação dos linfócitos incubados juntamente com as BMMSC, independentemente da diluição de PBMC. 7-AAD = 7-aminoactinomicina D.



**Figura 8** – Histogramas representativos do ensaio de inibição de linfócitos com o meio condicionado (CM) derivado de células estromais mesenquimais derivadas de medula óssea equina, utilizando diferentes diluições de células mononucleares de sangue periférico (PBMC – 1:2, 1:5, 1:10) estimuladas com fitohemaglutinina (PHA) e marcadas com 5(6)-Carboxyfluorescein diacetate *N*-succinimidyl ester (CFSE). Os resultados indicam uma diminuição na proliferação dos linfócitos incubados juntamente com o CM, independentemente da diluição de PBMC. 7-AAD = 7-aminoactinomicina D.

## 2.4 DISCUSSÃO

O uso da terapia celular na medicina veterinária de equinos, especificamente com MSC, vem crescendo nos últimos anos (Schnabel *et al.*, 2013), porém, ainda inexistente um consenso em muitos aspectos como: melhor fonte para coleta, melhor protocolo para cada afecção, painel de marcadores para caracterização imunofenotípica das MSC equinas e qual é o mecanismo de ação que justifica o uso da terapia celular. O presente estudo buscou analisar algumas dessas lacunas, principalmente em relação à devida caracterização das BMMSC equinas, e se os fatores secretados por elas têm, por si só, efeito imunomodulador.

A correta caracterização das MSC equinas é dificultada pela disponibilidade limitada de mAb dirigidos aos epítomos equinos, ou contra epítomos de outras espécies que apresentam reatividade cruzada com os equinos (De Schauwer *et al.*, 2011). Por isso, mesmo com o painel proposto pela ISCT para caracterização de MSC humanas – onde acima de 95% das MSC devem expressar os marcadores CD73, CD90 e CD105; e abaixo de 2% devem expressar os marcadores CD34, CD45, CD14 ou CD11b, MHC-II e CD19 ou CD79 $\alpha$  (Dominici *et al.*, 2006) – os artigos que estudaram as MSC equinas apresentam alguns resultados discrepantes.

Observando a dificuldade de marcação das MSC equinas, De Schauwer *et al.* (2012) estudaram a reatividade cruzada de 30 mAb comerciais para reconhecimento de epítomos equinos, incluindo clones para CD45, CD90 e CD105. Apenas 11 deles foram capazes de reconhecer os epítomos equinos, incluindo o clone SN6 para CD105 e o clone F10-89-4 para o CD45, os quais acabaram sendo escolhidos para o presente estudo. O clone para CD90 analisado no estudo de De Schauwer *et al.* (2012) não foi o mesmo do presente estudo (DH24A vs. 5E10, respectivamente), mas também se mostrou efetivo.

Na literatura, a marcação para CD90 foi realizada com diversos mAb diferentes, obtendo também diferentes resultados. Expressões acima de 90% foram obtidas para BMMSC equinas com CD90 anti-humano (90%, Ranera *et al.*, 2011), anti-rato (98,2%, Barberini *et al.*, 2014) e anti-cão (91,34%, Carrade *et al.*, 2012). Já Paebst *et al.* (2014) encontrou baixa expressão de CD90 (3,07%), utilizando anticorpo anti-humano de um clone diferente do utilizado no presente estudo (Thy1-A1 vs. 5E10, respectivamente). Os resultados aqui apresentados estão dentro do esperado (acima de 95%), porém, uma vez que o anticorpo utilizado apresentou reatividade cruzada também com as BMMC, faz-se importante um novo estudo, preferencialmente utilizando o clone DH24A, que comprovadamente já apresentou reatividade para cavalo (De Schauwer *et al.*, 2012), para garantir que as análises realizadas são fidedignas para MSC equinas.

Em relação ao marcador CD45, há resultados satisfatórios e mais próximos ao recomendado pela ISCT quando comparados ao presente estudo, com marcações abaixo de 2% utilizando anticorpos anti-humano (Ranera *et al.*,

2011; Paebst *et al.*, 2014). No presente estudo, o marcador CD45 ficou acima do limite recomendado pela ISCT, mas abaixo de 10% que é o limite utilizado em laboratórios licenciados pela ANVISA e utilizado como critério de qualificação da amostra no Núcleo de Tecnologia Celular da PUCPR. Vale ressaltar que o anticorpo utilizado neste estudo tinha reatividade para cavalo, o que deveria resultar em uma leitura mais fidedigna.

O marcador CD105 é o que apresenta maior discrepância nos resultados já publicados para BMMSC equinas. Utilizando anticorpos anti-humano, o trabalho de Ranera *et al.* (2011) não obteve leitura para CD105, e o de Paebst *et al.* (2014) obteve resultados abaixo de 0,85%. Expressões mais altas foram obtidas no trabalho de Xie *et al.* (2013), com média de 64%, mas ainda fora do recomendado tanto pela ISCT, quanto pela ANVISA (95% e 70%, respectivamente). Apenas o artigo de Barberini *et al.* (2014) demonstrou expressões acima dos 95% (média de 97,7%). O presente trabalho utilizou anticorpo com reatividade para cavalo e conseguiu leituras acima de 95% em todas as BMMSC analisadas. Logo, pode-se ressaltar a importância de se utilizar o anticorpo CD105 de um clone com comprovada reatividade ao epítipo equino, sendo possível obter resultados homogêneos.

Apenas o estudo de Paebst *et al.* (2014) marcou as MSC equinas com CD14. O resultado corroborou com o do presente estudo (abaixo de 2%), mesmo com o uso de clones diferentes (clone 134620 vs. M5E2, respectivamente).

Os demais marcadores negativos utilizados neste estudo (CD19 e HLA-DR) ainda não haviam sido descritos na marcação de MSC equinas derivadas de medula óssea. O CD19 apresentou resultados consistentes e abaixo de 2%. Já o HLA-DR teve bastante variabilidade nas leituras, mas todas ficaram abaixo de 10%. Os resultados para os marcadores negativos devem ser interpretados com cautela, pois, devido à ausência de mAb espécie-específicos, a baixa expressão pode ser resultado da ausência de reatividade cruzada (Ranera *et al.*, 2011). Nesse sentido, é de grande importância a marcação das BMMC como controle, conforme foi realizado em ensaio piloto durante a escolha dos mAb.

Um produto celular para aplicação terapêutica deve ser viável, livre de alterações cromossômicas clonais e livre de contaminação por

microorganismos (Jacobs *et al.*, 2013). Porém, poucos artigos relatam a análise citogenética de MSC equinas antes dos tratamentos, e essa deveria ser uma preocupação tal qual ocorre na medicina humana (RDC 9/11, ANVISA). Um estudo anterior em BMMSC equinas não encontrou alterações cromossômicas até a quarta passagem (Maia *et al.*, 2013). Porém, não fica claro qual foi a amostragem destinada à análise citogenética e não são apresentadas imagens do cariótipo obtido.

Já em um estudo com MSC de sangue de cordão umbilical de equinos (Alizadeh *et al.*, 2018), 60% das metáfases analisadas na quinta passagem exibiram aneuploidia (monossomia, trissomia e/ou nulossomia), onde o cromossomo 13 foi o mais afetado, seguido pelos cromossomos sexuais. Porém, este estudo não realizou uma análise das células mononucleares, para atestar que as alterações foram decorrentes do cultivo e não se tratavam de alterações constitutivas dos animais.

No presente estudo houve baixa frequência de aneuploidia (5%), e não apenas após o cultivo, o que somado ao tamanho reduzido dos cromossomos acrocêntricos finais, pode ser atribuído a artefatos da técnica, e não ao cultivo das células. Além disso, o fato das alterações terem aparecido em cromossomos aleatórios, indica que não são clonais e trazem menor risco à utilização dessas células. Pequenas deleções e translocações, assim como inversões, só poderiam ser percebidas se o padrão de bandas G estivesse bem definido, o que não foi observado nos cariótipos montados. Técnicas de citogenética molecular, como a hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) e suas derivações, poderiam complementar a análise de estabilidade cromossômica das MSC equinas.

Em relação à esterilidade das células, a mesma deve ser assegurada ao longo da coleta e processamento do material, incluindo o cultivo, criopreservação, descongelamento e infusão (Jacobs *et al.*, 2013). As amostras do presente estudo não apresentaram nenhum tipo de contaminação, atestando a qualidade da coleta de MO e posterior manipulação e cultivo das MSC. Em humanos, a coleta de MO é feita em centro cirúrgico, em condições assépticas. Já em equinos, as coletas geralmente são realizadas a campo, onde não é possível obter um local totalmente livre de potenciais

contaminantes, principalmente pela livre circulação de ar, ressaltando a importância do controle microbiológico das células obtidas.

Com relação ao mecanismo de ação das MSC, muito se tem avançado. Em modelos que envolvem cicatrização de tecidos, como em lesões musculoesqueléticas, fala-se na importância das MSC em diferenciar-se nas células alvo (Lange-Consiglio *et al.*, 2013). Em modelos que envolvem um infiltrado inflamatório, como na asma, fala-se na importância da secreção de fatores imunomoduladores, também chamado de efeito parácrino das MSC (Barussi *et al.*, 2016).

Para se obter respostas acerca da capacidade de imunomodulação das MSC, um protocolo bastante utilizado é o de inibição de linfócitos, uma vez que, em um ambiente inflamatório, os linfócitos T são dotados de uma grande plasticidade celular. Além da secreção de citocinas, essas células podem trafegar para locais de inflamação e mediar respostas imunes apropriadas (Wong *et al.*, 2016).

O uso das MSC na inibição de linfócitos já é bem documentado, apresentando resultados positivos e dose-dependentes em diversas fontes (Carrade *et al.*, 2012; Lange-Consiglio *et al.*, 2013; Mareschi *et al.*, 2016). Acredita-se que um dos mecanismos para esses resultados seja a regulação positiva do catabolismo do triptofano mediado pela indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), que resulta no acúmulo de quinureninas tóxicas e inibição da proliferação de células T (Meisel *et al.*, 2004). O presente estudo, utilizando BMMSC equinas, encontrou resultados positivos para inibição de linfócitos assim como nos estudos anteriores. Porém, a resposta não foi dose-dependente.

A quantidade de MSC a ser aplicada em terapias ainda gera muito debate, e alguns pesquisadores afirmam que “mais nem sempre é melhor”, principalmente quando os riscos de formação de agregados celulares e embolia são levados em consideração (Fortier e Travis, 2011; Cui *et al.*, 2015). Sendo assim, pode ser interpretada como positiva a observação de que mesmo doses mais baixas de MSC possuíram efeito imunomodulador.

Com o crescente interesse pelo secretoma das MSC (meio condicionado, exossomos e microvesículas) e sua ação por mecanismos parácrinos, pesquisadores vêm reproduzindo estudos que antes eram feitos

apenas com as células, com seus metabólitos. Dois estudos com CM derivado de MSC murinas não resultaram em inibição de linfócitos (Augello *et al.*, 2005; Kay *et al.*, 2017). Já no estudo com CM derivado de MSC equinas isoladas da membrana amniótica, houve inibição na proliferação de linfócitos de maneira dose-dependente (Lange-Consiglio *et al.*, 2013). O presente estudo demonstrou a capacidade antiproliferativa do CM derivado de BMMSC equinas, porém de maneira não dose-dependente. Uma vez que o presente estudo demonstrou inibição de linfócitos tanto para as BMMSC, quanto para o CM, os resultados sugerem que o contato celular não foi necessário para a ação inibitória das BMMSC e que as moléculas secretadas foram responsáveis pelos efeitos antiproliferativos observados.

O uso do CM como uma terapia livre de células apresenta algumas vantagens em relação ao uso das MSC. Sua obtenção pode ser realizada em maiores quantidades, reduzindo a variabilidade entre doadores; possibilita melhor disponibilidade do material biológico; e ainda permite sua administração com segurança por injeção intravenosa, evitando a formação de agregados celulares e aprisionamento em capilares (Cargnoni *et al.*, 2012). Além disso, já se entende que as MSC precisam ser ativadas por citocinas pró-inflamatórias presentes no microambiente, a fim de exibir seus efeitos imunomoduladores (Del Fattore *et al.*, 2015). Nesse sentido, como o CM e seus componentes não são células vivas, e sim produtos celulares que transportam sinais parácrinos específicos, pode-se esperar que os efeitos imunomoduladores sejam menos dependentes do microambiente e, portanto, mais previsíveis.

## 2.5 CONCLUSÃO

O conjunto de técnicas utilizadas no presente estudo foi efetivo em caracterizar e atestar a qualidade das BMMSC equinas. Por outro lado, em relação à caracterização imunofenotípica, outros anticorpos ainda podem ser testados para melhorar a caracterização das MSC equinas. O uso mais frequente da caracterização das MSC equinas certamente estimulará as empresas a produzir anticorpos espécie-específicos. Vale ressaltar que o investimento no controle de qualidade é benéfico e essencial para o desenvolvimento de tecnologias que apresentem resultados homogêneos no tratamento dos animais.

Ambos os protocolos terapêuticos demonstraram capacidade de inibir a proliferação de linfócitos, e estudos mais aprofundados na caracterização dos fatores solúveis presentes no CM podem colaborar com seu uso terapêutico para doenças inflamatórias.

## 2.6 REFERÊNCIAS

Alizadeh, A. H., Briahe, R., Villagomez, D. A., King, W. A., & Koch, T. G. (2018). Cell Identity, Proliferation, and Cytogenetic Assessment of Equine Umbilical Cord Blood Mesenchymal Stromal Cells. *Stem cells and development*, 27(24), 1729-1738.

Augello, A., Tasso, R., Negrini, S. M., Amateis, A., Indiveri, F., Cancedda, R., & Pennesi, G. (2005). Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *European journal of immunology*, 35(5), 1482-1490.

Barberini, D. J., Freitas, N. P. P., Magnoni, M. S., Maia, L., Listoni, A. J., Heckler, M. C., Sudano, M. J., Golim, M. A., Landim-Alvarenga, F. C., & Amorim, R. M. (2014). Equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue and umbilical cord: immunophenotypic characterization and differentiation potential. *Stem cell research & therapy*, 5(1), 25.

Barussi, F. C., Bastos, F. Z., Leite, L. M., Fragoso, F. Y., Senegaglia, A. C., Brofman, P. R., Nishiyama, A., Pimpao, C. T., & Michelotto Jr, P. V. (2016). Intratracheal therapy with autologous bone marrow-derived mononuclear cells reduces airway inflammation in horses with recurrent airway obstruction. *Respiratory physiology & neurobiology*, 232, 35-42.

Bastos, F. Z., Barussi, F. C., Santi, T. F., Vieira, B. P., Senegaglia, A. C., Cruz, F. F., & Michelotto Jr, P. V. (2017). Collection, processing and freezing of equine bone marrow cells. *Cryobiology*, 78, 95-100.

Borgonovo, T., Vaz, I. M., Senegaglia, A. C., Rebelatto, C. L. K., & Brofman, P. R. S. (2014). Genetic evaluation of mesenchymal stem cells by G-banded karyotyping in a Cell Technology Center. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia*, 36(3), 202-207.

Boyum, A. (1964). Separation of white blood cells. *Nature*, 204, 793–794.

Buckland, R. A., Fletcher, J. M., & Chandley, A. C. (1976). Characterization of the domestic horse (*Equus caballus*) karyotype using G-and C-banding techniques. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 32(9), 1146-1149.

Cargnoni, A., Ressel, L., Rossi, D., Poli, A., Arienti, D., Lombardi, G., & Parolini, O. (2012). Conditioned medium from amniotic mesenchymal tissue cells reduces progression of bleomycin-induced lung fibrosis. *Cytotherapy*, 14(2), 153-161.

Carrade, D. D., Lame, M. W., Kent, M. S., Clark, K. C., Walker, N. J., & Borjesson, D. L. (2012). Comparative analysis of the immunomodulatory properties of equine adult-derived mesenchymal stem cells. *Cell medicine*, 4(1), 1-11.

Cui, L. L., Kerkelä, E., Bakreen, A., Nitzsche, F., Andrzejewska, A., Nowakowski, A., Janowski, M., Walczak, P., Boltze, J., Lukomska, B., & Jolkkonen, J. (2015). The cerebral embolism evoked by intra-arterial delivery of allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells in rats is related to cell dose and infusion velocity. *Stem cell research & therapy*, 6(1), 11.

Del Fattore, A., Luciano, R., Pascucci, L., Goffredo, B. M., Giorda, E., Scapatucci, M., Fierabracci, A., & Muraca, M. (2015). Immunoregulatory effects of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles on T lymphocytes. *Cell transplantation*, 24(12), 2615-2627.

De Schauwer, C., Meyer, E., Van de Walle, G. R., & Van Soom, A. (2011). Markers of stemness in equine mesenchymal stem cells: a plea for uniformity. *Theriogenology*, *75*(8), 1431-1443.

De Schauwer, C., Piepers, S., Van de Walle, G. R., Demeyere, K., Hoogewijs, M. K., Govaere, J. L., Braeckmans, K., Van Soom, A., & Meyer, E. (2012). In search for cross-reactivity to immunophenotype equine mesenchymal stromal cells by multicolor flow cytometry. *Cytometry part A*, *81*(4), 312-323.

Dominici, M. L. B. K., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J., & Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, *8*(4), 315-317.

Fortier, L. A., & Travis, A. J. (2011). Stem cells in veterinary medicine. *Stem cell research & therapy*, *2*(1), 9-15.

Jacobs, M. R., Good, C. E., Fox, R. M., Roman, K. P., & Lazarus, H. M. (2013). Microbial contamination of hematopoietic progenitor and other regenerative cells used in transplantation and regenerative medicine. *Transfusion*, *53*(11), 2690-2696.

Kasashima, Y., Ueno, T., Tomita, A., Goodship, A. E., & Smith, R. K. W. (2011). Optimisation of bone marrow aspiration from the equine sternum for the safe recovery of mesenchymal stem cells. *Equine Veterinary Journal*, *43*, 288-294.

Kay, A. G., Long, G., Tyler, G., Stefan, A., Broadfoot, S. J., Piccinini, A. M., Middleton, J., & Kehoe, O. (2017). Mesenchymal stem cell-conditioned medium reduces disease severity and immune responses in inflammatory arthritis. *Scientific reports*, *7*(1), 18019.

Lange-Consiglio, A., Rossi, D., Tassan, S., Perego, R., Cremonesi, F., & Parolini, O. (2013). Conditioned medium from horse amniotic membrane-derived multipotent progenitor cells: immunomodulatory activity in vitro and first clinical application in tendon and ligament injuries in vivo. *Stem cells and development*, 22(22), 3015-3024.

Maia, L., Landim-Alvarenga, F. C., Da Mota, L. S. S., De Assis Golim, M., Laufer-Amorim, R., De Vita, B., Barberini, D. J., Listoni, A. J., De Moares, C. N., Heckler, M. C. T., & Amorim, R. M. (2013). Immunophenotypic, immunocytochemistry, ultrastructural, and cytogenetic characterization of mesenchymal stem cells from equine bone marrow. *Microscopy research and technique*, 76(6), 618-624.

Mareschi, K., Castiglia, S., Sanavio, F., Rustichelli, D., Muraro, M., Defedele, D., Bergallo, M., & Fagioli, F. (2016). Immunoregulatory effects on T lymphocytes by human mesenchymal stromal cells isolated from bone marrow, amniotic fluid, and placenta. *Experimental hematology*, 44(2), 138-150.

Martinello, T., Bronzini, I., Maccatrozzo, L., Iacopetti, I., Sampaolesi, M., Mascarello, F., & Patrino, M. (2010). Cryopreservation does not affect the stem characteristics of multipotent cells isolated from equine peripheral blood. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 16(4), 771-781.

Meisel, R., Zibert, A., Laryea, M., Göbel, U., Däubener, W., & Dilloo, D. (2004). Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2, 3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood*, 103(12), 4619-4621.

Paebst, F., Piehler, D., Brehm, W., Heller, S., Schroeck, C., Tárnok, A., & Burk, J. (2014). Comparative immunophenotyping of equine multipotent mesenchymal stromal cells: an approach toward a standardized definition. *Cytometry Part A*, 85(8), 678-687.

Ranera, B., Lyahyai, J., Romero, A., Vázquez, F. J., Remacha, A. R., Bernal, M. L., Zaragoza, P., Rodellar, C., & Martín-Burriel, I. (2011). Immunophenotype and gene expression profiles of cell surface markers of mesenchymal stem cells derived from equine bone marrow and adipose tissue. *Veterinary immunology and immunopathology*, *144*(1-2), 147-154.

Rebelatto, C. K., Aguiar, A. M., Moretao, M. P., Senegaglia, A. C., Hansen, P., Barchiki, F., Oliveira, J., Martins, J., Kuligovski, C., Mansur, F., Christofis, A., Amaral, V. F., Brofman, P. S., Goldenberg, S., Nakao, L. S., & Correa, A. (2008). Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. *Experimental Biology and Medicine*, *233*(7), 901-913.

Schnabel, L. V., Fortier, L. A., McIlwraith, C. W., & Nobert, K. M. (2013). Therapeutic use of stem cells in horses: which type, how, and when?. *The veterinary journal*, *197*(3), 570-577.

Xie, L., Zhang, N., Marsano, A., Vunjak-Novakovic, G., Zhang, Y., & Lopez, M. J. (2013). In vitro mesenchymal trilineage differentiation and extracellular matrix production by adipose and bone marrow derived adult equine multipotent stromal cells on a collagen scaffold. *Stem Cell Reviews and Reports*, *9*(6), 858-872.

Wong, M. T., Ong, D. E. H., Lim, F. S. H., Teng, K. W. W., McGovern, N., Narayanan, S., ... & Tan, B. K. (2016). A high-dimensional atlas of human T cell diversity reveals tissue-specific trafficking and cytokine signatures. *Immunity*, *45*(2), 442-456.

## CAPÍTULO 3

### EFEITOS DAS CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS EQUINAS EM FRAGMENTOS DE PULMÃO DE CAMUNDONGO ESTIMULADOS COM LIPOPOLISSACARÍDEO OU ZYMOBAN

*(Effects of equine mesenchymal stromal cells in mouse precision-cut lung slices stimulated with lipopolysaccharide or zymosan)*

#### RESUMO

**Introdução:** O uso de fragmentos de pulmão (*lung slices*) permite o estudo *ex vivo* dos pulmões, mantendo suas funções de contração e interações celulares. **Objetivo:** Investigar se a incubação dos fragmentos de pulmão de camundongos com lipopolissacarídeo (LPS) ou zymosan levaria à uma reação de hiperresponsividade e avaliar a secreção de TNF- $\alpha$  pelos fragmentos estimulados com LPS ou zymosan e tratados com dexametasona ou células estromais mesenquimais equinas. **Metodologia:** Foram utilizados cinco camundongos para a obtenção dos fragmentos de pulmão e o estudo foi dividido em três experimentos. O experimento 1 analisou se a incubação dos fragmentos de pulmão por quatro horas com zymosan (100  $\mu\text{g/mL}$ ) ou LPS (10  $\mu\text{g/mL}$ ) causaria contração bronquial dependente do tempo. O experimento 2 analisou se a incubação dos fragmentos de pulmão por 15 horas com zymosan ou LPS causaria uma hiperresponsividade a diferentes concentrações de metacolina (MCh – 10, 30, 100, 300, 1000 e 3000 nM). O experimento 3 mensurou a secreção de TNF- $\alpha$  no sobrenadante dos poços onde os fragmentos de pulmão foram incubados por 15 horas com estímulo de zymosan ou LPS, e simultaneamente tratados com dexametasona (100 nM) ou células estromais mesenquimais equinas derivadas de medula óssea (BMMSC –  $1 \times 10^5$ ) e de tecido adiposo (ADMSC –  $1 \times 10^5$ ). **Resultados:** Não foram observadas diferenças na contração bronquial após estímulo com LPS ou zymosan por 4 e 15 horas, nem frente as diferentes concentrações de MCh avaliadas. No experimento 3, a incubação dos fragmentos de pulmão com LPS e com zymosan aumentou a secreção de TNF- $\alpha$  ( $p = 0,016$ ). O tratamento com BMMSC após estímulo com zymosan aumentou ainda mais a secreção de TNF- $\alpha$  ( $p = 0,032$ ), enquanto que o tratamento com dexametasona após estímulo com LPS reduziu a secreção de TNF- $\alpha$  ( $p = 0,008$ ). **Conclusão:** Os estímulos com LPS ou com zymosan não causaram hiperresponsividade das vias aéreas no modelo estudado. Tanto LPS, quanto zymosan, aumentaram os níveis de TNF- $\alpha$  em fragmentos de pulmão, indicando que o modelo pode ser usado como ferramenta para avaliar a imunomodulação das células

residentes no pulmão. Já os resultados para secreção de TNF- $\alpha$  após tratamento com BMMSC indicam a importância do microambiente para o efeito imunomodulador da terapia celular.

**Palavras-chave:** broncoconstrição; citocina; *lung slices*; metacolina; terapia celular; vias aéreas.

### 3.1 INTRODUÇÃO

A asma é uma doença respiratória crônica muito comum que se tornou um sério problema de saúde pública mundial. A doença é caracterizada por inflamação nas vias aéreas, episódios de falta de ar, tosse e broncoconstrição exagerada da musculatura lisa à vários estímulos, chamada de hiperresponsividade (Bateman *et al.*, 2008; Nair *et al.*, 2017).

Dada a importância da musculatura lisa das vias aéreas na fisiopatologia da asma, a utilização de fragmentos de pulmão (*lung slices*) foi estabelecida com sucesso para estudos da fisiologia, patologia e farmacologia da doença (Liberati *et al.*, 2010). Essa técnica permite o estudo *ex vivo* do pulmão, mantendo funções de contração e interações celulares (Bergner e Sanderson, 2004; Liberati *et al.*, 2010; Donovan *et al.*, 2015).

Alguns estudos com fragmentos de pulmão de diferentes espécies têm buscado respostas sobre a influência de diferentes estímulos envolvidos na exacerbação da inflamação pulmonar, secreção de citocinas inflamatórias e possível hiperresponsividade das vias aéreas (Donovan *et al.*, 2015; Calzetta *et al.*, 2018). O estímulo mais comumente utilizado é o lipopolissacarídeo (LPS) e alguns estudos já relataram o aumento na secreção de fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina (IL) 1 beta, IL-5, entre outras (Henjakovic *et al.*, 2008; Donovan *et al.*, 2015). Contudo, reações de hiperresponsividade ainda não estão bem determinadas e resultados discrepantes podem ser encontrados na literatura. Por exemplo, o estudo de Donovan *et al.* (2015) utilizou fragmentos de pulmão de camundongos, incubados com LPS por até 48 horas, e não encontrou diferença na contração em resposta à metacolina, em comparação ao controle. Já Calzetta *et al.* (2018) utilizou tecido bronquial de cavalos em um protocolo similar ao de fragmentos de pulmão e encontrou hiperresponsividade das vias aéreas frente ao LPS. Além do LPS, outro

estímulo que pode ser utilizado para estudar as reações de hiperresponsividade e exacerbação da asma é o zymosan, preparado a partir da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*.

O cavalo pode ser considerado modelo para o estudo da asma, o que vem sendo defendido em diferentes estudos (Bond *et al.*, 2018). O cavalo desenvolve o quadro de asma naturalmente, com características muito semelhantes à doença em humanos. Além disso, animais de grande porte apresentam vantagens fisiológicas em relação ao uso de roedores, e possuem o sistema imunológico mais próximo do humano. Todas essas características possibilitam o estudo da asma em diferentes momentos e condições, para o entendimento dos mecanismos fisiopatológicos e da resposta a tratamentos propostos (Leclere *et al.*, 2011; Bullone e Lavoie, 2015; Bond *et al.*, 2018).

A terapêutica da asma em equinos não difere do que é preconizado em humanos, e os corticosteroides constituem a principal terapia (Bullone e Lavoie, 2015; Lavoie *et al.*, 2018). O uso de corticosteroides em cavalos e em humanos pode resultar em reações adversas, além de refratariedade ao tratamento (Barnes, 2013). Assim, a terapia celular é uma opção para o tratamento da asma, com resultados positivos demonstrados em camundongos (Dai *et al.*, 2017) e em cavalos (Barussi *et al.*, 2016). A terapia com células-tronco pode reduzir o nível de citocinas inflamatórias secretadas por macrófagos (Xu *et al.*, 2007), modulando a resposta imunológica das células no pulmão (Abreu *et al.*, 2011).

Contudo, hipotetizou-se que o zymosan pode causar maior reação de contração bronquial do que o LPS e que a terapia celular apresenta efeito anti-inflamatório semelhante ao da dexametasona. Sendo assim, o presente estudo buscou investigar: 1) Se a incubação dos fragmentos de pulmão de camundongos com LPS ou zymosan causaria uma contração bronquial dependente do tempo; 2) Se a incubação prolongada dos fragmentos de pulmão de camundongos com LPS ou zymosan levaria à uma hiperresponsividade à metacolina; e 3) Qual a capacidade anti-inflamatória do tratamento com dexametasona ou células estromais mesenquimais (MSC) equinas, avaliada pela secreção de TNF- $\alpha$  pelos fragmentos de pulmão de camundongos estimulados com LPS ou zymosan.

## 3.2 METODOLOGIA

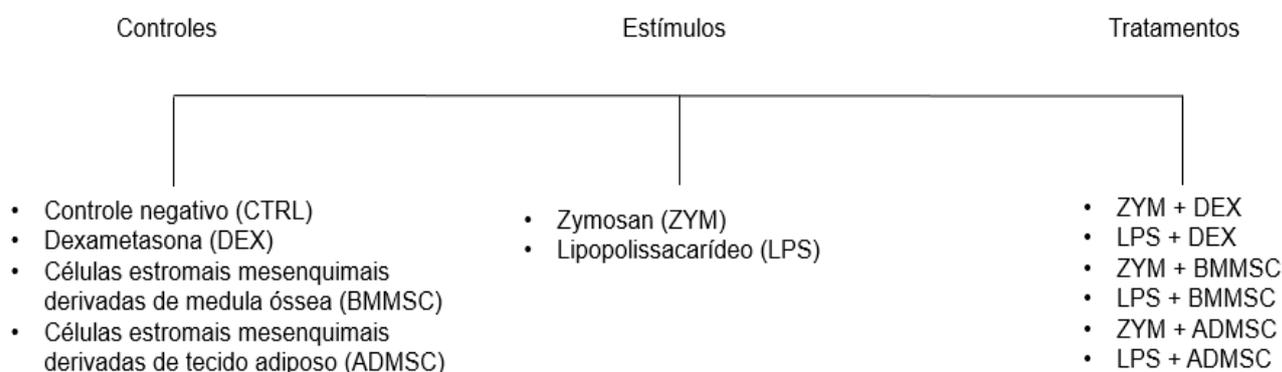
### 3.2.1 Delineamento do estudo

O presente estudo apresenta-se como um estudo experimental *ex vivo*, comparativo, dividido em três experimentos.

O primeiro experimento investigou se o estímulo dos fragmentos de pulmão por quatro horas com zymosan (ZYM) ou LPS resultaria em uma contração bronquial dependente do tempo.

O segundo experimento estudou a contração bronquial provocada por metacolina (MCh), em fragmentos de pulmão incubados por 15 horas com dois estímulos: LPS e ZYM.

O terceiro experimento analisou a secreção de TNF- $\alpha$  no sobrenadante dos poços onde os fragmentos de pulmão foram incubados por 15 horas em 12 situações diferentes, gerando 12 grupos (figura 1).



**Figura 1** – Delineamento dos 12 grupos analisados no experimento de secreção de TNF- $\alpha$  em fragmentos de pulmão de camundongo.

### 3.2.2 Animais

O estudo fez parte de um projeto mais abrangente aprovado no comitê de ética da Monash University (Campus Clayton South, Victoria, Austrália) sob o registro MARP/2018/18.

Foram utilizados cinco camundongos C57BL/6 *naive*, machos, com seis a oito semanas de idade.

### 3.2.3 Obtenção dos fragmentos de pulmão (*lung slices*)

Os animais foram eutanasiados com injeção intraperitoneal de 0,3 mL de pentobarbital sódico (Lethobarb, Virbac, Melbourne, Austrália) e imediatamente dissecados para exposição da traqueia e pulmões. Os procedimentos a seguir foram realizados conforme Donovan *et al.* (2015). A traqueia foi canulada com um cateter bifurcado de calibre 20G (Intima, BD, San Diego, Estados Unidos) e, então, preencheu-se os pulmões com 1,5 mL de solução aquecida de agarose 2% (UltraPure Low Melting Point Agarose, Invitrogen, Califórnia, Estados Unidos) em solução salina balanceada de Hanks (HBSS, Gibco, Nova York, Estados Unidos) suplementada com 40 mM de HEPES (Gibco, Nova York, Estados Unidos). Em seguida, adicionou-se 0,5 mL de ar para que a agarose atingisse todas as ramificações dos pulmões. A agarose foi solidificada em câmara fria a 4°C, por 20 minutos. Após esse período, os pulmões foram retirados da cavidade torácica dos camundongos e o lobo caudal do pulmão direito foi montado no vibratoma (Compresstome, Precisionary Instruments, Carolina do Norte, Estados Unidos). Os fragmentos foram cortados com espessura de 200 µm e mantidos em HBSS gelado até a preparação das placas para cada estudo, ainda no mesmo dia da obtenção (figura 2).



**Figura 2** – Fragmentos com 200 µm de espessura do pulmão direito de um camundongo avaliado.

### 3.2.4 Cultivo de células estromais mesenquimais equinas

As MSC equinas utilizadas no estudo foram cedidas pela University of Melbourne, Austrália. Um equino macho adulto foi o doador da medula óssea e do tecido adiposo para o isolamento das MSC. Um frasco de cultura celular de 75 cm<sup>2</sup>, confluyente, de cada uma das fontes, foi transportado em caixa térmica da University of Melbourne até a Monash University, distantes 25 km.

Logo que os frascos chegaram ao laboratório, foi realizada a primeira passagem das células para manter as culturas. Para isso, seguindo protocolo adaptado de Rebelatto *et al.* (2008), tanto para as MSC derivadas de medula óssea (BMMSC), quanto para as MSC derivadas de tecido adiposo (ADMSC), realizou-se a dissociação das células com a adição de tripsina-ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 0,25% (Gibco, Nova York, Estados Unidos). Os frascos foram colocados na estufa a 37°C por 5 minutos, e para cessar a atividade da tripsina, utilizou-se 0,5 mL de soro bovino fetal (SBF, Gibco, Nova York, Estados Unidos) e 5 mL de meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Gibco, Nova York, Estados Unidos). O conteúdo final foi coletado em tubos cônicos graduados para centrifugação (Sarstedt, Nümbrecht, Alemanha), os quais foram centrifugados por 10 minutos a 400 g, em temperatura ambiente, com freio e aceleração. O concentrado de células foi ressuspenso em 1 mL de meio DMEM, prosseguindo-se com a contagem de células em câmara de Neubauer (Boeco, Hamburgo, Alemanha). As células foram semeadas em novos frascos de 75 cm<sup>2</sup> (TPP, Trasadingen, Suíça), na densidade de 1 x 10<sup>4</sup> células/cm<sup>2</sup> e foram mantidos em incubadora a 37°C, com atmosfera a 5% de CO<sub>2</sub>.

As trocas de meio e passagens subsequentes seguiram o mesmo protocolo, até que as células estivessem confluentes na terceira passagem (P3), quando, então, foram dissociadas utilizando tripsina-EDTA, ressuspenso em meio DMEM na concentração de 1 x 10<sup>5</sup> células/mL e mantidas em gelo até sua utilização nos ensaios com os fragmentos de pulmão.

### **3.2.5 Contração bronquial dependente do tempo (experimento 1)**

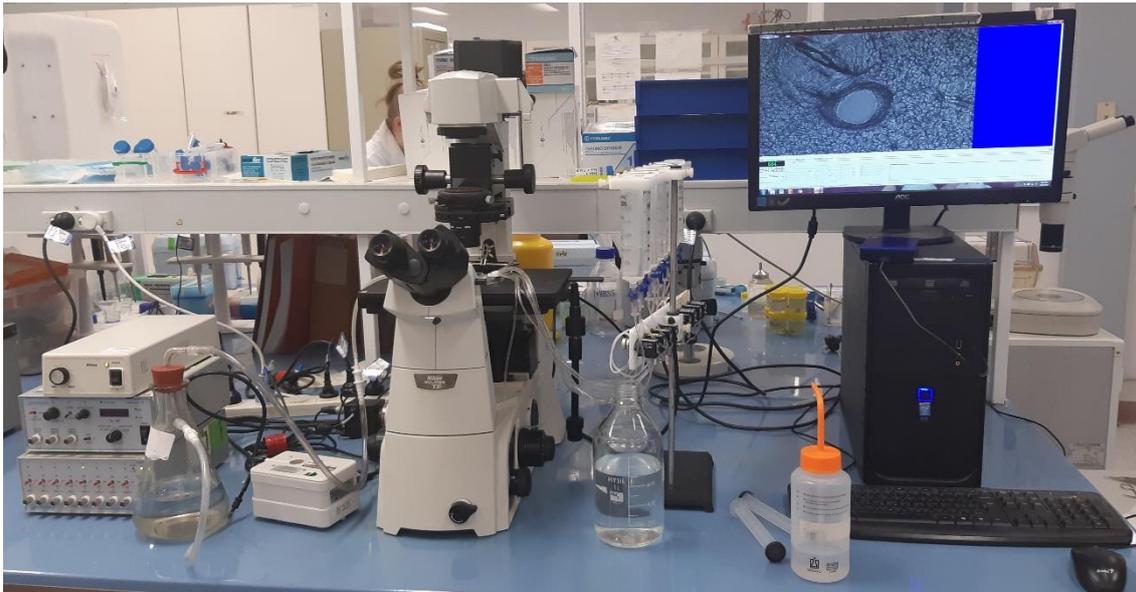
Para analisar se o contato direto por quatro horas com LPS ou zymosan causa contração nas vias aéreas, ou altera a sensibilidade para a MCh, realizou-se o ensaio de contração bronquial dependente do tempo. Os fragmentos de pulmão dos cinco camundongos foram colocados em placa de 24 poços (TPP, Trasadingen, Suíça), sendo uma unidade por poço e em triplicata para cada animal (um fragmento para posterior estímulo com LPS, outro para zymosan e um controle negativo). Adicionou-se, então, 1 mL de meio DMEM suplementado com 1% de penicilina e estreptomicina (Pen Strep, Gibco, Nova York, Estados Unidos), e a placa foi incubada por 15 horas a 37°C, com atmosfera a 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>).

Após o período de incubação, os fragmentos de pulmão foram preparados individualmente nas câmaras de perfusão (figura 3). Cada câmara foi montada com uma lamínula de 45 x 50 mm, sobre a qual foi colocado o fragmento coberto por uma malha de nylon com uma abertura sobre a via aérea identificada. Criou-se um canal de perfusão com silicone e uma lamínula de 11 x 30 mm. A câmara foi analisada com microscopia de contraste em microscópio invertido (Eclipse Ti-U, Nikon Instruments Inc., Nova York, Estados Unidos), lente objetiva de 10 x e câmera CCD (modelo TM-62EX, Pulnix, Jai, Japão), selecionando-se uma via aérea. Buscaram-se vias aéreas de aproximadamente 300 µm de diâmetro e com atividade ciliar para atestar a viabilidade.



**Figura 3** – Foto da câmara de perfusão montada com um fragmento de pulmão (*lung slice*) de camundongo do estudo. O colchete azul indica o canal de perfusão formado pelo silicone, e o quadrado verde evidencia o fragmento de pulmão preso com a malha de nylon.

Ainda com as câmaras acopladas ao microscópio, realizou-se uma curva de contração bronquial com MCh, visando atestar a viabilidade do fragmento de pulmão em estudo (mínimo de 30% de contração da área inicial para a maior concentração de MCh). Usando um sistema alimentado por gravidade (figura 4), as câmaras foram inicialmente perfundidas com HBSS por cinco minutos e, em seguida, iniciou-se a perfusão de MCh em concentrações crescentes de 10 a 3000 nM (10, 30, 100, 300, 1000 e 3000 nM), sendo cinco minutos de perfusão para cada concentração. A curva foi finalizada com nova perfusão com HBSS por cinco minutos, totalizando 40 minutos de perfusão. As imagens foram adquiridas a cada dois segundos (0,5 Hz) utilizando o software de imagem VideoSavant (IO Industries Inc., Ontário, Canadá), e a sequência de imagens foi armazenada em formato TIFF.



**Figura 4** – Sistema de perfusão utilizado para as curvas de contração bronquial com metacolina. O sistema é composto por um microscópio invertido com câmera ligada ao computador; seringas com concentrações crescentes de metacolina, que são acionadas por uma fonte e gotejam na câmara de perfusão por ação da gravidade; bomba de vácuo, que cria um sistema de perfusão contínuo; e software de imagem VideoSavant, que captura as imagens.

Para avaliar a contração bronquial dependente do tempo em resposta aos estímulos, as câmaras foram retiradas do sistema de perfusão e adicionou-se 400  $\mu\text{L}$  de solução de zymosan (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos) a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (grupo ZYM,  $n = 5$ ) ou 400  $\mu\text{L}$  de solução de LPS (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos) a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (grupo LPS,  $n = 5$ ). Uma câmara de cada animal foi mantida apenas com HBSS para servir de controle (grupo CTRL,  $n = 5$ ). Uma imagem foi capturada para representar o momento inicial, e depois foram feitas capturas com uma, duas, três e quatro horas.

Ao final das quatro horas de incubação, foi realizada nova curva de contração bronquial com MCh, repetindo o protocolo da primeira, a fim de verificar se o fragmento de pulmão continuava com no mínimo 30% de contratilidade, ou se as quatro horas em contato com os estímulos havia alterado sua resposta à MCh.

Todas as imagens capturadas neste ensaio foram guardadas para posterior análise, apresentada no tópico 3.2.8.

### 3.2.6 Contração bronquial provocada por metacolina (experimento 2)

Para o experimento de contração das vias aéreas por MCh, os fragmentos de pulmão dos cinco camundongos foram colocados em placas de 24 poços, com uma unidade por poço e em duplicata para cada grupo. Adicionou-se, então, 1 mL de meio DMEM suplementado com 1% de penicilina e estreptomicina, além dos tratamentos conforme o quadro 1.

**Quadro 1** – Descrição dos diferentes tratamentos para cada um dos grupos no experimento de contração bronquial provocada por metacolina.

Grupo	Sigla	Número amostral	Tratamento	Volume final (µL)
Controle	CTRL	5	100 µL de meio DMEM	100
Zymosan	ZYM	5	10 µL de ZYM (100 µg/mL) + 90 µL de meio DMEM	100
Lipopolissacarídeo	LPS	5	10 µL de LPS (10 µg/mL) + 90 µL de meio DMEM	100

DMEM = Meio Eagle modificado por Dulbecco.

As placas foram incubadas por 15 horas a 37°C, com atmosfera a 5% de CO<sub>2</sub>. Após o período de incubação, um fragmento de pulmão de cada grupo foi montado em câmara de perfusão conforme descrito no tópico 3.2.5 e demonstrado na figura 3. As curvas de contração bronquial com MCh foram realizadas conforme o tópico 3.2.5 e as imagens obtidas foram guardadas para posterior análise, apresentada no tópico 3.2.8.

### 3.2.7 Secreção de TNF-α (experimento 3)

Para o experimento de secreção de TNF-α, os fragmentos de pulmão dos cinco camundongos foram colocados em placas de 24 poços, com uma unidade por poço e em duplicata para cada grupo. Adicionou-se, então, 1 mL de meio DMEM suplementado com 1% de penicilina e estreptomicina, além dos tratamentos conforme o quadro 2.

**Quadro 2** – Descrição dos diferentes tratamentos para cada um dos grupos no experimento de secreção de fator de necrose tumoral alfa.

<b>Grupo</b>	<b>Sigla</b>	<b>Número amostral</b>	<b>Categoria</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Volume final (µL)</b>
Controle negativo	CTRL	5	Controle	110 µL de meio DMEM	110
Dexametasona	DEX	5	Controle	10 µL de DEX (100 nM) + 100 µL de meio DMEM	110
Células estromais mesenquimais equinas derivadas de medula óssea	BMMSC	5	Controle	100 µL da suspensão $1 \times 10^5$ BMMSC/mL + 10 µL de meio DMEM	110
Células estromais mesenquimais equinas derivadas de tecido adiposo	ADMSC	5	Controle	100 µL da suspensão $1 \times 10^5$ ADMSC/mL + 10 µL de meio DMEM	110
Zymosan	ZYM	5	Estímulo	10 µL de ZYM (100 µg/mL) + 100 µL de meio DMEM	110
Lipopolissacarídeo	LPS	5	Estímulo	10 µL de LPS (10 µg/mL) + 100 µL de meio DMEM	110
Zymosan + dexametasona	ZYM + DEX	5	Estímulo + tratamento	10 µL de ZYM (100 µg/mL) + 10 µL de DEX (100 nM) + 90 µL de meio DMEM	110
Lipopolissacarídeo + dexametasona	LPS + DEX	5	Estímulo + tratamento	10 µL de LPS (10 µg/mL) + 10 µL de DEX (100 nM) + 90 µL de meio DMEM	110
Zymozan + células estromais mesenquimais equinas derivadas de medula óssea	ZYM + BMMSC	5	Estímulo + tratamento	10 µL de ZYM (100 µg/mL) + 100 µL da suspensão $1 \times 10^5$ BMMSC/mL	110

Lipopolissacarídeo + células estromais mesenquimais equinas derivadas de medula óssea	LPS + BMMSC	5	Estímulo + tratamento	10 µL de LPS (10 µg/mL) + 100 µL da suspensão 1 x 10 <sup>5</sup> BMMSC/mL	110
Zymosan + células estromais mesenquimais equinas derivadas de tecido adiposo	ZYM + ADMSC	5	Estímulo + tratamento	10 µL de ZYM (100 µg/mL) + 100 µL da suspensão 1 x 10 <sup>5</sup> ADMSC/mL	110
Lipopolissacarídeo + células estromais mesenquimais equinas derivadas de tecido adiposo	LPS + ADMSC	5	Estímulo + tratamento	10 µL de LPS (10 µg/mL) + 100 µL da suspensão 1 x 10 <sup>5</sup> ADMSC/mL	110

DMEM = Meio Eagle modificado por Dulbecco.

As placas foram incubadas por 15 horas a 37°C, com atmosfera a 5% de CO<sub>2</sub>. Após o período de incubação, os sobrenadantes dos poços de cada grupo foram coletados em microtubos de 1,5 mL (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) e congelados a - 80°C por duas semanas.

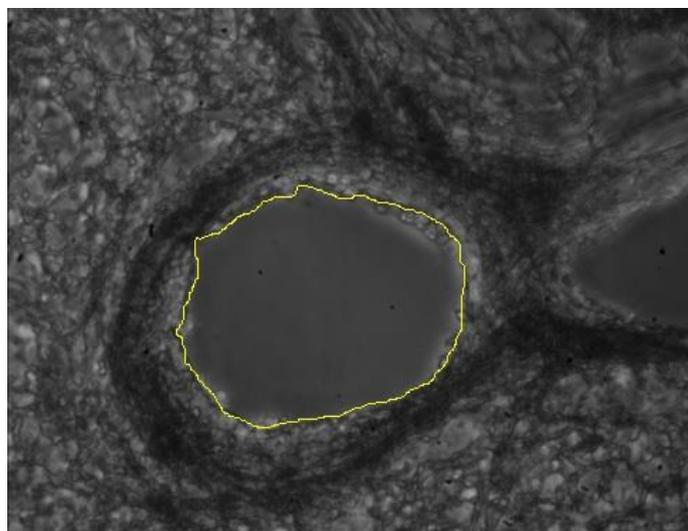
Após esse período, os sobrenadantes foram descongelados e, para a mensuração de TNF-α nas amostras, utilizou-se o kit DuoSet® ELISA mouse TNF-α (R&D Systems, Minnesota, Estados Unidos), com protocolo sugerido pelo fabricante. Duas placas de 96 poços foram preparadas com 100 µL do anticorpo de captura, sendo lavadas 18 horas depois. Após, 100 µL dos padrões do kit e 100 µL do sobrenadante de cada grupo foram pipetados em duplicata, permanecendo em temperatura ambiente por duas horas. As placas foram novamente lavadas e adicionaram-se 100 µL do anticorpo de detecção, que também permaneceu em temperatura ambiente por duas horas. Procedeu-se nova lavagem e foram adicionados 100 µL de streptavidina conjugada com *horseradish-peroxidase*. As placas foram mantidas por 20 minutos em temperatura ambiente, no escuro. Após lavagem, adicionaram-se 100 µL da solução de substrato, que foi mantida por 20 minutos em temperatura ambiente, no escuro. A reação foi cessada com a adição de 50 µL da solução de parada e a leitura das placas foi realizada imediatamente a 450 nm em leitor de placas VersaMAX ELISA (Molecular Devices, Califórnia, Estados Unidos).

Os resultados em pg/mL foram calculados a partir das médias das absorbâncias, utilizando um ajuste de curva de quatro parâmetros (4PL: Four Parameter Logistic ELISA curve fitting – [elisaanalysis.com](http://elisaanalysis.com)).

### 3.2.8 Análise das imagens

As imagens capturadas nos ensaios de contração bronquial dependente do tempo (tópico 3.2.5) e contração das vias aéreas com MCh (tópico 3.2.6) foram analisadas com o *software* ImageJ (National Institutes of Health, Maryland, Estados Unidos).

A área do lúmen da via aérea foi mensurada manualmente nas fotos para incubações de uma, duas, três e quatro horas do ensaio de contração dependente do tempo (figura 5). Já para os ensaios com curva de contração bronquial com MCh, devido ao grande número de imagens nos 40 minutos de perfusão, a área do lúmen foi calculada após ajuste de contraste na imagem, onde o *software* consegue medir automaticamente a área mais escura. Dessa maneira foi possível gerar os gráficos com as curvas de contração.



**Figura 5** – Área do lúmen de uma via aérea em fragmento de pulmão (*lung slice*) de camundongo, com seleção manual em *software* ImageJ. Aquisição em microscópio invertido com lente objetiva de 10 x.

### **3.2.9 Análise estatística**

Os resultados do ensaio de contração bronquial dependente do tempo e de secreção de TNF- $\alpha$  foram analisados com o auxílio do programa *GraphPad Prism* versão 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, Estados Unidos). Realizou-se teste de normalidade de D'Agostino e Person, onde os dados foram enquadrados como não-paramétricos. Utilizou-se, então, o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn de múltipla comparação.

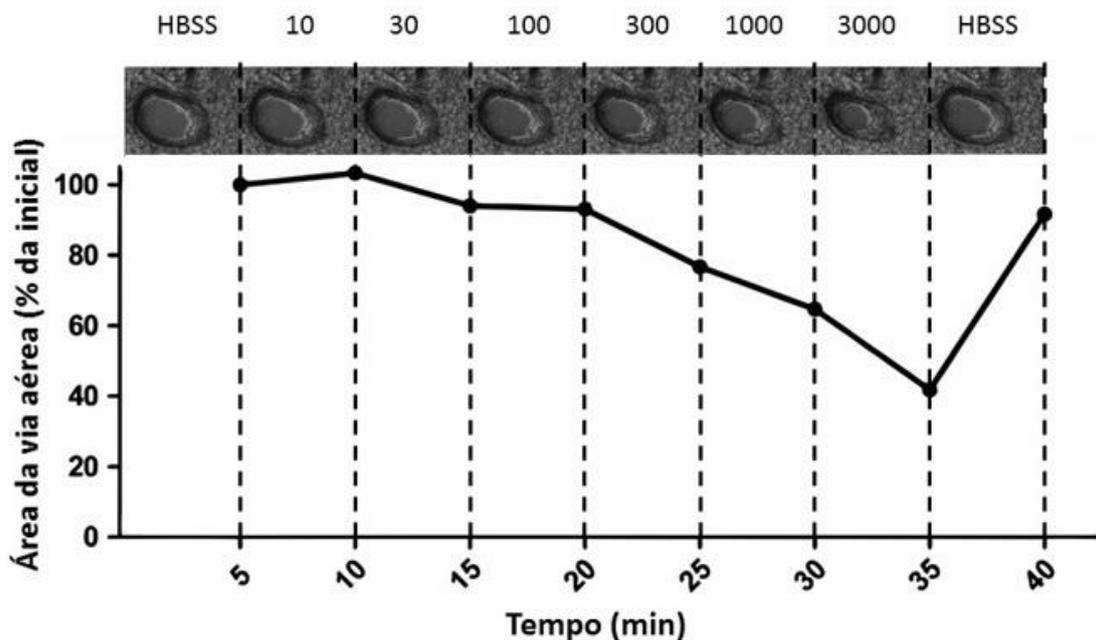
Os resultados do ensaio de contração bronquial provocada por metacolina foram analisados com o auxílio do programa *Statgraphics versão 18* (Statpoint Technologies, Inc., Virgínia, Estados Unidos), utilizando um modelo linear geral (*general linear models*) para analisar os efeitos dos tratamentos e das diferentes concentrações de MCh. Todos os valores foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão da média (SD), com nível de significância  $p < 0,05$ .

## **3.3 RESULTADOS**

### **3.3.1 Contração bronquial dependente do tempo**

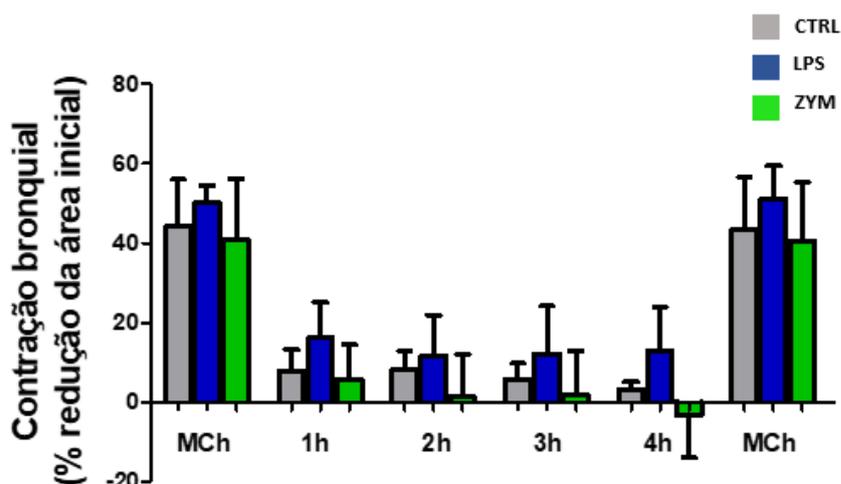
Os fragmentos de pulmão utilizados no ensaio de contração bronquial dependente do tempo tiveram média de diâmetro de  $292 \pm 155,7 \mu\text{m}$  para o grupo CTRL,  $268 \pm 67,6 \mu\text{m}$  para o grupo ZYM e  $307 \pm 112,2 \mu\text{m}$  para o grupo LPS. Estes valores não apresentaram diferença estatística entre eles.

As imagens obtidas para uma curva de contração bronquial com MCh e o gráfico resultante da análise da área de uma via aérea, estão demonstrados na figura 6.



**Figura 6** - Contração bronquial por metacolina (MCh) em fragmentos de pulmão (*lung slices*) de camundongo. Imagens representativas de uma única via aérea tomadas ao final de cada perfusão de cinco minutos com tampão (HBSS) e concentrações crescentes de MCh (10 a 3000 nM), seguidas pelo gráfico da contração como porcentagem da área inicial da via aérea.

As porcentagens de redução da área inicial para as curvas de MCh antes e depois das quatro horas de incubação, além das observações durante a incubação com os estímulos estão demonstradas na figura 7. Não foi observada diferença estatística entre a primeira e a segunda curva de MCh. Também não houve diferença entre os tempos de incubação, tampouco entre os diferentes estímulos. Observou-se, porém, uma grande variabilidade entre os valores obtidos, principalmente durante as quatro horas de incubação (Tabela 1).



**Figura 7** – Contração bronquial de fragmentos de pulmão (*lung slices*) em resposta à maior concentração de metacolina (MCh) da curva, pré e pós incubação de quatro horas em meio de cultura (CTRL), zymosan (ZYM) ou lipopolissacarídeo (LPS). Os valores durante as horas de incubação foram obtidos de uma foto da via aérea no momento correspondente. H = hora(s).

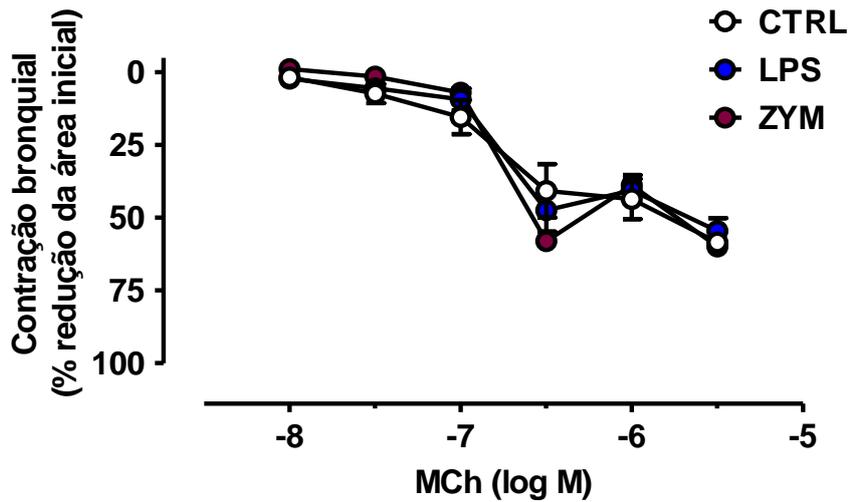
**Tabela 1** – Resultados da porcentagem de contração bronquial obtidos durante ensaio de contração dependente do tempo.

	Controle	Lipopolissacarídeo	Zymosan
<b>1ª MCh</b>	54,9 ± 11,9	50,0 ± 8,8	49,3 ± 31,0
<b>2ª MCh</b>	53,2 ± 21,4	51,1 ± 16,6	50,0 ± 27,8
<b>1 horas</b>	10,5 ± 11,4	16,2 ± 17,6	11,8 ± 15,6
<b>2 horas</b>	11,2 ± 8,8	11,7 ± 20,2	10,2 ± 14,6
<b>3 horas</b>	8,1 ± 8,0	12,1 ± 24,0	11,4 ± 13,2
<b>4 horas</b>	4,7 ± 2,3	12,9 ± 21,9	5,4 ± 15,0

Uma curva de metacolina (MCh) foi realizada antes, e outra depois da incubação por quatro horas com estímulos. Valores expressos em porcentagem como média ± desvio padrão.

### 3.3.2 Contração bronquial provocada por metacolina

Os fragmentos de pulmão utilizados no ensaio de contração bronquial provocada por MCh tiveram média de diâmetro de  $294 \pm 30,5 \mu\text{m}$  para o grupo CTRL,  $266 \pm 29,7 \mu\text{m}$  para o grupo ZYM e  $241 \pm 58,9 \mu\text{m}$  para o grupo LPS. Estes valores não apresentaram diferença estatística entre eles. Os resultados obtidos estão demonstrados na figura 8.

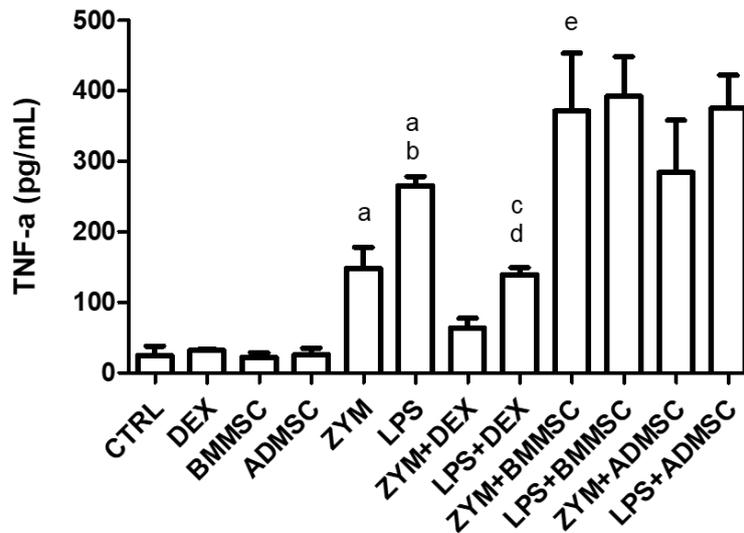


**Figura 8** – Contração bronquial de fragmentos de pulmão (*lung slices*) em resposta à diferentes concentrações de metacolina (MCh), após incubação de 15 horas em meio de cultura (CTRL), zymosan (ZYM) ou lipopolissacarídeo (LPS).

Observou-se que houve efeito das diferentes concentrações de MCh em todos os tratamentos ( $p < 0,0001$ ). Já em relação ao efeito dos tratamentos, não foram observadas diferenças entre o grupo controle e os grupos ZYM e LPS.

### 3.3.3 Secreção de TNF- $\alpha$

Os resultados do teste de ELISA para secreção de TNF- $\alpha$  estão demonstrados na figura 9.



**Figura 9** - Secreção de fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) em fragmentos de pulmão (*lung slices*) de camundongos incubados por 15 horas com estímulo de lipopolissacrídeo (LPS) ou zymosan (ZYM), e tratamento com dexametasona (DEX), células estromais mesenquimais equinas derivadas de medula óssea (BMMSC) ou células estromais mesenquimais equinas derivadas de tecido adiposo (ADMSC). <sup>a</sup>  $p=0,016$  vs. CTRL; <sup>b</sup>  $p=0,008$  vs. ZYM; <sup>c</sup>  $p=0,008$  vs. LPS; <sup>d</sup>  $p=0,019$  vs. DEX; <sup>e</sup>  $p=0,032$  vs. ZYM.

Não houve diferença significativa entre o controle negativo e os grupos controles dos tratamentos (DEX, BMMSC, ADMSC).

Quando os fragmentos de pulmão foram apenas estimulados com zymosan ou com LPS, houve aumento significativo na secreção de TNF- $\alpha$  em relação ao grupo controle (ZYM vs. CTRL:  $148 \pm 66,9$  pg/mL vs.  $24,4 \pm 27,2$  pg/mL,  $p=0,016$  e LPS vs. CTRL:  $265,7 \pm 29$  pg/mL vs.  $24,4 \pm 27,2$  pg/mL,  $p=0,016$ ). Comparando os dois estímulos, o grupo LPS apresentou uma secreção de TNF- $\alpha$  significativamente maior que o grupo ZYM ( $265,7 \pm 29$  pg/mL vs.  $148 \pm 66,9$  pg/mL,  $p=0,008$ ).

Considerando o estímulo com zymosan, os tratamentos com dexametasona (ZYM + DEX) e com ADMSC (ZYM + ADMSC) não influenciaram nos níveis de TNF- $\alpha$  de maneira significativa. Já quando tratado com as BMMSC (ZYM + BMMSC), houve aumento significativo na secreção de TNF- $\alpha$  quando comparado ao grupo ZYM ( $371,6 \pm 183,3$  pg/mL vs.  $148 \pm 66,9$  pg/mL,  $p=0,032$ ).

Já no estímulo com LPS, houve uma redução significativa na secreção de TNF- $\alpha$  quando tratado com dexametasona ( $139,6 \pm 22$  pg/mL vs.  $265,7 \pm 29$  pg/mL,  $p = 0,008$ ). Os tratamentos com BMMSC (LPS + BMMSC) e com ADMSC (LPS + ADMSC) não influenciaram nos níveis de TNF- $\alpha$  de maneira significativa. Mesmo com a redução na secreção de TNF- $\alpha$  com o tratamento de dexametasona, os níveis ainda são significativamente maiores que no grupo controle DEX ( $139,6 \pm 22$  pg/mL vs.  $32 \pm 2,6$  pg/mL,  $p = 0,019$ ).

### 3.4 DISCUSSÃO

Estudos com fragmentos de órgãos, principalmente de pulmão, vêm crescendo nas últimas décadas (Henjakovic *et al.*, 2008; Donovan *et al.*, 2015; Royce *et al.*, 2016). A principal vantagem dessa técnica é a presença de todos os tipos celulares presentes no órgão *in vivo*, em suas relações espaciais normais e com potencial para comunicação e interação intercelular (Bach *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 2019), diferentemente dos ensaios em co-cultura, que apresentam monocamadas de um ou dois tipos de células. Por outro lado, a análise de respostas dependentes do recrutamento de células fica comprometida pela ausência de circulação nesse modelo (Liberati *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2019). Os fragmentos de pulmão podem ser utilizados para se estudar a fisiologia pulmonar, farmacologia, patogênese e toxicidade (Liberati *et al.*, 2010). Com esta técnica é possível avaliar a secreção de citocinas pelas células residentes e, ao mesmo tempo, também examinar as respostas funcionais, como a broncoconstrição (Martin *et al.*, 2001), fatores muito importantes na busca por novas terapias para doenças como a asma.

Muitos estudos com fragmentos de pulmão têm investigado os efeitos diretos e indiretos do LPS na reatividade das pequenas vias aéreas, devido sua associação com doenças como a asma e a doença pulmonar obstrutiva crônica (Henjakovic *et al.*, 2008; Donovan *et al.*, 2015; Calzetta *et al.*, 2018). O presente estudo buscou investigar outra opção de estímulo, o zymosan, uma vez que os estudos apenas com LPS indicam aumento da secreção de citocinas inflamatórias, como o TNF- $\alpha$ , mas não demonstram alteração na reatividade das vias aéreas (Henjakovic *et al.*, 2008; Donovan *et al.*, 2015).

Em relação aos resultados do primeiro experimento, observou-se que tanto o estímulo com LPS, quanto com zymosan, não resultaram em uma

contração dependente do tempo, tampouco houve diferença na contração provocada pela MCh, descartando a reação de hiperresponsividade. A ausência de hiperresponsividade já havia sido relatada para o estímulo com LPS (Donovan *et al.*, 2015) e, no presente estudo, esperava-se que o estímulo com zymosan pudesse levar à outra resposta, mas não foi o que aconteceu. A ativação de um receptor tipo Toll (TLR) diferente (TLR4 para LPS e TLR2 para zymosan) poderia levar a uma resposta também diferente, a exemplo do estudo de Re e Strominger (2001), o qual relata que a ativação de células dendríticas por agonistas de TLR2 levou à secreção de fatores que favorecem uma resposta Th2. Já a ativação de células dendríticas por agonistas de TLR4 levou à secreção de fatores que favorecem uma resposta Th1.

O trabalho de Martin *et al.* (2001), realizando a incubação dos fragmentos de pulmão por quatro horas com uma combinação de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$ ; 10 ng/mL cada), resultou em uma contração das vias aéreas dependente do tempo que começou após duas horas e foi máxima após quatro horas. Levando em consideração a secreção de TNF- $\alpha$  obtida no experimento 3, após 15 horas de incubação, observa-se que a concentração é baixa em relação ao utilizado por Martin *et al.* (2001) (máximo de 0,3 ng/mL vs. 10ng/ mL, respectivamente). Além disso, IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$  não foram avaliadas no presente estudo, e apenas a associação das três, ou do TNF- $\alpha$  com a IL-1 $\beta$  causou broncoconstrição no trabalho citado. A diferença nos resultados encontrados no presente estudo em relação aos já publicados pode ser explicada pela diferente secreção de citocinas pelo estímulo com LPS ou com zymosan, além de concentrações insuficientes em uma câmara com apenas um fragmento de pulmão.

Outro fator a ser considerado é a grande variabilidade observada nos resultados para o experimento 1. Além do tamanho amostral ser pequeno, provavelmente alguma variável não foi controlada durante as análises. Uma hipótese é que a temperatura durante a incubação de quatro horas possa ter interferido, uma vez que os preparos foram realizados em diferentes dias, e as câmaras não eram mantidas em estufa durante o tempo de análise.

Em relação aos resultados do segundo experimento, a presença do efeito das diferentes concentrações de MCh em todos os tratamentos (contração dose-dependente) foi uma confirmação da técnica, uma vez que já é

um protocolo estabelecido, e os experimentos costumam usar as mesmas concentrações de MCh para a curva de contração bronquial (Donovan *et al.*, 2015; Royce *et al.*, 2016).

O estudo de Donovan *et al.* (2015) demonstrou que o LPS não induz hiperresponsividade nas vias aéreas de fragmentos de pulmão de camundongos Balb/c. O presente estudo utilizou outra linhagem de camundongo (C57BL/6) para investigar se os resultados seriam diferentes, além de testar um novo estímulo (zymosan), ainda não documentado em pesquisas anteriores. Os resultados aqui obtidos confirmaram a ausência de hiperresponsividade das vias aéreas à MCh após estímulo com LPS, mesmo com outra linhagem de camundongos. Também se observou que a resposta após estímulo com zymosan não causou hiperresponsividade. Tanto LPS, quanto zymosan, podem causar a secreção de citocinas pró-inflamatórias conhecidas por induzir hiperresponsividade *in vitro* (Henjakovic *et al.*, 2008), mas no modelo de estudo escolhido, a concentração dessas citocinas no meio onde os fragmentos ficaram incubados pode ter sido muito baixa para aumentar as respostas contráteis à MCh.

Em relação aos resultados do terceiro experimento, foi possível atestar a capacidade plástica das MSC, uma vez que o aumento na secreção de TNF- $\alpha$  pode caracterizar uma resposta pró-inflamatória, diferentemente da resposta anti-inflamatória que era esperada. As MSC, independente da fonte, possuem capacidade imunorreguladora e são capazes de influenciar tanto as respostas imunes adaptativas quanto as inatas. Além disso, são muito plásticas e podem exibir efeitos anti-inflamatórios ou pró-inflamatórios, dependendo do microambiente a que são expostas (Prockop e Oh, 2012; Bernardo e Fibbe; 2013). Como os estímulos e os tratamentos foram adicionados aos fragmentos de pulmão do presente estudo simultaneamente, as MSC encontraram um ambiente com ausência de inflamação. Na ausência de um ambiente inflamatório (baixos níveis de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ), as MSC podem adotar um fenótipo pró-inflamatório e aumentar a resposta das células T, secretando citocinas que recrutam linfócitos para locais de inflamação (Li *et al.*, 2012). Vale ressaltar que no estudo com fragmentos de pulmão não é possível analisar o recrutamento de células inflamatórias, uma vez não existe sistema circulatório.

Porém, é possível caracterizar o perfil de citocinas secretado, da mesma maneira como foi realizada a leitura de TNF- $\alpha$  no presente estudo.

Uma vez que as MSC são mais eficazes quando administradas após o início de uma resposta inflamatória, e para entender melhor a importância do ambiente inflamatório para a ação das MSC, o estudo pode ser repetido com a adição dos estímulos pelo menos quatro horas antes da adição das MSC.

A secreção de TNF- $\alpha$  por fragmentos de pulmão estimulados com LPS foi relatada por Henjakovick *et al.* (2008). O objetivo do presente estudo em utilizar estímulos de zymosan e LPS foi comparar as duas respostas, uma vez que os dois estímulos podem ser relacionados a fatores que levam à exacerbação de respostas inflamatórias nas vias aéreas. Em outros modelos de estudo, o estímulo com zymosan levou a secreção de TNF- $\alpha$  (Sato *et al.*, 2003; Wei *et al.* 2011), mas também já foi relatada a secreção de uma interleucina anti-inflamatória, a IL-10 (Wei *et al.*, 2011). O estímulo com zymosan não gerou uma secreção tão alta de TNF- $\alpha$ , diferindo significativamente do resultado obtido com LPS. Além dos possíveis mecanismos que podem influenciar essa resposta, como a ativação de diferentes TLR, outro fator que pode ser levado em consideração é a maior dificuldade de manuseio. O zymosan é um pó de difícil diluição, o que pode gerar um estímulo heterogêneo.

A capacidade anti-inflamatória da dexametasona foi confirmada com a diminuição na secreção de TNF- $\alpha$  após tratamento. Os corticoides inibem a expressão de proteínas inflamatórias, tais como as citocinas e, como consequência, o influxo de células inflamatórias (Henjakovic *et al.*, 2008). O estudo de Henjakovic *et al.* (2008) demonstrou uma diminuição na secreção de TNF- $\alpha$  de 354 pg/mL para 37 pg/mL, em fragmentos de pulmão estimulados com LPS e tratados com dexametasona. No presente estudo, a secreção de TNF- $\alpha$  caiu de  $265,7 \pm 29$  pg/mL para  $139,6 \pm 21,97$  pg/mL. Uma diminuição menor, mas significativa.

Considerando-se a resposta pró-inflamatória encontrada mesmo após o tratamento com BMMSC e ADMSC, caracterizada pela secreção mais elevada de TNF- $\alpha$  que o próprio estímulo sozinho, um novo estudo contendo a medição de citocinas anti-inflamatórias faz-se necessário. A administração *in vivo* de células mononucleares derivadas de medula óssea em equinos com asma

mostrou um aumento significativo na secreção de IL-10, diferença principal para o tratamento convencional com dexametasona (Barussi *et al.*, 2016). O estudo anteriormente citado não realizou a medição de TNF- $\alpha$ , e a secreção de IL-10 pode servir como um equilíbrio na resposta inflamatória.

### 3.5 CONCLUSÃO

No presente estudo, foi possível confirmar observações anteriores que o estímulo com LPS não causa hiperresponsividade das vias aéreas em modelo de fragmentos de pulmão, mesmo alterando-se a linhagem dos camundongos. A tentativa de um novo estímulo, o zymosan, também não alterou a curva de contração bronquial.

Além disso, tanto LPS, quanto zymosan, aumentaram os níveis de TNF- $\alpha$  em fragmentos de pulmão, indicando que o modelo pode ser usado como ferramenta para avaliar a imunomodulação das células residentes no tecido funcional, a qual foi testada com o tratamento com dexametasona e MSC. Apenas o tratamento com dexametasona mostrou capacidade anti-inflamatória e os ensaios com a terapia celular devem ser testados em novo protocolo, com a administração das MSC após instalação do quadro inflamatório.

### 3.6 REFERÊNCIAS

Abreu, S. C., Antunes, M. A., Pelosi, P., Morales, M. M., Rocco, P. R. M. (2011). Mechanisms of cellular therapy in respiratory diseases. *Critical Care Medicine*, 37, 1421-1431.

Bach, P. H., Vickers, A. E., Fisher, R., Baumann, A., Brittebo, E., Carlile, D. J., & Skibinski, G. (1996). The use of tissue slices for pharmacotoxicology studies. *ATLA-NOTTINGHAM*, 24, 893-924.

Barnes, P. J. (2013). Corticosteroid resistance in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 131(3), 636-645.

Barussi, F. C., Bastos, F. Z., Leite, L. M., Fragoso, F. Y., Senegaglia, A. C., Brofman, P. R., Nishiyama, A., Pimpao, C. T., & Michelotto Jr, P. V. (2016). Intratracheal therapy with autologous bone marrow-derived mononuclear cells reduces airway inflammation in horses with recurrent airway obstruction. *Respiratory physiology & neurobiology*, 232, 35-42.

Bateman, E. D., Hurd, S. S., Barnes, P. J., Bousquet, J., Drazen, J. M., FitzGerald, M., Gibson, P., Ohta, K., O'Byrne, P., Pedersen, S. E., Pizzichini, E., Sullivane, S. D., Wenzel, S. E., Zar, H. J. (2008). Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. *European Respiratory Journal*, 31(1), 143-178.

Bergner, A., & Sanderson, M. J. (2004). Acetylcholine-induced calcium signalling and contraction of airway smooth muscle cells in lung slices. *Journal of General Physiology*, 119, 187–198.

Bernardo, M. E., & Fibbe, W. E. (2013). Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. *Cell stem cell*, 13(4), 392-402.

Bond, S., Léguillette, R., Richard, E. A., Couetil, L., Lavoie, J. P., Martin, J. G., & Pirie, R. S. (2018). Equine asthma: Integrative biologic relevance of a recently proposed nomenclature. *Journal of veterinary internal medicine*, 32(6), 2088-2098.

Bullone, M., & Lavoie, J. P. (2015). Asthma “of horses and men”—how can equine heaves help us better understand human asthma immunopathology and its functional consequences?. *Molecular immunology*, 66(1), 97-105.

Calzetta, L., Rogliani, P., Pistocchini, E., Mattei, M., Cito, G., Alfonsi, P., Page, C., & Matera, M. G. (2018). Effect of lipopolysaccharide on the responsiveness of equine bronchial tissue. *Pulmonary pharmacology & therapeutics*, 49, 88-94.

Dai, R., Liu, J., Cai, S., Zheng, C., & Zhou, X. (2017). Delivery of adipose-derived mesenchymal stem cells attenuates airway responsiveness and

inflammation in a mouse model of ovalbumin-induced asthma. *American journal of translational research*, 9(5), 2421.

Donovan, C., Royce, S. G., Vlahos, R., & Bourke, J. E. (2015). Lipopolysaccharide does not alter small airway reactivity in mouse lung slices. *PloS one*, 10(3), e0122069.

Henjakovic, M., Martin, C., Hoymann, H. G., Sewald, K., Ressmeyer, A. R., Dassow, C., Pohlmann, G., Krug, N., Uhlig, S., & Braun, A. (2008). Ex vivo lung function measurements in precision-cut lung slices (PCLS) from chemical allergen-sensitized mice represent a suitable alternative to in vivo studies. *Toxicological sciences*, 106(2), 444-453.

Lavoie, J. P., Leclere, M., Rodrigues, N., Lemos, K. R., Bourzac, C., Lefebvre-Lavoie, J., Beauchamp, G., & Albrecht, B. (2018). Efficacy of inhaled budesonide for the treatment of severe equine asthma. *Equine veterinary journal*.

Leclere, M., Lavoie-Lamoureux, A., Lavoie, J. P. (2011). Heaves, an asthma-like disease of horses. *Respirology*, 16, 1027–1046.

Li, W., Ren, G., Huang, Y., Su, J., Han, Y., Li, J., Chen, X., Cao, K., Chen, Q., Shou, P., Zhang, L., Yuan, Z. R., Roberts, A. I., Shi, S., Le, A. D., & Shi, Y. (2012). Mesenchymal stem cells: a double-edged sword in regulating immune responses. *Cell death and differentiation*, 19(9), 1505.

Liberati, T. A., Randle, M. R., & Toth, L. A. (2010). In vitro lung slices: a powerful approach for assessment of lung pathophysiology. *Expert review of molecular diagnostics*, 10(4), 501-508.

Martin, C., Uhlig, S., & Ullrich, V. (2001). Cytokine-induced bronchoconstriction in precision-cut lung slices is dependent upon cyclooxygenase-2 and

thromboxane receptor activation. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 24(2), 139-145.

Nair, P., Martin, J. G., Cockcroft, D. C., Dolovich, M., Lemiere, C., Boulet, L. P., & O'Byrne, P. M. (2017). Airway hyperresponsiveness in asthma: measurement and clinical relevance. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, 5(3), 649-659.

Prockop, D. J., & Oh, J. Y. (2012). Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): role as guardians of inflammation. *Molecular therapy*, 20(1), 14-20.

Re, F., & Strominger, J. L. (2001). Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells. *Journal of Biological Chemistry*, 276(40), 37692-37699.

Rebelatto, C. K., Aguiar, A. M., Moretao, M. P., Senegaglia, A. C., Hansen, P., Barchiki, F., Oliveira, J., Martins, J., Kuligovski, C., Mansur, F., Christofis, A., Amaral, V. F., Brofman, P. S., Goldenberg, S., Nakao, L. S., & Correa, A. (2008). Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. *Experimental Biology and Medicine*, 233(7), 901-913.

Royce, S. G., Nold, M. F., Bui, C., Donovan, C., Lam, M., Lamanna, E., Rudloff, I., Bourke, J. E., & Nold-Petry, C. A. (2016). Airway remodeling and hyperreactivity in a model of bronchopulmonary dysplasia and their modulation by IL-1 receptor antagonist. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 55(6), 858-868.

Sato, M., Sano, H., Iwaki, D., Kudo, K., Konishi, M., Takahashi, H., Takahashi, T., Imaizumi, H., Asai, H., & Kuroki, Y. (2003). Direct binding of Toll-like receptor 2 to zymosan, and zymosan-induced NF- $\kappa$ B activation and TNF- $\alpha$  secretion are down-regulated by lung collectin surfactant protein A. *The Journal of Immunology*, 171(1), 417-425.

Wei, W. C., Su, Y. H., Chen, S. S., Sheu, J. H., & Yang, N. S. (2011). GM-CSF plays a key role in zymosan-stimulated human dendritic cells for activation of Th1 and Th17 cells. *Cytokine*, 55(1), 79-89.

Wu X., van Dijk E. M., Bos I. S. T., Kistemaker L. E. M., Gosens R. (2019) Mouse Lung Tissue Slice Culture. In: Bertoncello I. (eds) Mouse Cell Culture. Methods in Molecular Biology, vol 1940. Humana Press, New York, NY.

Xu, J., Woods, C. R., Mora, A. L., Joodi, R., Brigham, K. L., Iyer, S., Rojas, M. (2007). Prevention of endotoxin-induced systemic response by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in mice. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 293(1), 131-141.

## CAPÍTULO 4

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

#### 4.1 CAPÍTULO 1

Embora o estudo não tenha analisado a atividade celular após o descongelamento, o fato das BMMC criopreservadas terem sido utilizadas para o cultivo de BMMSC após quatro anos (capítulo 2), além do posterior ensaio de inibição de linfócitos *in vitro* (capítulo 2), comprova a viabilidade do congelamento de BMMC equinas por períodos maiores que o descrito no estudo inicial.

Pode-se realizar um novo estudo com a coleta de medula óssea com outros anticoagulantes, como o citrato de sódio, a fim de se evitar a formação de agregados celulares durante o processamento.

#### 4.2 CAPÍTULO 2

Mesmo com as dificuldades enfrentadas para caracterização de MSC equinas e montagem de cariótipo, em relação à segurança no uso destas células, os ensaios básicos de qualificação para uso terapêutico seriam: controle microbiológico, caracterização imunofenotípica, análise da viabilidade celular e avaliação cromossômica.

A análise citogenética foi dificultada pelo tamanho dos cromossomos telocêntricos e outras análises podem ser realizadas para maior segurança, como a coloração com 4',6-diamidino-2-fenilindol (*DAPI*), a técnica de citogenética molecular de hibridação *in situ* por fluorescência (*FISH*), ou até mesmo a pintura cromossômica, que consiste em *FISH* com sonda de cromossomo inteiro. Essa última técnica traria certeza na ausência de alterações cromossômicas com o cultivo das MSC, mas aumentaria significativamente os custos da análise, o que inviabilizaria sua inserção no estabelecimento de critérios para qualificação das células a serem transplantadas.

Outros anticorpos ainda podem ser testados para melhorar a caracterização das MSC de equinos. O CD45 com reatividade cruzada para

cavalos não teve o resultado consistente e uniforme como era esperado. Além do CD45, CD90 e HLA-DR também podem ser testados com outros clones.

Em relação à capacidade imunomoduladora, uma vez que BMMSC e CM se mostraram efetivos na inibição de linfócitos *in vitro*, faz-se importante a caracterização dos fatores solúveis que estão presentes no meio. Além disso, várias moléculas efetoras já foram analisadas como justificativa para a ação inibitória das MSC como: indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) em humanos e óxido nítrico em modelos murinos. A pesquisa desses fatores em MSC equinas deve fazer parte de novos estudos.

#### 4.3 CAPÍTULO 3

O uso de MSC em associação com fragmentos de pulmão é um estudo pioneiro. Os resultados do experimento 3, com o aumento na secreção de TNF- $\alpha$  pelos fragmentos de pulmão após tratamento com MSC, indicam a possibilidade de vários outros estudos. Primeiramente, a falta da análise de uma citocina anti-inflamatória (ex: IL-10), não nos permite observar se as MSC podem promover um equilíbrio na secreção de fatores pró e anti-inflamatórios. Além disso, dada a importância do microambiente para a ação das MSC, sugere-se que um novo estudo englobe diferentes tempos de incubação dos fragmentos de pulmão com o estímulo, para que só depois seja adicionado o tratamento.

## ANEXO 1

Quadro dos anticorpos monoclonais anti-humano testados para caracterização de células mononucleares derivadas de medula óssea (BMMC) e células estromais mesenquimais derivadas de medula óssea (BMMSC) de equinos:

<b>Marcador</b>	<b>Marca</b>	<b>Clone</b>	<b>BMMC (% marcada)</b>	<b>BMMSC (% marcada)</b>	<b>Parecer</b>
CD45	BD Pharmingen	HI30	3,41	0,35	reprovado
CD90	BD Pharmingen	5E10	90,80	99,70	reatividade cruzada
CD105	BD Pharmingen	266	1,92	2,03	reprovado
HLA-DR	BD Pharmingen	TU36	6,60	1,66	aprovado
CD14	BD Pharmingen	M5E2	9,19	0,25	aprovado
CD73	BD Pharmingen	AD2	8,21	0,66	reprovado
CD19	Becton Dickinson	4G7	11,45	0,17	aprovado
CD29	BD Pharmingen	MAR4	1,21	0,56	reprovado
CD166	BD Pharmingen	3A6	8,63	0,68	reprovado

Marcadores considerados positivos devem ter expressão acima de 70% e marcadores negativos devem ter expressão abaixo de 10%.

- CD45: positivo para BMMC e negativo para BMMSC;
- CD90: negativo para BMMC e positivo para BMMSC;
- CD105: negativo para BMMC e positivo para BMMSC;
- HLA-DR: negativo para BMMC e BMMSC;

- CD14: negativo para BMMC e BMMSC;
- CD73: negativo para BMMC e positivo para BMMSC;
- CD19: leitura variável entre 10 e 30% para BMMC e negativo para BMMSC;
- CD29: negativo para BMMC e positivo para BMMSC;
- CD166: negativo para BMMC e positivo para BMMSC.

Anticorpos monoclonais com reatividade cruzada para cavalo testados para caracterização de células mononucleares derivadas de medula óssea (BMMC) e células estromais mesenquimais derivadas de medula óssea (BMMSC) de equinos:

<b>Marcador</b>	<b>Marca</b>	<b>Clone</b>	<b>BMMC (% marcada)</b>	<b>BMMSC (% marcada)</b>	<b>Parecer</b>
CD45	Southern Biotech	F10-89-4	80,80	4,72	Aprovado
CD105	Invitrogen	SN6	7,98	98,17	Aprovado

No momento do estudo, não foram encontrados outros clones dos marcadores: CD90, CD73, CD29 e CD166 para teste.

## ANEXO 2

Pareceres da aprovação dos projetos na Comissão de Ética no Uso de Animais



Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Núcleo de Bioética  
Comitê de Ética no Uso de Animais

Curitiba, 06 de junho de 2013.

### PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

**REGISTRO DO PROJETO:** 788 – 1ª versão

**TÍTULO DO PROJETO:** Avaliação dos efeitos das células mononucleares derivadas de medula óssea sobre o processo inflamatório e sobre a função do macrófago alveolar em equinos com obstrução recorrente das vias aéreas

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Pedro Vicente Michelotto

**EQUIPE DE PESQUISA:**

Pedro Vicente Michelotto

**INSTITUIÇÃO:**

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

**ESCOLA / CURSO:**

Escola de Ciências Agrárias e Medicina Veterinária / Medicina Veterinária

ESPÉCIE DE ANIMAL	SEXO	IDADE / PESO	CATEGORIA	QUANTIDADE
<i>Equinos</i>	Macho / Fêmea	400kg-500kg	C	12

O colegiado do CEUA em reunião no dia 06/06/2013, avaliou o projeto e emite o seguinte parecer: **APROVADO**.

PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se houver mudança do protocolo o pesquisador deve enviar um relatório ao CEUA-PUCPR descrevendo de forma clara e sucinta, a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser



mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEUA em qualquer tempo.

Lembramos ao pesquisador que é obrigatório encaminhar o relatório anual parcial e relatório final da pesquisa a este CEUA.

Atenciosamente,



Prof.ª Marta Luciane Fischer  
Coordenadora  
Comitê de Ética no Uso de Animais





Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais

Curitiba, 19 de maio de 2016.

**PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA**

**REGISTRO DO PROJETO:** 0988/2016 – Emenda (Substituição de integrante da pesquisa no projeto 0988A)

**TÍTULO DO PROJETO:** Avaliação da influência do tempo de congelamento sobre a viabilidade de células mononucleares derivadas de medula óssea de equinos

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Pedro Vicente Michelotto Júnior

**EQUIPE DE PESQUISA:** Thasla de Freitas Saint, Bianca Pegoraro Vieira, Fernanda Zettel Bastos, Fernanda Cristina Mendes Barussi, Alexandra Cristina Senegaglia

**INSTITUIÇÃO**

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

**ESCOLA / CURSO:**

Escola de Ciências da Vida / Medicina Veterinária

<b>VIGÊNCIA DO PROJETO</b>	Ver parecer 0988A	<b>QUANTIDADE DE ANIMAIS</b>	<i>Animais liberados no parecer 0988A</i>
<b>ESPECIE/LINHAGEM</b>	<i>Equus caballus</i>	<b>Nº SISBIO</b> (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
<b>SEXO</b>	Ver parecer 0988A	<b>ATIVIDADES</b> (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
<b>IDADE / PESO</b>	Ver parecer 0988A	<b>ESPECIÉ – GRUPO TAXONÔMICOS</b> (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
<b>ORIGEM DO ANIMAL</b>	Ver parecer 0988A	<b>LOCAL (IS)</b> (Somente animais de vida livre)	Não se aplica

O colegiado do CEUA certifica que este protocolo que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794/2018 e Decreto nº 6.899/2009, e com as normas editadas pelo CONCEA e foi **APROVADO** pela CEUA - PUCPR em reunião de **19.05.2016**. Se houver mudança do protocolo o pesquisador deve enviar um relatório á CEUA descrevendo de forma clara e sucinta, a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas. Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por esta CEUA em qualquer tempo. **Lembramos ao pesquisador que é obrigatório encaminhar o relatório anual parcial e relatório final da pesquisa a esta CEUA.**

Atenciosamente,

Prof. Dra. Marta Luciane Fischer

Coordenadora - Comissão de Ética no Uso de Animais

Rua Imaculada Conceição, 1155 Prado Velho CEP 80.215-901 Curitiba Paraná Brasil  
Telefone: (41) 3271-2292 www.pucpr.br



Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais

Curitiba, 01 de Junho de 2016.

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

REGISTRO DO PROJETO: 01038/2016 – 1ª versão

TÍTULO DO PROJETO: Avaliação da segurança e do potencial imunomodulador das células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo e sua influência sobre sinais clínicos em equinos com obstrução recorrente das vias aéreas.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Pedro Vicente Micheletto Junior

EQUIPE DE PESQUISA: Fernanda Zettel Bastos, Fernanda Cristina Mendes Barussi

INSTITUIÇÃO

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

ESCOLA / CURSO:

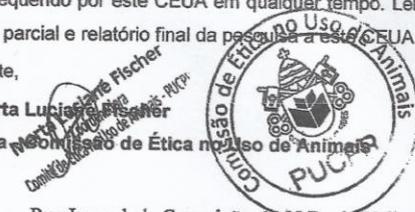
Escola de Ciências da Vida / Medicina Veterinária

VIGÊNCIA DO PROJETO	08/2016 a 07/2017	QUANTIDADE DE ANIMAIS	18
ESPECIE/LINHAGEM	<i>Equus caballus</i> (Equinos)	Nº SISBIO (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
SEXO	M/F	ATIVIDADES (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
IDADE / PESO	8 a 24 anos / 400 e 500 kg	ESPECIE – GRUPO TAXONÔMICOS (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
ORIGEM DO ANIMAL	FEGA e Regimento da Polícia Montada do Paraná.	LOCAL (IS) (Somente animais de vida livre)	Não se aplica

O colegiado do CEUA certifica que este protocolo que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794/2018 e Decreto nº 6.899/2009, e com as normas editadas pelo CONCEA e foi APROVADO pela CEUA - PUCPR em reunião de **01.06.2016**. Se houver mudança do protocolo o pesquisador deve enviar um relatório ao CEUA-PUCPR descrevendo de forma clara e sucinta, a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas. Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEUA em qualquer tempo. Lembramos ao pesquisador que é obrigatório encaminhar o relatório anual parcial e relatório final da pesquisa a este CEUA.

Atenciosamente,

Prof. Dra. Marta Luciana Fischer  
Coordenadora do Comitê de Ética no Uso de Animais



Rua Imaculada Conceição, 1155 Prado Velho CEP 80.215-901 Curitiba Paraná Brasil  
Telefone: (41) 3271-2292 www.pucpr.br

## ANEXO 3

Artigos científicos publicados durante o período do doutorado.

### Mechanisms of equine recurrent airway obstruction: changes in understanding and management

*Mecanismos da obstrução recorrente das vias aéreas dos equinos: mudanças no entendimento e na abordagem*

Fernanda Zettel Bastos, Fernanda Cristina Mendes Barussi, Cláudia Turra Pimpão, Pedro Vicente Michelotto Jr.\*

Department of Animal Science, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Curitiba, PR, Brasil

\*Autor correspondente

E-mail: p.michelotto@pucpr.br

#### Abstract

Recurrent airway obstruction (RAO) is an inflammatory and obstructive disease that is more prevalent in horses stabled for long periods. The most common clinical signs include cough, exercise intolerance, dyspnea, nasal secretion and absence of fever. The pathophysiological effects of RAO in the lungs include goblet cell metaplasia, alveolar fibrosis, neovascularization, airway wall thickening affecting all tissue layers, and bronchial smooth muscle hypertrophy. The alveolar macrophage is the main effector of particle elimination in the inflammatory process of RAO, with the ability to increase or suppress inflammatory responses. Activation of macrophages increases the release of cytokines that enhance the inflammatory reaction, such as interleukin-1, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-8, resulting in the attraction of neutrophils to the alveolar environment, which becomes the predominant cell type during periods of crisis. Although the clinical signs of RAO are well-defined, the underlying immunologic mechanisms are still being investigated. This review provides information about this disease, the understanding of which has changed over time.

**Keywords:** Chemical Mediators. Equine Asthma. Inflammatory Response. Lungs.

#### Resumo

*A Obstrução Recorrente das Vias Aéreas (ORVA) é uma doença inflamatória e obstrutiva, mais prevalente em cavalos estabulados por longos períodos. Os sinais clínicos mais comuns incluem tosse, intolerância ao exercício, dispnéia, secreção nasal e ausência de febre. A patofisiologia da doença nos pulmões inclui metaplasia de células calciformes, fibrose alveolar, neovascularização, espessamento da parede das vias aéreas afetando todas as camadas de tecido e hipertrofia do músculo liso brônquico. O macrófago alveolar é o principal efetor*

Rev. Acad. Ciênc. Anim. 2017;15:17-26



doi:10.7213/academica.15.201703  
Licenciado sob uma Licença Creative Commons



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Equine Veterinary Science

journal homepage: [www.j-evs.com](http://www.j-evs.com)

## Original Research

## Incidence of Juvenile Osteochondral Conditions in Thoroughbred Weanlings in the South of Brazil



Luís Fernando C. Bastos<sup>a</sup>, Amarildo Dubiella<sup>a</sup>, Fernanda Z. Bastos<sup>a</sup>, Fernanda C.M. Barussi<sup>a</sup>, Saulo H. Webber<sup>a</sup>, Maria Fernanda De M. Costa<sup>b</sup>, Pedro V. Michelotto Jr.<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Animal Science, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil

<sup>b</sup> Waikato Institute of Technology, CHASP, Hamilton, New Zealand

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 1 November 2016

Received in revised form 14 February 2017

Accepted 15 February 2017

Available online 24 February 2017

## Keywords:

Cartilage disease

Horse

Joint

Osteochondrosis

Radiology

## ABSTRACT

The goal of this study was to determine the occurrence of juvenile osteochondral conditions (JOCCs) in Brazilian Thoroughbred weanlings from 4 to 6 months of age. Eighty-five foals from four different stud farms were evaluated. The history and husbandry of all animals were obtained by questionnaire, and clinical examination was performed to detect lameness. Radiographic evaluations included 24 radiographic projections from eight different joints (right and left metacarpophalangeal, metatarsophalangeal, tarsocrural, and femorotibial [FT] joints), for a total of 2,040 radiographs. Twenty locations within those joints were examined, and a severity index (SI) was determined for each location. The sum of the SI values for each foal was used to determine the osteoarticular status (OAS), which was classified as good, intermediate, or poor. None of the 85 foals examined had clinical signs of lameness. Sixty-five (76.5%) foals had one or more findings related to JOCC. In total, 680 joints were examined and scored, with 20.7% affected. The FT joints were the most commonly affected ( $n = 62$ ; 9.1%). There was no significant difference in JOCC occurrence between the left and right limbs. The OAS was considered good in 38.8% ( $n = 33$ ) of the foals studied, intermediate in 48.2% ( $n = 41$ ), and poor in 12.9% ( $n = 11$ ). There were significant differences in OAS among the four stud farms.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

The horse industry is economically important, generating a large number of direct and indirect jobs. Diseases of the equine musculoskeletal system can negatively impact the ability of horses to continue training, resulting in significant economic losses [1]. Osteochondrosis (OC) is the leading cause of lameness and economic loss in the horse industry [2].

Developmental orthopedic disease (DOD) describes conditions that affect the skeleton of young horses. Despite more than 40 years of study, the etiology, pathogenesis, and

epidemiology of DOD remain unclear. Developmental orthopedic disease has been described in warmblood horse breeds [3,4], and management, exercise, weight gain, and growth in height were identified as predisposing factors [5,6]. In Thoroughbred horses, the occurrence of DOD is based on radiographs taken at large auctions [7,8].

Identification at the onset and the evolution during the endochondral ossification are key factors for understanding OC. Early identification of the incidence and prevalence is important to determine the impact of these injuries on the subsequent performance of the horse and to seek preventive or corrective interventions.

Studies by Dik et al [9] and Denoix et al [10] identified OC in young Thoroughbred, Dutch warmblood, French standardbred trotters, and Selle-Française warmblood horses. There is no information on the occurrence of OC, or predisposing factors, in Brazilian Thoroughbred weanlings.

\* Corresponding author at: Pedro V. Michelotto, Department of Animal Science, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Rua Imaculada Conceição, 1155, Prado Velho, Curitiba, Paraná 80215-901, Brazil.

E-mail address: [p.michelotto@pucpr.br](mailto:p.michelotto@pucpr.br) (P.V. Michelotto).

## Airway endoscopy and tracheal cytology of two-year-old Thoroughbred horses during the first year of race training

S.R.P. Almeida<sup>1</sup>, F.Z. Bastos<sup>1</sup>, F.C.M. Barussi<sup>1</sup>, D.A.B. Lessa<sup>2</sup>, N.X. Alencar<sup>2</sup> and P.V. Michelotto<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Animal Science, School of Life Sciences, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Rua Imaculada Conceição 1155, Curitiba, Paraná 80215901, Brazil; <sup>2</sup>School of Veterinary, Universidade Federal Fluminense, Rua Vital Brasil Filho 64, Vital Brasil, Niterói, 24230-340, Brazil; p.michelotto@pucpr.br

Received: 18 January 2018 / Accepted: 27 April 2018

© 2018 Wageningen Academic Publishers

### RESEARCH ARTICLE

#### Abstract

The immunological status of the respiratory tract is critical to racehorses' performance. Respiratory diseases in young Thoroughbred (TB) racehorses are a major concern during their early athletic career. This study investigated the airway adaptations occurring in young TB race horses during their first year of race training. Eighteen animals were evaluated at five different time points over a one-year follow-up period. A physical examination was performed, followed by airway endoscopy, in which tracheal mucus (TM) and pharyngeal lymphoid hyperplasia (PLH) were observed. Differential cytology of the tracheal wash (TW) was also performed. The physical parameters in the five assessments and TM grade did not vary. The PLH grade was lower at time-points 3 (T3) and 4 (T4) than at the initial evaluation (T0) ( $P=0.028$  and  $P=0.036$ , respectively). The cytological analysis revealed that neutrophil count decreased at T4 as compared with T0 ( $P=0.022$ ). Epithelial cell count was increased, and macrophage count decreased, at T3 and T4, compared with T0 ( $P=0.004$  and  $P=0.031$ , respectively). Haemosiderophage count was higher at T1 ( $P=0.020$ ) and lower at T2 ( $P=0.003$ ), compared to T0. A statistical correlation between mucus and all cell types was found, showing a non-specific immune response. In conclusion, young TB racehorses underwent airway modifications during the initial months of race training, and a thorough follow-up is needed during the initial period after stabling.

**Keywords:** equine, haemosiderophage, racehorse, respiratory disease

#### 1. Introduction

Respiratory diseases are a common cause of clinical complaints in equine athletes, and are the second most prevalent condition affecting two-year-old Thoroughbreds (TB) (Wilsher *et al.*, 2006). During the period that yearlings enter a new environment and commence race training, their airways experience constant antigenic challenges. This requires close clinical monitoring. The new environment can incite pulmonary inflammation during the first weeks of stabling (Ivester *et al.*, 2014) and oxidative stress (Michelotto Jr. *et al.*, 2010) associated with exercise-induced pulmonary haemorrhage (Michelotto Jr. *et al.*, 2011), after a few months of race training.

However, airway inflammation can occur in a subclinical form, even though bacteria are present in the tracheal mucus (Newton *et al.*, 2003). The investigation of airway responses to a new and pro-allergenic environment and to exercise is crucial for gaining insights into airway diseases in equine athletes (Richard and Robinson, 2016), and to facilitate appropriate management and preventative measures.

In this context, the present study aimed to observe the airway changes occurring in young TB race horses during their first year of race training, in order to understand the type and timing of these modifications, as a basis for further investigations into preventative protocols.



## Mineral supplement with pre- and probiotic improves respiratory immune status in yearling racing Thoroughbred horses: preliminary results

Pedro Vicente Michelotto Júnior<sup>1\*</sup> Fernanda Cristina Mendes Barussi<sup>1</sup> Fernanda Zettel Bastos<sup>1</sup>  
Ana Lúcia Lacerda Michelotto<sup>1</sup> Saulo Henrique Weber<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Escola de Ciências da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Rua Imaculada Conceição, 1155, 80215-901, Curitiba, PR, Brasil. E-mail: p.michelotto@pucpr.br. \*Corresponding author.

**ABSTRACT:** There are evidences of intestinal flora influence on the airway immune response. However, this information is scarce with regard to horses. The present preliminary study aimed to investigate the effects of a commercial mineral supplement containing probiotics and prebiotics on the respiratory immune response of horses supplemented with them during the first months of stabling and race training. Twelve TB yearlings were examined at the breeding farm at the beginning of the study (June 2016, henceforth M0) and then reexamined one (July 2016, henceforth M1) and five (November 2016, henceforth M2) months after being stabled at a racetrack in Curitiba, Brazil. Clinical and hematological examinations, airway endoscopy, and tracheal wash (TW) cytology were performed. After the initial examination, horses were randomly divided between the treatment group (TG), which received 10 grams of the supplement daily, and the control group (CG). There was no difference between the groups in terms of clinical parameters; in the hematological examination, eosinophil count was lower in the TG in M1 as compared with M0 ( $P = 0.045$ ). Pharyngeal lymphoid hyperplasia (PLH) improved in the TG during M1 as compared with M0 ( $P = 0.007$ ). However, on the CG, PLH remained unchanged. Relative number of eosinophils in the TW was 86.1% higher in M1 than M0 for the CG; in the TG; however, eosinophils were absent and remained within normal limits until M2. In conclusion, this study revealed a positive influence of probiotic and prebiotic supplementation on the respiratory immune response of young TB race horses. Further investigations are recommended.

**Key words:** airway inflammation, endoscopy, intestinal flora, prebiotic, probiotic.

## Suplemento mineral com pre- e probiótico melhora a condição imunológica respiratória em cavalos sobreano Puro Sangue Inglês de corrida: resultados preliminares

**RESUMO:** As doenças respiratórias são uma grande preocupação em cavalos Puro Sangue Inglês (PSI) jovens durante o primeiro ano de treinamento para corrida. Existem evidências da influência da flora intestinal sobre a condição imunológica do organismo, incluindo a resposta de defesa das vias aéreas, porém essas informações são escassas nos cavalos. O presente estudo preliminar teve como objetivo investigar a influência da suplementação com núcleo mineral comercial com probiótico e prebiótico sobre a resposta imunológica respiratória de cavalos PSI durante os primeiros meses de estabulação e treinamento. Doze cavalos PSI na fase de sobreano, machos e fêmeas, foram examinados ainda no haras (M0) e, um mês (M1) e cinco meses (M2) após estabulação no hipódromo em Curitiba, Brasil. Os cavalos foram submetidos a exames clínico e hematológico, endoscopia das vias aéreas e citologia do lavado traqueal (LT). Após o primeiro exame, os cavalos foram divididos aleatoriamente em grupo tratado (GT), que recebeu 10g por dia do suplemento, e grupo de controle (GC). Não houve diferença nos parâmetros clínicos, já no exame hematológico do GT, a contagem de eosinófilos foi menor em M1 quando comparado a M0 ( $P = 0,045$ ). A hiperplasia folicular linfóide ficou dentro do limite normal e menores no GT em M1 quando comparado a M0 ( $P = 0,007$ ), o que não ocorreu para o GC. O número relativo de eosinófilos no LT foi 86,1% maior em M1 versus M0 para o GC, enquanto no GT, os eosinófilos estavam ausentes e permaneceram dentro dos limites normais até M2. Concluindo, neste estudo preliminar, evidenciou-se uma influência positiva da suplementação probiótica e prebiótica na resposta imunológica respiratória de cavalos PSI jovens, justificando investigações adicionais.

**Palavras-chave:** endoscopia, flora intestinal, inflamação das vias aéreas, prebiótico, probiótico.

Airway diseases are the major cause of poor performance in race horses, being the second most prevalent condition affecting the two-year-old Thoroughbreds (TB) (WILSHER et al., 2006). Relationship amongst stabling, feeding hay, and respiratory diseases is well understood. It is known that

stabled horses are exposed to high levels of organic dust; this instigates inflammatory processes in the airways (HOLCOMBE et al., 2001).

Some studies with young TB horses beginning race training investigated the importance of the transition from the field to the barn

## Case Report

Pine branch of *Araucaria angustifolia* in horse bronchi: A series of four casesF. C. M. Barussi, F. Z. Bastos, L. Zenni, C. E. Camargo and P. V. Michelotto\* 

Department of Animal Science, School of Life Sciences, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil

\*Corresponding author email: p.michelotto@pucpr.br

Keywords: horse; endoscopy; foreign body; lung; pulmonary

## Summary

Horses at pasture are susceptible to the aspiration of foreign bodies. In Curitiba, southern Brazil, four horses of different breeds and ages were examined with regards to a persistent cough that lasted for several months, fetid breath, and no fever. The animals were referred for bronchoscopic examination performed under sedation and tracheobronchial topical anaesthesia. Bronchoscopies in all four horses revealed a pine branch of the species *Araucaria angustifolia*, native to southern Brazil, in the lumen of a third to fifth generation bronchus. Complete removal of the branch was possible in one case using a polypectomy loop inserted through the biopsy channel of the bronchoscope. In two cases, partial removal was possible. In one case the branch was adhered to the swollen mucosa and could not be extracted; this animal is being kept at pasture with intermittent antibiotic treatment as necessary. In conclusion, foreign bodies consisting of pine branches in the tracheobronchial tree of horses may be more common than currently recognised, as *Araucaria* genus is present in other countries and should be suspected in horses with chronic coughing associated with fetid breath and a history of reoccurrence following symptomatic treatments.

## Introduction

The aspiration of foreign bodies (FBs) is a relatively common occurrence in children (Lima *et al.* 2000). Although it seems to be less common in animals, there are a few reports of cases in horses (Urquhart *et al.* 1981; Brown and Collier 1983; Ferrucci *et al.* 2003) and dogs (Abreu *et al.* 2017). In horses, previous reports describe the presence of 12 cm (Urquhart *et al.* 1981), 27 cm (Ferrucci *et al.* 2003) and 70 cm long (Brown and Collier 1983) twigs on the floor of the trachea and extending into the right main bronchus. Indeed, horses at pasture are susceptible to aspiration of FBs (Araújo *et al.* 2014) which can occasionally lodge in the trachea or near the tracheal bifurcation, resulting in a chronic cough persisting for months, nasal discharge, and occasionally a high fever (Urquhart *et al.* 1981; Brown and Collier 1983; Ferrucci *et al.* 2003).

Other clinical signs sometimes present in cases of FBs in the tracheobronchial region include inspiratory dyspnoea, audible stridor localised to the trachea, extension of the head and neck, fetid breath, intermittent bilateral purulent nasal discharge, epistaxis, and reduced exercise tolerance

This study was awarded at the poster presentation at the 15th World Equine Veterinary Association Congress in Beijing.

(Urquhart *et al.* 1981; Brown and Collier 1983). Signs of severe pneumonia may also be present (Hultgren *et al.* 1986).

The present report describes four cases of a FB in equine bronchi due to aspirated branches of *Araucaria angustifolia* (*A. angustifolia*). *A. angustifolia* is a common coniferous species from the south region of Brazil and other regions of the country such as the city of Curitiba, which in Tupi Guarani (regional Indian ethnics) means 'land of many pines' (Curí = pine and Tiba = gathering, many), and also the cities of Araucária, Pinhais, São José dos Pinhais, and Pinhão, among others.

*Araucaria* is a genus of coniferous trees in the family *Araucariaceae* which consists of three genera (*Agathis*, *Araucaria*, and *Wollemia*) and 41 species. This is mostly found in the southern regions of South America, southern Asia, Malaysia, Philippines, New Caledonia, Australia, New Zealand and some Pacific Islands (Christenhusz *et al.* 2017). In addition, the American Conifer Society, in its website, describes the origin and distribution of the *Araucariaceae* family, showing that there are some species of *Araucaria* that were introduced especially in the southern and western parts of the United States (American Conifer Society 2019) (Supplementary Items 1–4).

## Case histories

Four horses were seen for veterinary care in the region of the city of Curitiba, in the Paraná state, located in southern Brazil. All animals had free access to native pasture and were examined for a persistent cough of several months' duration.

Case 1 was a male Thoroughbred yearling at a breeding farm, that had a history of persistent coughing, fetid breath, and purulent bilateral nasal discharge. Case 2 was a 10-year-old Appaloosa mare used for pleasure riding originating from the city of São Bento do Sul, Santa Catarina state, in southern Brazil, that was examined for persistent coughing while exercising. Case 3 was another Appaloosa horse, a 20-year-old gelding, and Case 4 was a male 5-year-old Crioulo breed horse. The major complaint of these horses was a chronic cough, of about 12 months' duration in Case 3 and approximately 2 months' duration in Case 4. Case 1 was cared for by the farm's resident veterinarian, who promptly identified a condition needing specialised attention; the other cases were examined by different practitioners and had been treated with antibiotics and anti-inflammatory drugs, but without resolution of the signs. Cases 3 and 4 were used for pleasure riding activities, although the owners reported exercise intolerance.