



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

EFEITOS DA TERAPÊUTICA COM CÉLULAS ESTAMINAIS MESENQUIMATOSAS  
DERIVADAS DA MEDULA ÓSSEA NA EXPRESSÃO DA CITOCINA PRÓ-FIBRÓTICA  
TGF- $\beta$ 1 NO ENDOMÉTRIO DE ÉGUAS COM ENDOMETROSE

ANA CATARINA JORGE CARDOSO

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Luísa Maria Freire Leal Mateus

Doutora Graça Maria Leitão Ferreira Dias

Doutor José Manuel Antunes Ferreira da  
Silva

ORIENTADORA

Dra. Elida Ana Fumuso

CO-ORIENTADORA

Doutora Graça Maria Leitão Ferreira Dias

2015  
LISBOA

---





UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

EFEITOS DA TERAPÊUTICA COM CÉLULAS ESTAMINAIS MESENQUIMATOSAS  
DERIVADAS DA MEDULA ÓSSEA NA EXPRESSÃO DA CITOCINA PRÓ-FIBRÓTICA  
TGF- $\beta$ 1 NO ENDOMÉTRIO DE ÉGUAS COM ENDOMETROSE

ANA CATARINA JORGE CARDOSO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Luísa Maria Freire Leal Mateus

Doutora Graça Maria Leitão Ferreira Dias

Doutor José Manuel Antunes Ferreira da  
Silva

ORIENTADORA

Dra. Elida Ana Fumuso

CO-ORIENTADORA

Doutora Graça Maria Leitão Ferreira Dias

2015  
LISBOA

---



“A grandeza de uma nação pode ser julgada pelo modo como os seus animais são tratados.”

*Mahatma Gandhi*



## **Agradecimentos**

Não é fácil expressar com palavras tudo o que sinto em relação a tudo e todos que tornaram isto possível.

A todos os animais que cruzaram a minha vida pois foi graças a eles que nasceu o sonho e porque uma vida sem animais nunca estaria completa. Obrigada por tudo o que me ensinaram e por todos os bons momentos que me proporcionaram.

À Professora Elida Fumuso, minha orientadora, a todo o pessoal da Faculdade de Ciências Veterinárias da Universidade Nacional do Centro da Província de Buenos Aires (UNCPBA) em Tandil, Argentina, pelo estágio que me proporcionaram e por me terem recebido com tanto carinho e amizade, assim como ao Professor Marco Alvarenga e ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, Brasil, por ter cedido as biópsias que permitiram realizar este trabalho. Obrigada pela orientação e por todos os momentos de aprendizagem.

A todos os militares do Haras “Gral. Lavalle” pela enorme simpatia com que me receberam e por tudo o que me ensinaram. Sempre me receberam com um sorriso e me ensinaram com paciência, por maior que fosse o caos ou o “portunhol”.

Ao Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA) por ter possibilitado o financiamento deste trabalho e permitido a utilização das suas instalações e equipamentos.

À D<sup>a</sup>. Maria do Rosário, à Dr<sup>a</sup>. Paula, à Ana Amaral e à Professora Maria Rosa Rebordão por todo o apoio, ajuda e disponibilidade ao longo de todo o trabalho de laboratório e por nunca me deixarem desanimar quando as coisas correram menos bem.

À minha co-orientadora, a professora Graça Ferreira Dias, por toda a amizade, simpatia, apoio e disponibilidade como professora coorientadora e por toda a paciência e dedicação que teve para comigo na elaboração deste trabalho. Será sempre uma referência de profissionalismo e generosidade.

A todos os meus amigos, por serem os melhores amigos do mundo e por fazerem parte da pessoa que sou hoje. Sem eles nunca teria chegado aqui e tenho a sorte de poder dizer que hoje sei o valor de uma verdadeira amizade. Não podemos escolher a família mas os amigos são a família que o coração escolhe.

À minha família, especialmente aos meus pais e aos meus avós, pelo apoio incondicional e por sempre acreditarem em mim. Sem eles nunca teria chegado onde cheguei e não seria quem sou hoje. Devo-lhes tudo.

*Obrigada*

## **Resumo - Efeitos da terapêutica com células estaminais mesenquimatosas derivadas da medula óssea na expressão da citocina pró-fibrótica TGF- $\beta$ 1 no endométrio de éguas com endometrose**

A endometrose equina é uma doença crónica, progressiva e degenerativa responsável por alterações glandulares e pela presença de fibrose no endométrio. É uma das principais causas de infertilidade em éguas e atualmente não há nenhum tratamento eficaz. A citocina Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) é responsável por diversas funções em vários tipos de células, incluindo o controlo do crescimento, proliferação e diferenciação celular e apoptose. Quando a homeostase do tecido é perturbada, o TGF- $\beta$ 1 aumenta o recrutamento, a proliferação e a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos e a produção de componentes da matriz extracelular levando à fibrose, o que o torna um dos principais indutores de fibrose nos tecidos. Novas terapêuticas estão a ser investigadas e a terapêutica celular é considerada uma das melhores candidatas para a resolução da fibrose. As células estaminais mesenquimatosas (MSCs) libertam várias moléculas bioativas, algumas das quais modulam a resposta inflamatória enquanto outras contribuem para a regeneração e remodelação de um tecido lesionado. Os seus efeitos imunomoduladores e a sua capacidade de agir sobre fatores pró-fibróticos, como a via do TGF- $\beta$ 1, já foram destacados em estudos pré-clínicos e clínicos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão do TGF- $\beta$ 1 e dos seus recetores após a infusão de células estaminais mesenquimatosas autólogas derivadas da medula óssea (BM-MSCs) no endométrio de 7 éguas com endometrose. Foram injetadas  $8 \times 10^6$  células em cada égua e recolhidas biópsias uterinas antes do tratamento (D0) e trinta dias (D30) e sessenta dias (D60) após o tratamento. A análise da expressão do TGF- $\beta$ 1 e dos seus recetores foi avaliada por imunohistoquímica. Seria de esperar uma diminuição da expressão do TGF- $\beta$ 1 trinta (D30) e sessenta (D60) dias após o transplante de células estaminais mesenquimatosas derivadas da medula óssea no endométrio. A imunomarcção do TGF- $\beta$ 1 e do TGF $\beta$ RI apresentou um padrão semelhante, verificando-se em todas as éguas, principalmente no citoplasma do epitélio glandular e no endotélio. A imunomarcção do TGF $\beta$ RII verificou-se principalmente nas células do estroma. Foi possível observar uma maior intensidade de marcação do TGF- $\beta$ 1 e do TGF $\beta$ RI no citoplasma do epitélio glandular de glândulas dilatadas ou em focos fibróticos. Verificou-se uma diminuição da intensidade da marcação do TGF- $\beta$ 1 e do TGF $\beta$ RI em D30 e D60 mas não em todas as éguas. A expressão do TGF $\beta$ RII não sofreu alterações após o tratamento com BM-MSCs. Neste trabalho não foi possível detetar um efeito claro das BM-MSCs autólogas transplantadas no endométrio de éguas com endometrose na expressão da citocina pró-fibrótica TGF- $\beta$ 1 e dos seus recetores.

**Palavras-chave:** TGF- $\beta$ 1, células estaminais mesenquimatosas, endometrose equina, imunohistoquímica

**Abstract – Effects of the therapy with mesenchymal stem cells derived from bone marrow in the expression of the pro-fibrotic cytokine TGF-β1 in the endometrium of mares with endometriosis**

Equine endometriosis is a chronic, progressive, degenerative disease responsible for glandular changes and fibrosis in the endometrium of the mare. It is a main cause of infertility in mares and currently there is no effective treatment. Transforming Growth Factor β1 (TGF-β1) is a cytokine that performs many cell functions in several cell types, including growth control, cell proliferation and differentiation and apoptosis. However, when the tissue homeostasis is disturbed by some injury, TGF-β1 increases recruitment, proliferation and differentiation of fibroblasts into myofibroblasts and the production of extracellular matrix components, leading to fibrosis. TGF-β1 is considered a major factor responsible for the process of fibrosis in the tissues. New therapies are being investigated and cell therapy is considered one of the best candidates for fibrosis. Mesenchymal stem cells (MSCs) release various bioactive molecules, some of which modulate the inflammatory response while others contribute for remodeling and regeneration of a damaged tissue. Their immunomodulatory effects and ability to act on pro-fibrotic factors such as the pathway of transforming growth factor β1 have been highlighted in preclinical and clinical studies. The aim of this study was to evaluate the expression of TGF-β1 and its receptors after infusion of autologous mesenchymal stem cells derived from bone marrow (BM-MSCs) in the endometrium of 7 mares with endometriosis.  $8 \times 10^6$  cells per mare were transplanted into the endometrium and uterine biopsies were collected before treatment (D0) and thirty days (D30) and sixty (D60) days post treatment. The analysis of the expression of TGF-β1 and its receptors was evaluated by immunohistochemistry. We expected a decrease in TGF-β1 expression thirty (D30) and sixty (D60) days after the transplantation of bone marrow derived mesenchymal stem cells in the endometrium. The TGF-β1 and TGFβRI showed a similar immunostaining pattern. It was found in all mares mainly in the cytoplasm of the glandular epithelium and endothelium. The immunostaining of TGFβRII was found mainly in stromal cells and cilia of the glands. It is possible to observe a stronger immunostaining intensity of TGF-β1 and TGFβRI in the cytoplasm of the glandular epithelium of dilated glands or glands located in fibrotic foci. There was a decrease in the intensity of TGF-β1 and TGFβRI at D30 and D60 but not in all mares. The expression of TGFβRII did not change after treatment with BM-MSCs. In this work we could not detect a clear effect of autologous BM-MSCs transplanted into the endometrium of mares with endometriosis in the expression of the pro-fibrotic cytokine TGF-β1 and its receptors TGFβRI and TGFβRII.

**Keywords:** TGF-β1, mesenchymal stem cells, equine endometriosis, immunohistochemistry

## Índice

Agradecimentos.....	ii
Resumo .....	iii
Abstract .....	iv
Lista de tabelas.....	viii
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	ix
Parte I - Descrição das atividades desenvolvidas durante o estágio.....	1
1. Estágio curricular .....	1
2. Estágios extracurriculares .....	2
3. Trabalho Científico .....	3
Parte II – Revisão Bibliográfica .....	4
1. O endométrio equino.....	4
2. A endometrose na égua.....	5
2.1 Introdução.....	5
2.2 Caracterização da endometrose .....	6
2.3 Classificação de Kenney.....	9
2.4 Mecanismos fisiopatológicos da endometrose .....	10
2.4.1 NETs.....	11
2.4.2 Citocinas.....	12
3. TGF $\beta$ .....	13
3.1 TGF $\beta$ -1 .....	14
3.2 Síntese e libertação do TGF- $\beta$ 1 .....	15
3.3 Ativação do TGF- $\beta$ 1.....	15
3.4 Efeitos do TGF- $\beta$ 1 .....	19
4. Células estaminais.....	20
4.1 Introdução às células estaminais e à medicina regenerativa.....	20
4.2 Classificação e características das células estaminais .....	23
4.2.1 Células estaminais embrionárias .....	24
4.2.2 Células estaminais adultas .....	24
4.3 Células estaminais mesenquimatosas .....	25
4.3.1 Origem.....	25
4.3.2 Características.....	26
4.4 Colheita de células estaminais mesenquimatosas derivadas da medula óssea.....	29
4.5 Isolamento, cultura e proliferação de células estaminais mesenquimatosas derivadas da medula óssea .....	31
4.6 Efeitos anti-inflamatórios, imunomoduladores e anti-fibróticos da terapêutica com células estaminais mesenquimatosas.....	33

4.6.1 Propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras .....	33
4.6.2 Propriedades anti-fibróticas.....	35
4.7 Utilização de células estaminais mesenquimatosas em processos terapêuticos regenerativos .....	37
Parte III – Trabalho de investigação.....	41
1. Objetivos.....	41
2. Materiais e métodos.....	42
2.1 Animais.....	42
2.2 Células.....	43
2.2.2 Isolamento e cultura das células estaminais mesenquimatosas derivadas da medula óssea .....	43
2.3 Injeção endometrial de células estaminais mesenquimatosas .....	44
2.4 Processamento das biópsias endometriais obtidas.....	44
2.5 Imunohistoquímica.....	45
2.6 Fotografias dos cortes histológicos .....	46
2.7 Avaliação das biópsias endometriais .....	47
3. Resultados.....	48
3.1 Classificação da endometriose .....	48
3.2 Expressão imunohistoquímica do TGF- $\beta$ 1, TGF $\beta$ RI e TGF $\beta$ RII .....	48
3.2.1 TGF- $\beta$ 1 .....	48
3.2.2 TGF $\beta$ RI.....	54
3.2.3 TGF $\beta$ RII.....	55
4. Discussão .....	58
5. Conclusão.....	61
6. Bibliografia .....	62

## Lista de figuras

<b>Figura 1</b> Representação esquemática de uma secção transversal do útero da égua .....	5
<b>Figura 2</b> Um modelo da ativação mecânica do TGF- $\beta$ 1 latente.....	17
<b>Figura 3</b> As interações entre o epitélio e fibroblastos .....	19
<b>Figura 4</b> Diferenciação e divisão de células estaminais. ....	22
<b>Figura 5</b> As MSCs podem diferenciar-se em osso, músculo ou tecido adiposo, dependendo dos estímulos a que são expostas <i>in vitro</i> . É mostrada uma hipótese do processo mesengénico que as MSCs sofrem tanto <i>in vitro</i> como <i>in vivo</i> .....	27
<b>Figura 6</b> Corte sagital do esterno de um equino, exibindo o posicionamento correto de uma agulha Jamshidi dentro da cavidade medular da quinta vértebra.....	30
<b>Figura 7</b> Aspiração de medula óssea através do esterno em equinos.....	30
<b>Figura 8</b> Efeitos comuns da terapêutica com MSCs em várias doenças fibróticas. ....	37
<b>Figura 9</b> Locais de administração das BM-MSCs no endométrio equino.....	44
<b>Figura 10</b> Imunomarcagem do TGF- $\beta$ 1 no endométrio da égua antes do tratamento com BM-MSCs (D0). Ampliação 400x.....	50
<b>Figura 11</b> Imunomarcagem do TGF- $\beta$ 1 no endométrio da égua antes do tratamento com BM-MSCs (D0). Ampliação 100x.....	50
<b>Figura 12</b> Imunomarcagem do TGF- $\beta$ 1 no endométrio da égua antes do tratamento com BM-MSCs (D0). Ampliação 100x.....	51
<b>Figura 13</b> Imunomarcagem do TGF- $\beta$ 1 no endométrio da égua antes do tratamento com BM-MSCs (D0). Ampliação 400x.....	51
<b>Figura 14</b> Imunomarcagem do TGF- $\beta$ 1 no endométrio da égua 30 dias após o tratamento com BM-MSCs (D30). Ampliação 400x.....	52
<b>Figura 15</b> Imunomarcagem do TGF- $\beta$ 1 no endométrio da égua antes do tratamento com BM-MSCs (D0), trinta dias após o tratamento (D30) e sessenta dias depois do tratamento (D60). Ampliação 100x .....	53
<b>Figura 16</b> Imunomarcagem do TGF $\beta$ RI no endométrio da égua antes do tratamento com BM-MSCs (D0), trinta dias após o tratamento (D30) e sessenta dias após o tratamento (D60). Ampliação 100x .....	55
<b>Figura 17</b> Imunomarcagem do TGF $\beta$ RII no endométrio da égua antes do tratamento com BM-MSCs (D0). Ampliação 100x .....	56
<b>Figura 18</b> Imunomarcagem do TGF $\beta$ RII no endométrio da égua antes do tratamento com BM-MSCs (D0). Notar marcação dos cílios das células do epitélio glandular num ninho glandular (setas pretas) e células do estroma entre as glândulas (setas vermelha). Ampliação 400x.....	53
<b>Figura 19</b> Imunomarcagem do TGF $\beta$ RII no endométrio da égua antes do tratamento com BM-MSCs (D0), trinta dias após o tratamento (D30) e sessenta dias após o tratamento (D60). Ampliação 100x .....	58

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1</b> Tipos de endometrose e aspecto histopatológico do endométrio.. .....	8
<b>Tabela 2</b> Escala de Kenney-Doig. ....	9
<b>Tabela 3</b> Anticorpos primários usados na imunohistoquímica.....	46

## Lista de Abreviaturas e Siglas

$\alpha$ -SMA	$\alpha$ -Smooth Muscle Actin
ANG II	Angiotensina II
ASCs	Adult Stem Cells
AT-MSCs	Adipose Tissue-derived Mesenchymal Stem Cells
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
BM-MSCs	Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells
BMP	Bone Morphogenetic Protein
Células NK	Células Natural Killer
CFU	Colony Forming Unit
CIISA	Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal
CK18	Citoqueratina 18
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
D0	Dia antes do tratamento com BM-MSCs
D30	30 dias após o tratamento com BM-MSCs
D60	60 dias após o tratamento com BM-MSCs
DAB	Diaminobenzidine
DC	Dendritic cell
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Deoxyribonucleic acid
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ESCs	Embryonic Stem Cells
FBS	Fetal Bovine Serum
FGF	Fibroblast Growth Factor
FGF-2	Fibroblast Growth Factor-2
FMV-ULisboa	Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa
GPx	Glutathione peroxidase
Gr	Glutathione reductase
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HO-1	Heme oxygenase 1
HSCs	Hematopoietic Stem Cells
IFN- $\gamma$	Interferão-gama
IgA	Imunoglobulina A
IGF	Insulin-like Growth Factor
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IHQ	Imunohistoquímica
IL-1	Interleucina 1
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
LAP	Latency Associated Peptide
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
LLC	Large Latent Complex
LTBP	Latent TGF- $\beta$ -Binding Protein
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein 1

M-CSF	Macrophage Colony–Stimulating Factor
MHz	Megahertz
MMPs	Matrix Metalloproteinases
mRNA	Messengerribonuclein acid
MSCs	Mesenchymal Stem Cells
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NETs	Neutrophil Extracellular Traps
NO	Nitric oxide
NQO1	NADPH quinone oxidoreductase 1
Nrf2	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
NSCs	Neural Stem Cells
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDGF-Rb	Platelet-derived growth factor-receptor beta
PDT	Population doubling time
PGE2	Prostaglandina E2
PMN	Polymorphonuclear neutrophil
RNS	Reactive nitrogen species
ROS	Reactive oxygen species
rpm	Rotações por minuto
SCF	Stem cell factor
SDF-1	Stromal cell-derived factor 1
Shh	Sonic hedgehog
SLC	Small Latent Complex
Smad	Small mothers against decapentaplegic
SOD	Superoxide dismutase
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor- $\beta$
TGF $\beta$ 1	Transforming Growth Factor- $\beta$ 1
TGF $\beta$ RI	Transforming Growth Factor- $\beta$ Receptor Type 1
TGF $\beta$ RII	Transforming Growth Factor- $\beta$ Receptor Type 2
Th	Helper T-cell
TIMPs	Tissue Innibitors of Metalloproteinases
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis Factor alpha
UNCPBA	Universidade Nacional do Centro da Província de Buenos Aires
UNESP	Universidade Estadual Paulista
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
W	Watts

## Parte I - Descrição das atividades desenvolvidas durante o estágio

### 1. Estágio curricular

O estágio curricular teve lugar no departamento de Fisiopatologia da Reprodução da clínica de grandes animais da Faculdade de Ciências Veterinárias da Universidade Nacional do Centro da Província de Buenos Aires (UNCPBA) em Tandil, Argentina, de 1 de Setembro a 20 de Dezembro de 2014 sob a orientação da Professora Elida Fumuso.

A Faculdade de Ciências Veterinárias da Universidade Nacional do Centro da Província de Buenos Aires foi fundada em 1969 e é uma das 13 faculdades de Veterinária do país. O hospital de grandes animais foi inaugurado no dia 15 de Agosto de 2012. Este novo edifício com cerca de 450m<sup>2</sup> conta com um bloco cirúrgico, equipamento de anestesia volátil, box de indução e recuperação anestésica, boxes, laboratórios, equipamento de radiografia e ecografia, mangas e vários animais a campo: bovinos, éguas gestantes, éguas vazias e garanhões.

Um dos objetivos do estágio foi aumentar o conhecimento e competências na área de reprodução equina, aproveitando assim a época reprodutiva do hemisfério sul. Durante todo o estágio tive a oportunidade de acompanhar e colaborar em dois projectos de investigação: “Efecto de la dexametasona como modulador de la respuesta de fase aguda post-servicio de la yegua”, e “Aspectos Básicos del envejecimiento y su impacto sobre el sistema reproductivo de la yegua”, de Sofia Cantatore e Cecilia Redolatti, respectivamente, duas alunas de doutoramento com quem passei a maior parte do tempo. Ambos os projectos requerem a recolha de várias biópsias de endométrio de grupos de éguas de diferentes idades e em diferentes fases do ciclo éstrico. Para isso foram utilizadas algumas das éguas da faculdade, com idades entre 18 e 25 anos. O trabalho incluiu um controlo reprodutivo das éguas para avaliar o momento ideal para inseminação artificial ou recolha de biópsia endometrial, sendo assim possível praticar palpações rectais, ecografias transrectais para avaliar o sistema reprodutivo da égua e a fase do ciclo éstrico, inseminações artificiais, recolha de biópsias endometriais, uma vez que para ambos os projectos eram necessárias várias amostras endometriais, citologias uterinas com lavagem de baixo volume e vulvoplastias de *Caslick*. Foi ainda possível auxiliar em todo o maneio envolvido na condução das éguas até à manga, alimentação, colheita de sangue, recolha de amostras fecais para pesquisa de parasitas e desparasitações internas.

A Faculdade de Ciências Veterinárias possui também uma parceria com o Haras “General Lavalle”, que foi fundado em 1935 e pertence ao exército argentino. É um haras com cerca de 2000 hectares e que cria principalmente cavalos da raça “Silla Argentino” para polo e para salto, tendo atualmente cerca de 200 éguas reprodutoras. Como ambos os projetos

necessitavam de amostras de endométrio de éguas de outras faixas etárias, o haras disponibilizou amavelmente algumas das suas éguas. Assim, tivemos a oportunidade, por diversas vezes, de visitar o haras e ajudar no manejo e condução da eguada e dos poldros até à manga, praticar mais palpações rectais e ecografias transrectais para o controlo reprodutivo das éguas, diagnósticos de gestação, drenagem de abscessos e limpeza de feridas em poldros, desinfeção de umbigos, colheitas de sangue, desparasitações externas e naturalmente, a recolha de biópsias endometriais de determinadas éguas. Os dias passados no haras foram uma experiência muito boa e gratificante, foi possível envolver-me totalmente na rotina do haras, praticar e aprender bastante, sempre com muito apoio e boa disposição.

Por último, estando o departamento de Fisiopatologia da Reprodução integrado no hospital de grandes animais, foi possível acompanhar alguns casos do hospital durante todo o tempo do estágio: uma cirurgia a cólica por encarceramento do ligamento nefro-esplénico, uma poldra com isoeritrólise neonatal, cirurgia a poldro com uraco persistente, tratamento de tendinite com plasma rico em plaquetas, castração de dois cavalos criptorquídeos e limpeza e tratamento de diversas feridas.

Durante este estágio foram-me cedidos cortes histológicos de biópsias endometriais do projeto "Stem Cell", um projeto que a Faculdade de Ciências Veterinárias da Universidade Nacional do Centro da Província de Buenos Aires tem em parceria com a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, Brasil. Estas biópsias de endométrio foram recolhidas antes e depois de um tratamento com células estaminais mesenquimatosas em úteros de éguas com endometrose e na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa foi desenvolvido o trabalho que constituiu a base desta dissertação de mestrado integrado.

## **2. Estágios extracurriculares**

Fiz dois estágios extracurriculares em dois lugares distintos:

- a) Anglesey Lodge Equine Hospital: O estágio no Anglesey Lodge Equine Hospital teve a duração de 6 semanas (de 11 de Fevereiro a 22 de Março). O Anglesey Lodge Equine Hospital é um hospital de referência em Kildare, uma das maiores e mais importantes áreas de corridas e criação do Puro Sangue Inglês na Irlanda. Durante este estágio foi possível acompanhar inúmeros casos: diagnóstico de claudicações, assistir ao exame radiográfico e ecográfico dos membros, ecocardiografias, colheitas trans-traqueais assépticas e lavado bronco-alveolar, gastroscopias, endoscopias respiratórias dinâmicas, vários casos de cólica, uma cirurgia a torção de cólon pós parto, duas cesarianas, lavagens articulares e também inúmeros casos de neonatologia como asfixia perinatal, diarreias, correções de

deformidades contracturais, monitorização de IgG, transfusões de plasma e uma cirurgia ao uraco persistente. Embora na maior parte dos casos só tenha sido possível assistir, foi sem dúvida uma boa experiência para aumentar os conhecimentos de clínica e principalmente de neonatologia devido ao grande número e variedade de casos.

- b) Keros: O Keros é um centro de inseminação artificial e transferência de embriões de equinos na Bélgica e um dos maiores da Europa. O estágio no Keros teve também a duração de 6 semanas (23 de Março a 3 de Maio). O trabalho diário incluiu o controlo reprodutivo das éguas receptoras por palpação rectal e ecografia transrectal, lavagens uterinas às éguas dadoras para recuperação de embriões, filtragem, pesquisa do embrião e assistir às transferências de embriões. Foi também possível fazer algumas inseminações artificiais, vulvoplastias de Caslick e assistir a vários partos, assim como todo o maneio das éguas receptoras, limpeza de feridas, tosquiadas e colheitas de sangue. Por último, foi possível alimentar poldros órfãos, preparar éguas receptoras para a adopção de poldros órfãos e assistir a adopções. Este estágio foi uma ótima experiência para praticar aspectos básicos de reprodução equina como palpações e ecografias transrectais, inseminações, vulvoplastias de Caslick e aprender sobre o maneio reprodutivo de éguas receptoras e transferências de embriões.

### **3. Trabalho Científico**

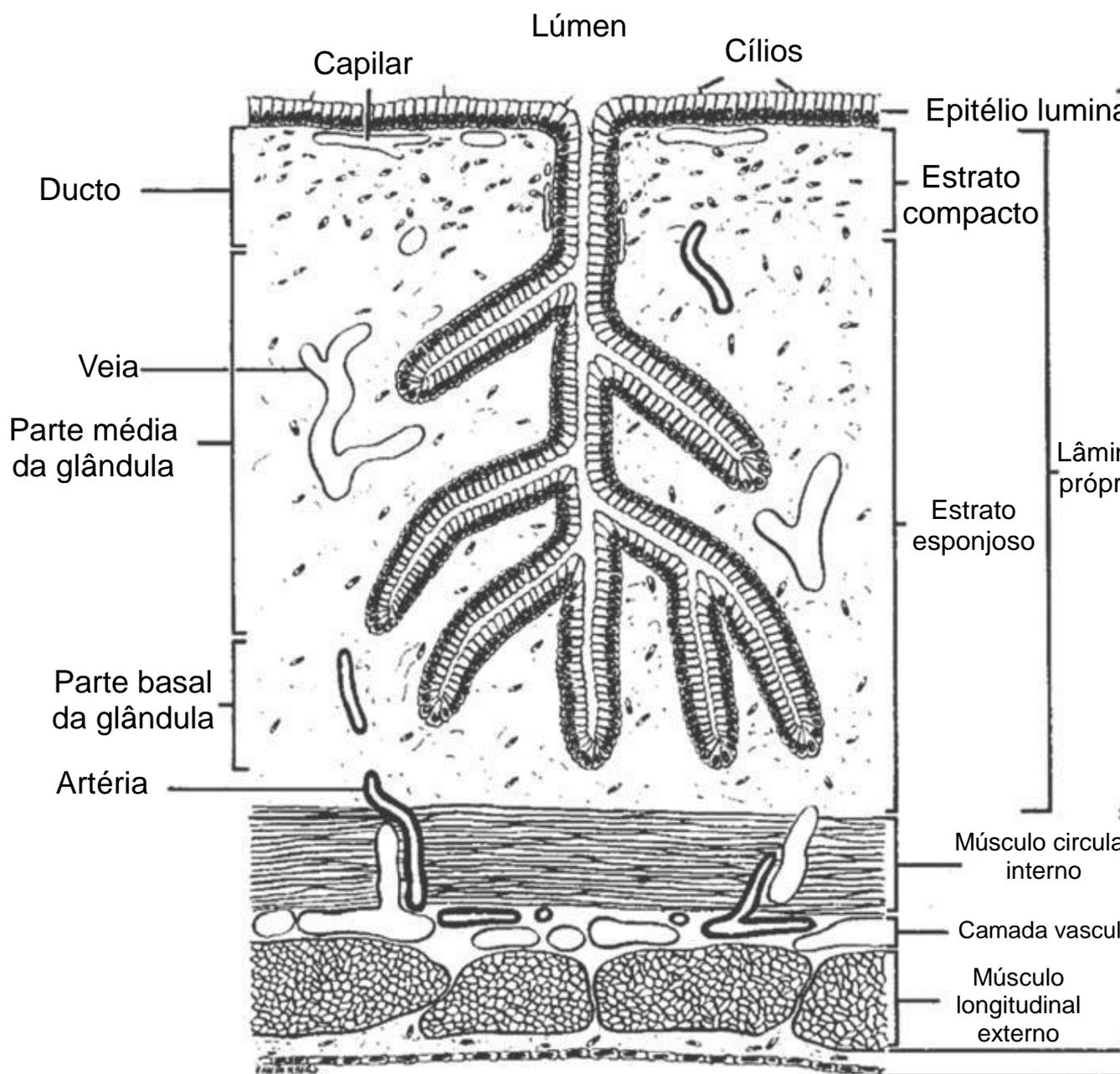
O trabalho científico decorreu no Laboratório de Fisiologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa com o apoio do Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA) desde 11 de Maio de 2015. Foi durante este período que foram desenvolvidas as técnicas e trabalho experimental que são a base desta dissertação de Mestrado. O objetivo foi avaliar expressão do Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) e dos seus recetores por imunohistoquímica nos cortes histológicos de endométrio de éguas com endometrose trazidos da Argentina do projecto “Stem Cells” antes e depois do tratamento com células estaminais. O trabalho laboratorial compreendeu a realização da técnica de imunohistoquímica em várias lâminas com cortes histológicos de biópsias endometriais, a avaliação da expressão do TGF- $\beta$ 1 e dos seus recetores no endométrio antes e depois da administração de células estaminais mesenquimatosas e a classificação da fibrose endometrial das sete éguas. Esta parte crucial do trabalho foi também muito desafiante e recompensadora, permitindo ganhar alguns conhecimentos de várias técnicas laboratoriais.

## Parte II – Revisão Bibliográfica

### 1. O endométrio equino

O endométrio equino é constituído por duas partes, o epitélio luminal e a lâmina própria, que se estende desde a membrana basal do epitélio até ao miométrio (Figura 1) (Kenney, 1978). Não existe submucosa nem tecido muscular no endométrio (Kenney, 1978). O epitélio luminal varia com a fase do ciclo éstrico e pode ir de cúbico a cilíndrico. Menos de metade das células são ciliadas. A lâmina própria é constituída por duas camadas com base na densidade de células do estroma (Kenney, 1978): o estrato compacto, a seguir ao epitélio luminal, que é caracterizado por uma densidade de células do estroma relativamente elevada; e o estrato esponjoso, que tem uma densidade celular mais baixa, com muitas fibras, criando assim uma aparência esponjosa. Na lâmina própria há numerosas glândulas uterinas, que estão ligadas à superfície luminal por ductos (Kenney, 1978). As glândulas estendem-se e ramificam-se até ao estrato esponjoso (McKinnon, 2011). Assim, as estruturas a observar numa biópsia endometrial incluem: o epitélio luminal, glândulas endometriais organizadas em duas camadas distintas (o estrato compacto perto da superfície e o estrato esponjoso mais profundamente), estroma, vasos sanguíneos, linfáticos e nervos (Van Camp, 1988). Juntamente com o epitélio luminal, o epitélio glandular produz e liberta secreções biológicas complexas (histotrofo) que variam dependendo da fase do ciclo e estado de gravidez (Schlafer, 2007). A diferenciação de um endométrio normal está dependente das alterações endócrinas cíclicas e sazonais, que resultam numa alteração da morfologia de todas as células epiteliais e do estroma dependendo da fase do ciclo éstrico (Hoffmann et al., 2009a).

Os neutrófilos podem ser vistos no endométrio normal durante o estro dentro de vasos e na superfície (Snider, Sepoy & Holyoak, 2011). No entanto, neutrófilos presentes no tecido já estão relacionados com inflamação. Também podem ser vistos poucos linfócitos dispersos no endométrio normal mas o seu aumento é considerado compatível com um processo inflamatório crónico (Snider et al., 2011). Os macrófagos, do mesmo modo, são um indicador de inflamação crónica. Alguns macrófagos contêm ferro e são denominados siderócitos. A sua presença pode indicar uma hemorragia prévia e podem ser vistos até sete meses pós-parto (Snider et al., 2011). As células plasmáticas não devem ser observadas no endométrio normal pois a sua presença é indicativa de um processo crónico em que imunoglobulinas específicas estão provavelmente a ser produzidas (Snider et al., 2011). Os eosinófilos podem ser um indicador de alguns processos inflamatórios específicos, como infeções fúngicas ou de outros processos, como pneumovagina (Kenney, 1978; Kenney & Doig, 1986).



**Figura 1** Representação esquemática de uma seção transversal do útero da égua. Adaptado de Kenney, 1978.

## 2. A endometrose na égua

### 2.1 Introdução

A endometrose é um processo inflamatório crônico e degenerativo, caracterizado pelo desenvolvimento de fibrose no endométrio da égua (Kenney, 1992; Hoffmann et al., 2009a,b). Esta doença tem sido descrita como um processo progressivo que envolve o desenvolvimento de fibrose periglandular e/ou no estroma do endométrio, além de

alterações glandulares, como a dilatação quística, atrofia ou hipertrofia das glândulas (Kenney, 1978). Esta condição é uma das principais causas de subfertilidade/infertilidade em éguas (Kenney, 1978), uma vez que na égua, o trofoblasto não é invasivo e as secreções das glândulas uterinas são consideradas essenciais para a implantação do embrião e para o desenvolvimento e sobrevivência fetal (Mambelli et al., 2014). As secreções das glândulas endometriais de equinos, conhecidas como histotrofo ou leite uterino, contêm múltiplas proteínas que são essenciais para a sobrevivência, crescimento e desenvolvimento do embrião nos estádios iniciais de gestação, especialmente no período de peri-implantação (Stewart, Gerstenberg, Suire & Allen, 2000; Suire, Stewart, Beauchamp & Kennedy, 2001). O endométrio equino com endometrose parece ser incapaz de produzir histotrofo suficiente, levando possivelmente à perda embrionária em éguas (Hoffmann et al., 2009b).

O reconhecimento da fibrose e da sua gravidade é importante em termos de diagnóstico e prognóstico e deve ser comunicado ao clínico, uma vez que a sua presença é considerada permanente e não susceptível às modalidades terapêuticas atuais (Snider, et al., 2011).

## **2.2 Caracterização da endometrose**

A endometrose equina é geralmente observada em éguas mais velhas (com mais de 13 anos de idade) que têm uma história pregressa de dificuldade na concepção, apresentam uma taxa de perda embrionária ou fetal mais elevada e parecem ter um aumento da susceptibilidade a infecções (Ricketts & Alonso, 1991). A endometrose na égua é caracterizada por fibrose periglandular ativa ou inativa e/ou fibrose no estroma do endométrio, incluindo alterações glandulares dentro dos focos fibróticos (Hoffman et al., 2009a). Glândulas individuais e/ou ninhos glandulares podem ser afetados (Kenney, 1978; Hoffman et al., 2009a). O grau de endometrose aumenta com a idade da égua mas não há relação com o número de partos anteriores (Hoffmann et al., 2009b; Lehmann et al., 2011; Aresu et al., 2012). Os primeiros sinais de endometrose são uma diferenciação morfológica e funcional atípica de células do estroma periglandular. As células do estroma periglandular apresentam-se grandes e poligonais e sintetizam fibras de colagénio (Hoffmann et al., 2009b). Em estados mais avançados de fibrose, predominam células do estroma metabolicamente ativas ou inativas sem sinais de síntese de colagénio, bem como miofibroblastos (Hoffmann et al., 2009b). As mudanças estruturais no endométrio incluem a proliferação focal progressiva das glândulas uterinas concentradas em ninhos glandulares rodeados por numerosas camadas de tecido fibroso, que aumentam à medida que o processo avança (Buczowska, Kozdrowski, Nowak, Raś & Mrowiec, 2014). Dentro dos ninhos desenvolvem-se quistos glandulares, enquanto o número de glândulas endometriais

normais diminui (Buczowska et al., 2014). Com base na morfologia das células envolvidas, pode ser observada uma diferenciação ativa ou inativa (Hoffmann et al., 2009b). Os fibroblastos ativos estão envolvidos na síntese de moléculas (Junqueira & Carneiro, 2008). São células extremamente ativas metabolicamente, sendo capazes de sintetizar e segregar a maioria dos componentes da matriz extracelular, incluindo colagénio, proteoglicanos, tenascina, fibronectina e laminina (McAnulty, 2007). Por essa razão possuem uma maior quantidade de mitocôndrias, gotas lipídicas, complexo de Golgi e retículo endoplasmático rugoso do que os fibroblastos inativos, que se apresentam num estado de quiescência (Junqueira & Carneiro, 2008). Consequentemente, é considerada endometriose ativa aquela que contém células do estroma metabolicamente ativas, com uma síntese ativa de colagénio e deposição de matriz extracelular, enquanto que a endometriose inativa envolve células do estroma metabolicamente inativas (Hoffmann et al., 2009a). Mais recentemente, a endometriose foi também classificada como destrutiva ou não-destrutiva (Hoffmann et al., 2009a,b). Enquanto a endometriose não destrutiva é caracterizada por alterações ligeiras do epitélio glandular, as glândulas na endometriose destrutiva mostram sinais de degenerescência epitelial extensa com uma perda da arquitectura glandular normal (Hoffmann et al., 2003). Uma expressão epitelial acentuada de vimentina, acumulação excessiva de matriz extracelular, dilatações quísticas das glândulas e destruição dessas glândulas são também características típicas da endometriose destrutiva (Hoffmann et al., 2009a). As características morfológicas destes grupos encontram-se descritas na Tabela 1.

<b>Tipos de endometriose</b>		<b>Alterações histopatológicas do endométrio</b>
Não destrutiva	Ativa	Glândulas envolvidas por várias células do estroma, desordenadas, mostrando uma diferenciação metabolicamente ativa com núcleos ovóides hipocromáticos médios a grandes e um citoplasma pálido.
	Inativa	Ninhos glandulares envolvidos por células do estroma com uma diferenciação metabolicamente inativa, caracterizada por núcleos fusiformes hipercomáticos e um citoplasma alongado.
	Mista	Glândulas envolvidas por células do estroma apresentando uma diferenciação metabolicamente ativa e inativa (50% cada)
Destrutiva	Ativa	Glândulas envolvidas por células do estroma metabolicamente ativas além de uma aparência desordenada das diferentes camadas. Os fibroblastos são invasivos e penetram no lúmen da glândula; são visíveis células epiteliais degeneradas
	Inativa	Glândulas envolvidas por células do estroma metabolicamente inativas que estão organizadas paralelamente ao eixo da glândula

		adjacente; é visível a destruição multifocal de células epiteliais individuais e estase das secreções uterinas no lúmen
	Mista	Glândulas envolvidas por células do estroma ativas e inativas que penetram no epitélio glandular

**Tabela 1** Tipos de endometrose e aspecto histopatológico do endométrio. Adaptado de Lehmann et al. 2011.

Deste modo, uma biópsia que mostre mais do que 75% dos focos fibróticos pertencentes a um destes grupos será denominada endometrose "ativa", "inativa", "destrutiva" ou "não destrutiva" (Hoffmann et al., 2009b). Uma biópsia com proporções aproximadamente iguais de células do estroma periglandular ativas e inativas é denominada endometrose "mista" (Lehmann et al., 2011). Os vários tipos de endometrose representam diferentes fases do processo fibrótico. (Hoffmann et al., 2009a). O estado da fibrose pode ser avaliado pelo grau (número de camadas periglandulares de fibrose) e pela frequência (número de focos fibróticos por campo linear) (Kenney & Doig, 1986).

Durante o processo de fibrose, a acumulação de colagénio ocorre na maioria das vezes em torno das glândulas ou associado à membrana basal do epitélio luminal (Kenney & Doig, 1986).

O padrão de secreção uterina de uteroglobina, uterocalina, calbindina e uteroferrina durante a gestação é importante para o apoio nutricional do feto e para a manutenção da gestação (Lehmann et al., 2011). Algumas glândulas endometriais presas nas áreas de fibrose apresentam diferentes padrões destas proteínas uterinas quando comparadas às glândulas normais (Lehmann et al., 2011). Um padrão de secreção de proteínas uterinas alterado é provavelmente devido a uma estimulação parácrina alterada das glândulas por células do estroma fibrótico adjacentes, à falta de controlo hormonal e/ou à destruição epitelial progressiva (Hoffmann et al., 2009b).

Tanto as alterações endócrinas sazonais como as alterações endócrinas cíclicas não parecem ter influência sobre a atividade das células do estroma fibrótico, em contraste com as células do estroma não alteradas (Hoffmann et al., 2009a). Hoffmann et al. (2009) descobriram uma diminuição significativa da expressão dos recetores de estrogénio e progesterona nas células do estroma fibrótico em comparação com as células do estroma normal, o que se tornou uma das principais características da endometrose. Assim, as células do estroma fibrótico com uma expressão inadequada dos recetores hormonais são incapazes de reagir a alterações endócrinas e tornam-se independentes dos mecanismos de controlo hormonais no útero (Hoffmann et al., 2009a) e adquirem dinâmicas de diferenciação específicas (Lehmann et al., 2011). Em relação aos recetores de estrogénio e

progesterona do epitélio glandular, a sua expressão encontra-se ligeiramente aumentada em focos de fibrose ativa não destrutiva e ligeiramente diminuída na endometrose inativa não destrutiva (Lehmann et al., 2011). Além disso, assiste-se a uma diminuição acentuada da expressão destes recetores na endometrose destrutiva (Hoffmann et al., 2009a). A expressão diminuída dos recetores de estrogénio e progesterona do epitélio glandular na fibrose destrutiva pode ser causada pela degenerescência epitelial (Lehmann et al., 2011). Como resultado, a endometrose torna o endométrio inadequado para as suas funções, cruciais para a sobrevivência do jovem embrião, o que leva à perda precoce da gestação, tornando esta condição patológica a principal causa de infertilidade na égua (Rebordão et al., 2014).

### 2.3 Classificação de Kenney

A maioria das alterações degenerativas típicas da endometrose só pode ser diagnosticada através da avaliação histológica de uma biópsia do endométrio (Kenney, 1978; Kenney and Doig, 1986; Ricketts & Alonso, 1991; Schlafer, 2007; Snider et al., 2011; Aresu et al., 2012; Buczkowska et al., 2014). Para prever a capacidade de uma égua conceber e levar uma gestação a termo, Kenney (1978) desenvolveu uma classificação do endométrio com base na aparência histológica (glândulas, vasos sanguíneos e linfáticos) e na magnitude de alterações inflamatórias e fibrose. Actualmente, o sistema de classificação considerado o padrão internacional é o sistema de Kenney-Doig modificado, publicado pela primeira vez em 1986 (Tabela 2) (Snider et al., 2011).

<b>Categoria</b>	<b>Características principais</b>	<b>Taxa de partos esperada (%)</b>
I	Essencialmente normal; inflamação ou fibrose leve e dispersa	80-90
Ila	Inflamação ligeira e dispersa; fibrose reduzida; atrofia do endométrio no fim da época reprodutiva	50-80
Ilb	Inflamação moderada e dispersa; fibrose moderada	10-50
III	Alterações graves e irreversíveis, incluindo fibrose e inflamação	10

**Tabela 2** Escala de Kenney-Doig, adaptada de Snider et al. (2011).

## 2.4 Mecanismos fisiopatológicos da endometriose

Existem dois termos na literatura médica muito semelhantes: endometriose e endometriose (Snider et al., 2011). A endometriose é definida como a implantação extra-uterina de tecido do endométrio e está descrita em mulheres (Bulun, 2009). Em contraste, endometrose, como definida em equinos, foi introduzida por Kenney em 1992 como um termo geral para substituir "endometrite crônica degenerativa" (Allen, 1993).

A endometriose é considerada uma doença multifatorial (Aresu et al., 2012). A patogênese da fibrose é regulada por interações numa rede delicada de citocinas pró-fibróticas, componentes da matriz extracelular, células inflamatórias e hormonas (Atamas, 2002).

A fibrose começa como um processo normal de reparação dos tecidos (Usunier, Benderitter, Tamarat & Chapel, 2014). Os tecidos normais podem ser danificados sob várias condições por estímulos agudos ou crônicos. Na maioria dos casos, o processo de reparação consiste na substituição das células mortas e danificadas, restaurando assim a funcionalidade inata do órgão. A primeira etapa deste mecanismo, conhecida como a fase regenerativa, corresponde à substituição das células danificadas por células do mesmo tipo, assegurando assim a funcionalidade do órgão. Durante a segunda fase, conhecida como fibrose, o tecido conjuntivo substitui o tecido do parênquima lesionado (Usunier et al., 2014). Os miofibroblastos são ativados a partir de vários precursores para reparar tecidos danificados (Hinz, 2015a). A interação de fibroblastos, fibrócitos ou outras células residentes com o microambiente pode induzir a sua diferenciação em miofibroblastos (Usunier et al., 2014). Os miofibroblastos são células que possuem a maioria das características dos fibroblastos mas contêm uma maior quantidade de filamentos de actina e miosina, que são abundantes em células musculares lisas, e estão geralmente presentes na reparação das feridas (Junqueira & Carneiro, 2008). Os miofibroblastos são ativados em resposta a uma lesão do tecido e a sua principal função é reparar a matriz extracelular perdida ou danificada. São células contráteis que contribuem para a contração da ferida após a lesão, o que faz parte do processo de reparação normal e é crucial para restaurar a integridade do tecido (Hinz, 2015a). Produzem também grandes quantidades de colagénio I, o principal componente da matriz extracelular (Ueha, Shand & Matsushima, 2012). Além disso, os miofibroblastos podem afetar a composição e a quantidade de matriz extracelular através da secreção de diferentes mediadores (Hoffmann et al., 2009a). Posteriormente, os miofibroblastos sofrem normalmente apoptose após a reparação bem-sucedida do tecido (Hinz, 2015a). A matriz extracelular provisória é degradada pelas metaloproteinases da matriz (MMPs, Matrix Metalloproteinases), assim que a substituição total do tecido é alcançada. O equilíbrio subtil entre MMPs e seus inibidores, os inibidores tecidulares de metaloproteinases (TIMPs,

Tissue Inhibitors of Metalloproteinases), controla a acumulação e degradação da matriz extracelular ao longo do processo de reparação (Usunier et al., 2014).

No entanto, uma desregulação do processo de reparação normal pode levar à ativação persistente dos miofibroblastos (Hinz, 2015a). No caso de uma infeção bacteriana, isquémia, inflamação crónica, stress mecânico no tecido ou outros estímulos persistentes, inicia-se um ciclo constante de ativação de miofibroblastos, levando à acumulação excessiva de fibrose (Usunier et al., 2014). Os miofibroblastos ativados também produzem quimiocinas para recrutar células do sistema imunitário (macrófagos, células T e B, neutrófilos e eosinófilos), perpetuando a inflamação crónica. A matriz celular patológica invade progressivamente o tecido, tornando-se eventualmente numa cicatriz fibrótica permanente. A fibrose pode levar posteriormente ao mau funcionamento e falência do órgão (Usunier et al., 2014).

Os processos de reparação do endométrio são semelhantes aos que ocorrem nos outros tecidos e órgãos após uma lesão (Salamonsen, 2003). Os ramos glandulares do tecido endometrial normal não são normalmente envolvidos por colagénio (Nielsen, 2013). No entanto, o endométrio da égua, em resposta às bactérias ou a estímulos não-infecciosos, como o sémen que atinge o útero, tem a particularidade de desenvolver fibrose (deposição de colagénio) no estroma, levando à endometrose (Kenney, 1992; Hoffmann et al., 2009). A partir de um certo ponto a fibrose continua a progredir mesmo depois do processo inflamatório ter terminado, sendo pois a progressão do processo fibrótico depois de um ponto crítico independente da inflamação (Aresu et al., 2012). A associação entre uma infiltração inflamatória no endométrio e o grau avançado de endometrose tem sido descrita por diferentes autores (Kenney & Doig, 1986; Flores et al., 1995; Ferreira-Dias et al., 1994, 1999). No entanto, os mecanismos etiológicos e fisiopatológicos envolvidos na fibrose endometrial são ainda controversos (Rebordão et al., 2014).

Vários fatores têm sido propostos como potenciais indutores da endometrose.

#### **2.4.1 NETs**

Em resposta a estímulos inflamatórios, os neutrófilos (PMN) migram da circulação sanguínea e são recrutados para os locais de inflamação em diferentes tecidos. Eles são a primeira linha de defesa contra as bactérias invasoras (Brinkmann, 2011). Logo após a inseminação, a inflamação fisiológica do útero induzida pelo sémen e bactérias leva a um recrutamento de PMN ao útero da égua para resolver essa condição (Rebordão et al., 2014). Um novo paradigma da imunidade é que, além das funções clássicas dos PMN, a libertação extracelular de enzimas líticas e fagocitose, eles têm também a capacidade de libertar o seu DNA em resposta a estímulos infecciosos e de formar redes extracelulares de neutrófilos (NETs; neutrophil extracellular traps) (Brinkmann et al., 2004; Neeli et al., 2009).

As NETs consistem em grandes complexos de moléculas de DNA associadas que transportam proteínas citoplasmáticas e nucleares que aprisionam e eliminam bactérias no local da infecção (Lögters et al., 2009).

Cada uma dessas proteínas possui fortes propriedades antimicrobianas e/ou imunomoduladoras que estão envolvidas em respostas pró-inflamatórias e antimicrobianas, tais como a mieloperoxidase, elastase, histona e catepsina G, entre outras (Fuchs et al., 2007; Lögters et al., 2009; Brinkmann & Zychlinsky, 2012). No entanto, estas moléculas podem também contribuir para a lesão dos tecidos inflamados (Lögters et al., 2009). Rebordão et al. (2014) mostraram que as estirpes bacterianas não encapsuladas de *S. zooepidemicus*, *Escherichia coli* ou *Staphylococcus capitis*, conhecidas por causar endometrite em éguas, foram capazes de induzir a libertação de NETs *in vitro* por PMN de equinos em diferentes extensões. Éguas com endometrite causada por *E. coli* e/ou *S. zooepidemicus* apresentaram também a presença de NETs no útero (Rebordão et al., 2014). Enquanto os PMN desempenham um papel desejável no controlo da infecção por serem a primeira linha de defesa imunitária, podem também ter um efeito prejudicial sobre o útero através da libertação de moléculas que podem danificar ainda mais os tecidos inflamados circundantes e que podem contribuir para o desenvolvimento de fibrose (Lögters et al., 2009; Marcos et al., 2010). Assim, os papéis opostos das NETs explicam a sua capacidade para eliminar as bactérias no local da infecção no endométrio equino, enquanto por outro lado também podem induzir a libertação de moléculas nocivas para o endométrio, levando à endometrose (Rebordão et al., 2014).

#### **2.4.2 Citocinas**

As células alteradas segregam mediadores inflamatórios que levam à ativação plaquetária que por sua vez provoca a libertação de vários mediadores, incluindo fatores vasoativos, citocinas e quimiocinas, que possibilitam o recrutamento de leucócitos, que também produzem citocinas e quimiocinas que irão estimular as células endoteliais necessárias à neovascularização (Usunier et al., 2014). Vários fatores de crescimento e citocinas segregadas por células inflamatórias estão envolvidos em processos inflamatórios e fibrose em todos os tecidos do corpo (Wynn & Ramalingam, 2012). A ativação temporária das células do estroma fibrótico, que pode ser observada após uma endometrite induzida experimentalmente, é possivelmente causada por fatores de crescimento pró-fibróticos e citocinas libertados por células inflamatórias (Munson et al., 1995; Lee et al., 2001; Atamas, 2002). Está bem estabelecido que as citocinas regulam a fibrose através de um efeito duplo, por estimulação da proliferação de fibroblastos e da produção de colagénio (Atamas, 2002). Em tecidos inflamados, uma rede complexa de citocinas pró-fibróticas interage com a matriz extracelular, com os fibroblastos e com outras células para regular a deposição de colagénio

(Atamas, 2002). O Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) é considerado a principal citocina pró-fibrótica que intervém na resposta inflamatória, uma vez que causa a produção excessiva de matriz extracelular, aumenta a síntese de TIMPs, diminui a síntese de proteases e induz a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos (Grainger, 2007; Hinz, 2007; Leask & Abraham, 2004; Ruiz-Ortega et al., 2007; Taipale et al., 1998).

A inflamação do endométrio ou infecções recorrentes podem contribuir para a patogênese da fibrose. Este processo é provavelmente mediado pela ação dos constituintes das NETs libertados pelos PMN e pelas citocinas pró-fibróticas, entre outros fatores. Compreender a complexidade dos mecanismos de fibrose é vital para a identificação de potenciais alvos moleculares para futuras intervenções farmacológicas na prevenção e tratamento da endometriose na égua (Rebordão et al., 2014).

### **3. TGF $\beta$**

O fator TGF- $\beta$  é uma citocina da super-família TGF- $\beta$ , que além do TGF- $\beta$  inclui outras citocinas tais como proteínas morfogênicas ósseas, inibinas e activinas e a hormona anti-mülleriana (Moustakas & Heldin, 2009). Os mamíferos têm três formas diferentes de TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ 1, - $\beta$ 2, e - $\beta$ 3), sendo cada uma delas amplamente expressa em todo o organismo (Annes, Munger & Rifkin, 2003).

Todas as três isoformas iniciam os seus efeitos celulares utilizando os mesmos recetores com elevada afinidade para as mesmas na superfície das células, os recetores TGF- $\beta$  tipo I e tipo II (TGF $\beta$ RI e TGF $\beta$ RII). No entanto, apesar da utilização comum dos recetores, as isoformas têm funções biológicas diferentes (Sakai & Tager, 2013). O efeito do TGF- $\beta$  nas células depende não só do tipo de célula e do seu estado de diferenciação, mas também do conjunto de citocinas presentes no meio (Letterio & Roberts, 1992).

O TGF- $\beta$  controla o crescimento de tecidos e a morfogénese durante o desenvolvimento embrionário e a angiogénese (Siegel & Massague, 2003; ten Dijke & Arthur, 2007). Em tecidos adultos, o TGF- $\beta$  assegura a homeostase dos tecidos através do controlo da proliferação de células epiteliais, células endoteliais, células do sistema imunitário e fibroblastos (Feng & Derynck, 2005; ten Dijke & Arthur, 2007; Wakefield & Stuelten, 2007). Todas as isoformas do TGF- $\beta$  têm efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores e estão envolvidas em processos como a regulação da matriz extracelular mas também têm múltiplos efeitos pro-fibróticos e desempenham um papel central na cicatrização de feridas e na reparação de tecidos. O equilíbrio dessas ações é necessário para a manutenção da

homeostase dos tecidos (Branton & Kopp, 1999; Gressner, Weiskirchen, Breitkopf & Dooley, 2002).

### 3.1 TGF $\beta$ -1

O TGF- $\beta$ 1 realiza muitas funções celulares em vários tipos de células, incluindo o controle do crescimento, proliferação e diferenciação celular e apoptose (Gressner et al., 2002).

É encontrado em todos os tecidos mas é particularmente abundante nos ossos, pulmão, rim e tecido placentário. O TGF- $\beta$ 1 é produzido por quase todos os tipos de células do parênquima, incluindo fibroblastos, e também é produzido por células inflamatórias, tais como linfócitos, monócitos/macrófagos, células dendríticas e plaquetas (Branton & Kopp, 1999) e controla a diferenciação, proliferação, e estado de ativação destas células (Letterio & Roberts, 1998). Posteriormente a uma lesão ou inflamação, todas estas células são fontes potenciais de TGF- $\beta$ 1 (Branton & Kopp, 1999).

A sua expressão pode atuar de forma parácrina ou autócrina, uma vez que algumas das células que segregam TGF- $\beta$ 1 também têm recetores para esta citocina (Letterio & Roberts, 1998). O TGF- $\beta$ 1 pode promover um gradiente quimiotático de leucócitos e outras células que participam na resposta inflamatória e inibi-las depois de se tornarem ativas (Letterio & Roberts, 1998).

TGF- $\beta$ 1 regula a expressão de muitas proteínas da matriz extracelular. No animal adulto, a remodelação e degradação das proteínas da matriz estão em equilíbrio, controladas pelas ações celulares do TGF- $\beta$ 1 e outras citocinas. O TGF- $\beta$ 1 desempenha um papel central neste equilíbrio, estimulando a expressão de componentes da matriz como a fibronectina, colagénios e proteoglicanos (Branton & Kopp, 1999). A libertação e ativação do TGF- $\beta$ 1 estimula a produção de várias proteínas da matriz extracelular e inibe a sua degradação (Branton & Kopp, 1999). Quando a homeostase do tecido é perturbada, o TGF- $\beta$ 1 aumenta o recrutamento, proliferação e diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos e a produção de componentes da matriz extracelular (Sheppard, 2006). Estas ações do TGF- $\beta$ 1 contribuem para a reparação de tecidos, que em circunstâncias ideais conduzem ao restabelecimento da arquitectura do tecido normal e que pode envolver um componente de tecido fibroso (Branton & Kopp, 1999). No entanto, a expressão excessiva de TGF- $\beta$ 1 e a subsequente desregulação das suas funções contribui para um aumento patológico de fibrose num tecido que pode comprometer a função normal dos órgãos (Verrecchia & Mauviel, 2007). A desregulação das suas funções contribui também para o desenvolvimento de neoplasias, doenças autoimunes e vasculares (Blobe et al., 2000; van Bezooijen et al., 2007). Atualmente o TGF- $\beta$ 1 é considerado um dos principais indutores de fibrose, muitas vezes associado a doenças inflamatórias crónicas em vários órgãos, como a nefropatia

diabética, fibrose induzida por radiação, cirrose hepática, fibrose renal e fibrose pulmonar idiopática (Pohlers et al., 2009).

### **3.2 Síntese e libertação do TGF- $\beta$ 1**

O TGF- $\beta$ 1 é segregado como parte de um Large Latent Complex (LLC) que é armazenado na matriz extracelular e na superfície de algumas células, e que necessita de ser ativado extracelularmente para exercer qualquer um dos seus diversos efeitos biológicos (Munger et al., 1997; Sheppard, 2015).

Depois de ser sintetizado, o homodímero TGF- $\beta$ 1 interage com um Latency Associated Peptide (LAP) para formar um complexo designado por Small Latent Complex (SLC). Este complexo permanece na célula até ser ligado a outra proteína denominada Latent TGF- $\beta$ -Binding Protein (LTBP), formando um complexo maior designado por Large Latent Complex (LLC). É o LLC que é segregado para a matriz extracelular (Rifkin, 2005). A ligação do TGF- $\beta$ 1 à LTBP ocorre através da ponte de dissulfureto que permite que ele permaneça inativo, impedindo-o de se ligar aos seus recetores celulares (Annes et al., 2003). Após a sua secreção, permanece na matriz extracelular como um complexo inativo contendo a LTBP e a LAP, que necessitam ser processadas de modo a libertar o TGF- $\beta$ 1 (Annes et al., 2003). Consequentemente, existe um grande conjunto de TGF- $\beta$ 1 inativo no meio extracelular (Usunier et al., 2014).

TGF- $\beta$ 1 é único entre os fatores de crescimento armazenados na matriz extracelular por usar LTBPs e por exigir a libertação extracelular do seu pró-peptídeo protetor para promover a sinalização celular (Hinz, 2015b). O complexo inativo desta citocina possibilita uma adequada mediação da sinalização de TGF- $\beta$ 1, dado que os diferentes mecanismos celulares exigem níveis diferentes de sinalização de TGF- $\beta$ 1 (Annes et al., 2003)

### **3.3 Ativação do TGF- $\beta$ 1**

A ativação do TGF- $\beta$ 1 requer a sua libertação do LAP e da LTBP no LLC. Este processo envolve a sua libertação do Large Latent Complex (LLC) na matriz onde está ligado seguido por uma mudança conformacional ou proteólise do Latency Associated Peptide (LAP) para libertar o TGF- $\beta$ 1 para os seus recetores (Taylor, 2009).

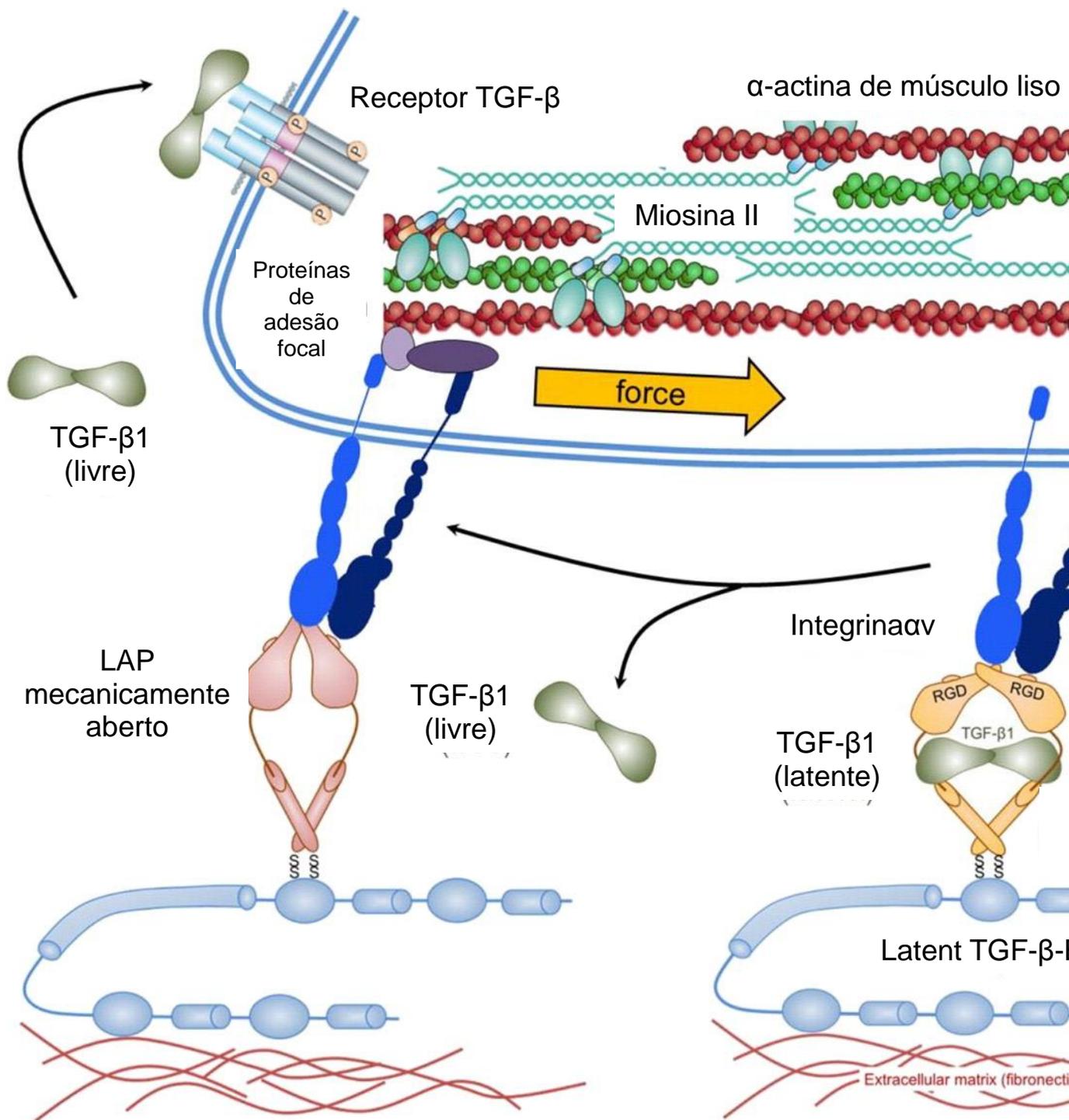
O TGF- $\beta$ 1 latente é convertido na sua forma biologicamente ativa através de vários mecanismos, que diferem de acordo com o tipo de célula e do contexto fisiológico (Wipff & Hinz, 2008). A clivagem proteolítica parece ser o mecanismo celular mais proeminente de ativação do TGF- $\beta$ 1 latente (Annes et al., 2003). A clivagem proteolítica de LLC e libertação do TGF- $\beta$ 1 ativo é realizada pela Bone Morphogenetic Protein 1 (BMP-1), por uma

variedade de MMPs, incluindo a MMP-2, MMP-3, MMP-9, e MMP-13, pela plasmina, trombina, elastase e por catepsina (Wipff & Hinz, 2008). Também a trombospondina ativa o TGF- $\beta$ 1 em tecidos lesionados (Kopp & Branton, 1999).

Mais recentemente, tem sido demonstrado que as integrinas ligam-se e em muitos casos ativam o TGF- $\beta$ 1 latente, particularmente em condições de inflamação e fibrose (Henderson et al., 2013). As integrinas são proteínas recetoras presentes na superfície das células (Junqueira & Carneiro, 2008). São extremamente importantes porque são as principais proteínas recetoras que as células utilizam para se ligarem e responderem à matriz extracelular (Alberts et al., 2002). São responsáveis pela ligação à maioria das proteínas da matriz extracelular, incluindo colagénio, fibronectina e lamininas (Alberts et al., 2002). As integrinas são constituídas por duas subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ , que se emparelham para formar heterodímeros. Há 18 $\alpha$  e 8 $\beta$  subunidades conhecidas que se combinam para formar pelo menos 24 heterodímeros distintos (Hynes, 2002). Elas podem mediar a fixação das células à matriz extracelular mas também participam nas interações especializadas de célula-célula (Barczyk, Carracedo & Gullberg, 2009). Uma célula pode regular a atividade das suas integrinas a partir do seu interior. As integrinas também funcionam como transdutores de sinal, ativando várias vias de sinalização intracelular, quando ativadas por ligações da matriz. As integrinas e os recetores de sinalização convencionais geralmente cooperam para causar o crescimento, sobrevivência e proliferação celular (Alberts et al., 2002).

A informação disponível atualmente apresenta pelo menos dois mecanismos distintos sobre como as integrinas podem participar na ativação de TGF- $\beta$ 1. No primeiro mecanismo, as integrinas servem como um local de fixação comum do TGF- $\beta$ 1 latente e das suas proteases de ativação, permitindo que a ação proteolítica das proteases ative o TGF- $\beta$ 1 (Wipff & Hinz, 2008).

O segundo mecanismo é independente de qualquer ação proteolítica e envolve forças de tração que são diretamente transmitidas ao LLC através da ligação da integrina. A alteração conformacional resultante no LLC liberta o TGF- $\beta$ 1 e apresenta-o ao seu recetor (Figura 2). Ambos os mecanismos não são mutuamente exclusivos e é possível que as células possam utilizar os dois mecanismos simultaneamente (Wipff & Hinz, 2008).



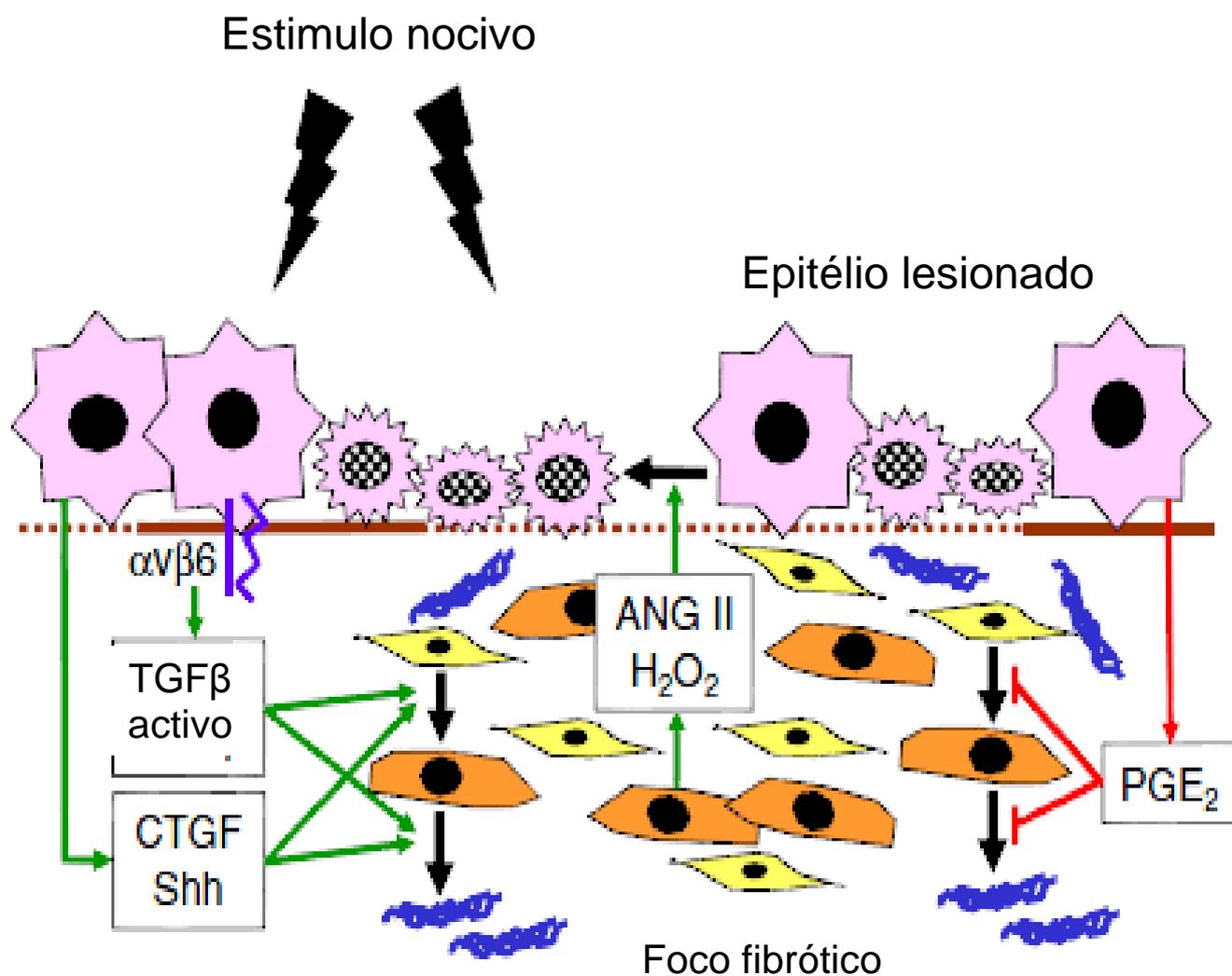
**Figura 2** Um modelo da ativação mecânica do TGF-β1 latente. O TGF-β1 latente é armazenado na matriz extracelular em conjunto com a Latent TGF-β Binding Protein (LTBP). A força de contração celular mediada por actina/miosina é transmitida pelas integrinas ao seu local de ligação no Latency Associated Peptide (LAP) e induz uma mudança de conformação que liberta o TGF-β1. Adaptado de Hinz, 2015

A primeira integrina a ser identificada como uma ativadora de TGF-β1 foi αvβ6 (Munger et al., 1999). A expressão de αvβ6 é restrita ao epitélio e na maior parte dos epitélios esta integrina é normalmente expressa em níveis baixos (Breuss et al., 1993). Em resposta a

lesões ou a inflamação, a expressão de  $\alpha\beta6$  aumenta (Breuss et al., 1995; Miller, Barnett, Sheppard, & Hyde, 2001).

TGF- $\beta$ 1 pode ser ativado *in vitro* por, pelo menos, quatro das integrinas contendo  $\alpha$  ( $\alpha\beta3$ ,  $\alpha\beta5$ ,  $\alpha\beta6$ ,  $\alpha\beta8$ ) (Coward, Saini & Jenkins, 2010). Mas nem todas as integrinas que se ligam ao Latency Associated Peptide (LAP) ativam o TGF- $\beta$ 1 latente e o tipo de integrina expressa sobre a superfície celular pode determinar o mecanismo de ativação do TGF- $\beta$ 1 latente (Wipff & Hinz, 2008).

Num trabalho sobre fibrose pulmonar, Sakai & Tager (2013) referem que a ativação não proteolítica do TGF- $\beta$ 1 pelas integrinas das células epiteliais e a apresentação do TGF- $\beta$ 1 ativo aos fibroblastos parece ser fundamentalmente devida a lesões recorrentes e/ou não resolvidas do epitélio alveolar (Figura 3).



**Figura 3** As interações entre o epitélio e os fibroblastos levam à progressão da fibrose pulmonar idiopática. Os estímulos ambientais inicialmente lesionam as células epiteliais alveolares, induzindo a sua apoptose e produção e/ou ativação de mediadores pró-fibróticos, incluindo TGF- $\beta$ 1. O TGF- $\beta$ 1 direciona a migração, proliferação, ativação e diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos, resultando na acumulação de miofibroblastos e de matriz extracelular no pulmão. Adaptado de Sakai & Tager, 2013

Assim, o epitélio alveolar danificado pode ser responsável pela fibrose ativa, levando à ativação e acumulação de fibroblastos. A capacidade das células epiteliais lesionadas de afetar o comportamento dos fibroblastos locais de uma forma parácrina foi demonstrada por experiências *in vitro*. Nestas experiências, a lesão mecânica das células epiteliais induziu a expressão de  $\alpha$ -actina do músculo liso ( $\alpha$ -SMA,  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin) e colagénio tipo I e III por fibroblastos, através da estimulação da ativação de TGF- $\beta$ 1 na matriz extracelular (Sakai & Tager, 2013).

Outros agentes podem induzir a ativação do TGF- $\beta$ 1 como radiações ionizantes (Ehrhart, Segarini, Tsang, Carroll & Barcellos-Hoff, 1997). Posteriormente, a acumulação de matriz extracelular no tecido, a morte de células endoteliais e o aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio e azoto (ROS e RNS, respectivamente) resultam em hipóxia e stress oxidativo durante a fibrose, o que leva a um aumento da apoptose celular e ativação de TGF- $\beta$ 1 (Usunier et al., 2014). A libertação de TGF- $\beta$ 1 contribui também para o recrutamento de neutrófilos, macrófagos e fibroblastos, que por sua vez libertam mais TGF- $\beta$ 1 (Wahl et al., 1987).

### 3.4 Efeitos do TGF- $\beta$ 1

Uma vez libertado dos seus complexos latentes, o TGF- $\beta$  interage com os seus recetores expressos por fibroblastos para induzir vários comportamentos pró-fibróticos (Sakai & Tager, 2013). O TGF- $\beta$ 1 ativo liga-se inicialmente ao recetor TGF- $\beta$  tipo II (TGF $\beta$ RII) que fosforila e heterodimeriza com o recetor TGF- $\beta$  tipo I (TGF $\beta$ RI) para formar um complexo ligando-receptor ativo. Este complexo inicia respostas pró-fibróticos em fibroblastos (Sakai & Tager, 2013). A sinalização do TGF $\beta$ RI ativo para o núcleo ocorre principalmente por fosforilação de mediadores citoplasmáticos de proteínas que pertencem à família Smad (Feng & Derynck, 2005). Uma vez no núcleo, as proteínas Smad ativam a transcrição de vários genes, incluindo genes que codificam membros da matriz extracelular, principalmente colagénios (Verrecchia & Mauviel, 2007). O TGF- $\beta$ 1 aumenta também a expressão de TIMPs e diminui a expressão e atividade de MMPs (Barrientos, Stojadinovic, Golinko, Brem

& Tomic-Canic, 2008). O TGF- $\beta$ 1 estimula fortemente a biossíntese de colagénio de tipo I, fibronectina e proteoglicanos, enquanto inibe a expressão de proteases, como a colagenase e transina e aumenta a expressão de inibidores de protease, como o inibidor do ativador de plasminogénio (Raghow, 1991; Jang et al., 2015). TGF- $\beta$ 1 contribui assim para aumentar a síntese de proteínas da matriz e diminuir a degradação dessas proteínas, resultando em fibrose tecidual (Kopp & Branton, 1999).

A ligação do TGF- $\beta$ 1 aos seus recetores induz também a ativação de uma cascata de sinalização que conduz à proliferação de células pró-fibróticas e ativa também a diferenciação de fibrócitos em fibroblastos (Usunier et al., 2014). Os fibroblastos sintetizam as proteínas colagénio e elastina, glicosaminoglicanos, proteoglicanos e glicoproteínas multiadesivas que fazem parte da matriz extracelular. São células com intensa atividade de síntese e estão também envolvidas na produção de fatores de crescimento que controlam a proliferação e diferenciação celular (Junqueira & Carneiro, 2008). TGF- $\beta$ 1 parece aumentar marcadamente a capacidade de os fibroblastos produzirem colagénio (Branton & Kopp, 1999). O TGF- $\beta$ 1 aumenta o recrutamento, proliferação e diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos (Sheppard, 2006). As alterações estruturais das categorias de endométrio IIb e III são altamente sugestivas da transformação de fibroblastos em miofibroblastos durante o desenvolvimento da fibrose periglandular equina (Ganjam & Evans, 2006). Um aumento local de TGF- $\beta$ 1 num tecido tem sido proposto como um acontecimento crítico na iniciação e progressão da fibrose nos tecidos (Weber and Brilla, 1991; Ou et al., 1996; Sun et al., 1997). A concentração de TGF- $\beta$ 1 no tecido endometrial aumenta proporcionalmente com o grau de gravidade da fibrose periglandular endometrial e sugere um papel desta citocina fibrogénica na progressão da fibrose periglandular equina (Sun et al., 1997).

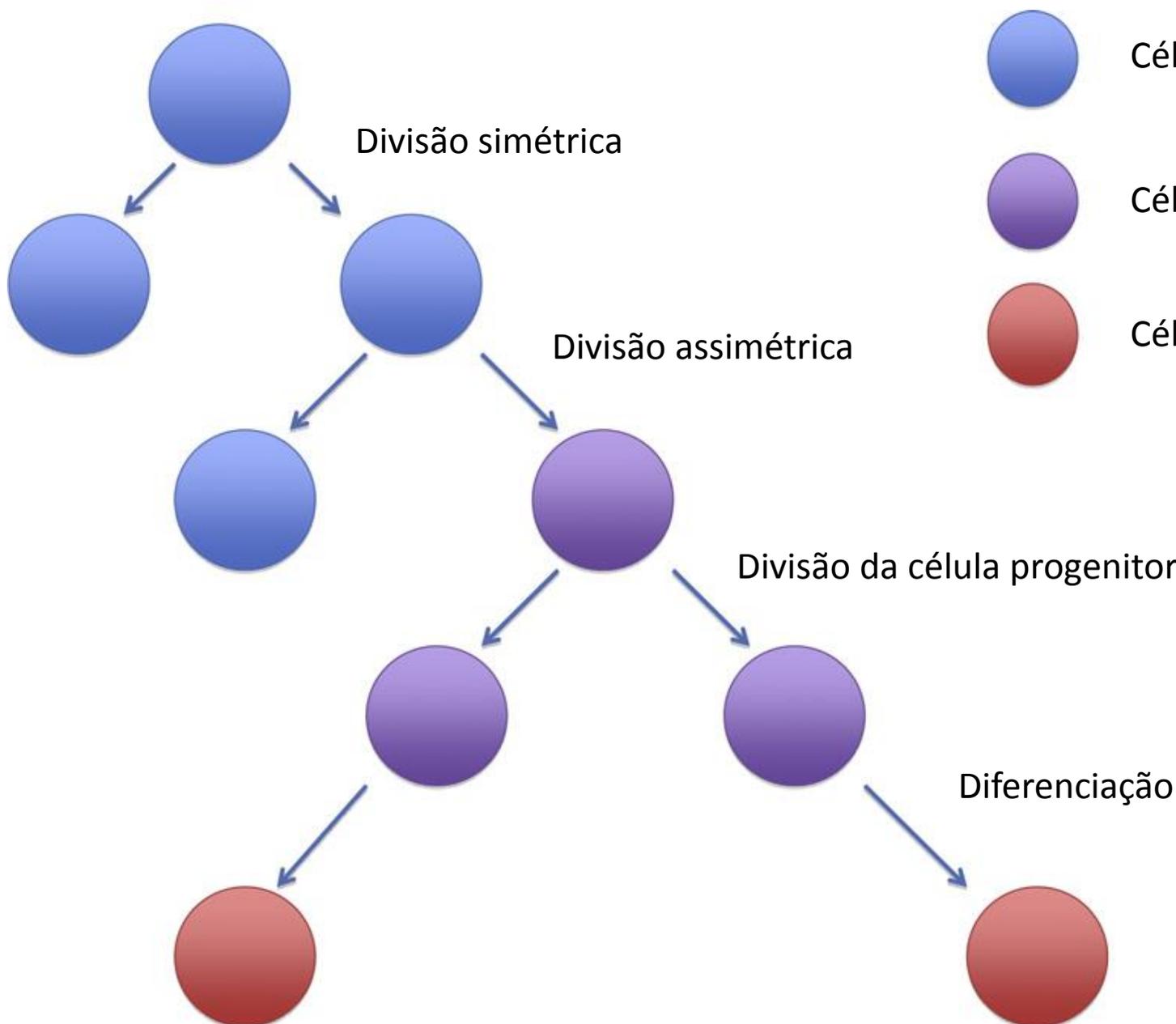
## **4. Células estaminais**

### **4.1 Introdução às células estaminais e à medicina regenerativa**

As células estaminais são células indiferenciadas comuns a todos os organismos multicelulares que retêm a capacidade de se autorrenovar, passando por numerosos ciclos de divisão celular ao longo da vida do indivíduo mantendo o estado indiferenciado, podendo ser diferenciadas em diversos tipos de células maduras e dar origem a vários tipos de células de diferentes tecidos, substituindo células que morrem ou que se perdem (Avasthi, Srivastava, Singh & Srivastava, 2008). Elas são consideradas as progenitoras de mais de 200 tipos de células presentes no corpo do adulto (Avasthi et al., 2008).

As células estaminais asseguram a sua autorenovação utilizando dois tipos de divisão celular: a divisão celular simétrica e assimétrica (Figura 4). Durante a divisão simétrica, cada uma das células estaminais dá origem a duas células filhas idênticas (Gattegno- Ho, Argyle,

& Argyle, 2012). As células estaminais multiplicam-se por mitose e apenas o suficiente para manter a sua população, que é reduzida (Junqueira & Carneiro, 2008). Durante o ciclo de divisão celular assimétrica uma célula estaminal dá origem a dois tipos de células, uma célula filha idêntica com todas as mesmas propriedades e potencial de divisão, e uma célula progenitora que tem o potencial de auto-renovação limitado (Gattegno-Ho et al., 2012). As células progenitoras têm uma potencialidade menor que as células estaminais (Junqueira & Carneiro, 2008) e uma célula progenitora pode passar por vários ciclos de divisão celular antes de se diferenciar numa célula madura (Avasthi et al., 2008). Pensa-se que a decisão inicial pela auto-renovação ou diferenciação seja aleatória, enquanto a diferenciação posterior seria determinada por agentes reguladores presentes no microambiente, de acordo com as necessidades do organismo (Junqueira & Carneiro, 2008).



**Figura 4** Diferenciação e divisão de células estaminais. Para manter a sua capacidade de auto-renovação, as células estaminais submetem-se a dois tipos de divisão, simétrica e assimétrica. Durante a divisão simétrica, cada uma das células estaminais dá origem a duas células filhas idênticas. A divisão assimétrica dá origem a uma célula filha idêntica e a uma célula progenitora parcialmente determinada. Adaptado de Gattegno-Ho et al. 2012

Em medicina veterinária já foram descritos tratamentos com células estaminais (Gattegno-Ho et al., 2012). Provavelmente, a utilização mais bem estabelecida de células estaminais em medicina veterinária é a utilização de células estaminais mesenquimatosas derivadas de tecido adiposo para o tratamento de doenças traumáticas e degenerativas, como osteoartrite e lesões de tendões e ligamentos em cavalos e cães (Gattegno-Ho et al., 2012). O interesse

recente na biologia de células estaminais de equinos e o rápido aumento em dados experimentais reflete a crescente atenção que este tema tem vindo a receber ao longo dos últimos anos (Peroni & Börjesson, 2011). As células estaminais mesenquimatosas já são usadas em clínica de equinos desde 2003, quando existiam apenas algumas publicações sobre o assunto. Desde essa altura, a utilização clínica de células estaminais mesenquimatosas aumentou exponencialmente, com milhares de cavalos tratados em todo o mundo (Börjesson & Peroni, 2011). O isolamento e cultura de células estaminais mesenquimatosas de algumas espécies, tais como o cavalo e o cão, representam um procedimento muito simples (Gattegno-Ho et al., 2012). A facilidade de isolamento e o potencial de diferenciação em várias linhagens celulares, juntamente com a baixa imunogenicidade fazem destas células candidatas ideais para estratégias terapêuticas de reparação de tecidos em seres humanos e animais (Gattegno-Ho et al., 2012). O desenvolvimento de tratamentos com células estaminais parece bastante promissor tanto em medicina humana como veterinária, principalmente em condições em que a reparação com tecido fibroso ou que a natureza degenerativa da doença impede a recuperação funcional do órgão ou tecido (Stewart, 2011). A terapêutica com células estaminais para o tratamento da fibrose em qualquer órgão deve ser considerada e estudada pois exibe um potencial promissor (Usunier et al., 2014).

#### **4.2 Classificação e características das células estaminais**

Existem duas grandes categorias de células estaminais, dependendo do estadio de desenvolvimento a partir do qual são obtidas: células estaminais embrionárias (ESCs, Embryonic Stem Cells) e células estaminais adultas (ASCs, Adult Stem Cells) (Fortier, 2005; Gattegno-Ho et al., 2012). A potência específica a diferença de potencial das células estaminais (Avasthi et al., 2008). As células estaminais totipotentes são produzidas a partir da fusão de um ócito e um espermatozoide (Avasthi et al., 2008). Num estadio inicial de desenvolvimento embrionário (mórula), as células são também totipotentes, sendo capazes de originar todas as células do organismo e os anexos fetais (De Schauwer et al., 2011). As células estaminais pluripotentes são as descendentes de células totipotentes e podem diferenciar-se em células derivadas dos três folhetos embrionários: endoderme, mesoderme e ectoderme (Gattegno-Ho et al., 2012). Estas células estaminais podem dar origem a qualquer tipo de tecido no organismo exceto a placenta. As células estaminais pluripotentes originam-se da massa celular interna de um blastocisto. As células estaminais multipotentes podem apenas diferenciar-se em células derivadas do seu folheto embrionário de origem e assim podem dar origem a células de uma família intimamente relacionada, como por exemplo as células estaminais hematopoiéticas, que se podem diferenciar em eritrócitos,

leucócitos, plaquetas, etc. Células estaminais unipotentes podem produzir apenas um tipo de célula, mas têm a propriedade de auto-renovação, que as distingue das células não estaminais (Avasthi et al., 2008; Gattegno-Ho et al., 2012).

#### **4.2.1 Células estaminais embrionárias**

De acordo com a definição mais frequente, consideram-se células estaminais embrionárias, (ESCs), como as células presentes na massa celular interna do blastocisto, dando origem aos três folhetos embrionários: endoderme, mesoderme e ectoderme (Gattegno-Ho *et al.*, 2012). Elas podem originar cada um dos 220 tipos de células do organismo adulto quando recebem a estimulação necessária para um tipo de célula específico (Avasthi et al., 2008). São consideradas células pluripotentes por se conseguirem diferenciar em células derivadas de qualquer um destes três folhetos embrionários (De Schauwer *et al.*, 2011; Gattegno-Ho *et al.*, 2012). As ESCs podem ser mantidas em cultura como células indiferenciadas ou podem ser induzidas a diferenciarem-se em várias linhagens diferentes (Avasthi et al., 2008). As ESCs não são reconhecidas pelas defesas imunitárias do recetor devido à fase inicial de desenvolvimento em que se encontram (Gattegno-Ho et al., 2012). A propriedade das ESCs de humano e ratinho de se auto-renovar indefinidamente, mantendo a pluripotência, instigou uma série de pesquisas sobre a sua potencial utilização em várias terapêuticas. Além de permitirem melhorar a compreensão de vias celulares e bioquímicas, a sua descoberta abriu muitas portas. No entanto a sua utilização tornou-se controversa, uma vez que no caso de ESCs humanas, a exigência de um embrião humano para derivar as células não é considerada moralmente ética (Gattegno-Ho et al., 2012).

#### **4.2.2 Células estaminais adultas**

As células estaminais adultas, também conhecidas como células estaminais somáticas, são células indiferenciadas encontradas em todo o corpo que se dividem para repor as células que morrem e para regenerar os tecidos danificados. A medula óssea é a principal fonte de células estaminais adultas (Avasthi et al., 2008). As células estaminais localizadas fora da medula óssea são geralmente referidas como células estaminais de tecidos e estão situadas em locais denominados nichos, que são ambientes celulares especializados que fornecem as células estaminais necessárias para apoiar a auto-renovação (Avasthi et al., 2008). As células estaminais adultas são estimuladas a entrar na circulação sistêmica e migrar para os locais lesionados em resposta a estímulos quimiotáticos. A localização perivascular da maioria dos nichos de células estaminais facilita essa mobilização (Stewart, 2011).

Dependendo da sua origem, as células estaminais adultas podem ainda ser classificadas em: células estaminais hematopoiéticas (HSCs, *hematopoietic stem cells*), que se encontram na medula óssea e são as células que dão origem a todos os tipos de células sanguíneas, que inclui a linhagem linfóide (células T, células B, células NK, algumas células dendríticas) e mielóide (monócitos e macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, eritrócitos, megacariócitos / plaquetas e algumas células dendríticas); células estaminais mesenquimatosas (MSCs, *Mesenchymal Stem Cells*) e células estaminais neurais (NSCs, *Neural Stem Cells*), entre outras (Avasthi et al., 2008). Em comparação com as ESCs, as ASCs são consideradas multipotentes, na medida em que são capazes de produzir todos os tipos de células para o sistema de órgãos específico a partir do qual elas são derivadas (Gattegno-Ho et al., 2012). Os organismos multicelulares requerem a existência de ASCs e de um mecanismo preciso de controlo para manter a homeostase do tecido (Gattegno-Ho et al., 2012). As ASCs podem autorrenovar-se dentro de um tecido específico por períodos indefinidos e também têm a capacidade única de manter o potencial de se dividir assimetricamente em células-filhas idênticas e em tipos de células especializadas, dependendo do ambiente circundante (Gattegno-Ho et al., 2012). A ativação e proliferação de ASCs é o mecanismo mais comum de regeneração de tecidos nos seres humanos e animais (Gattegno-Ho et al., 2012). Mesmo que todas as ASCs tenham a mesma capacidade de se auto-renovar e manter a homeostase dos tecidos, a sua atividade depende muito do ambiente do nicho onde estão inseridas. Por exemplo, as ASCs do intestino apresentam uma taxa mais elevada de proliferação em comparação com células estaminais hematopoiéticas (HSCs) (Gattegno-Ho et al., 2012). O papel fundamental que as ASCs desempenham na homeostase e na regeneração tecidual sugere que elas podem oferecer um grande potencial terapêutico (Gattegno-Ho et al., 2012). Recentemente, um grupo de ASCs tem atraído muita atenção devido ao seu potencial terapêutico, as células estaminais mesenquimatosas (MSCs) (Gattegno-Ho et al., 2012).

### **4.3 Células estaminais mesenquimatosas**

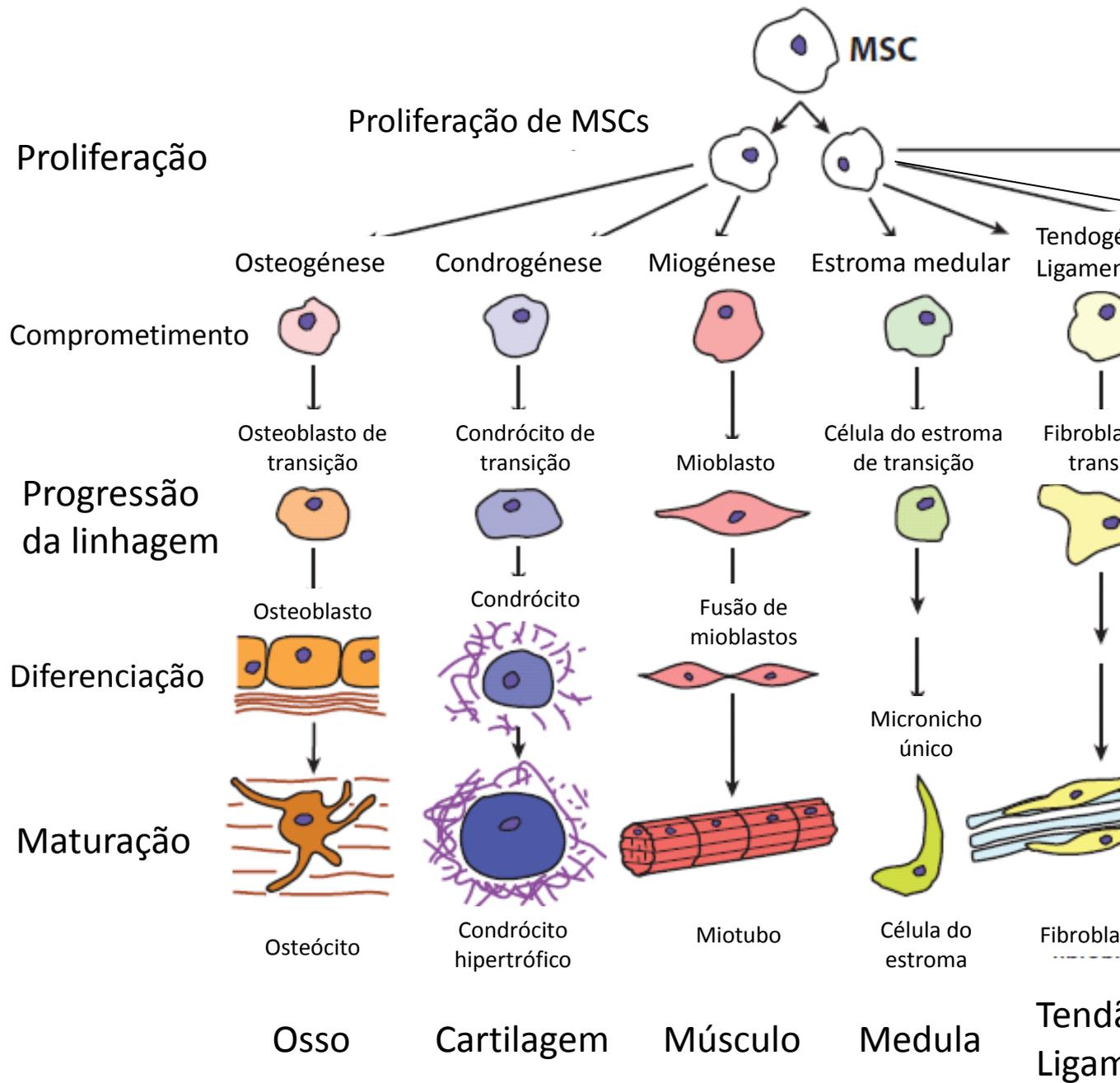
#### **4.3.1 Origem**

As células estaminais mesenquimatosas (MSCs) são células estaminais que residem na região não-hematopoiética rica em tecido conjuntivo da medula óssea (Gattegno-Ho et al., 2012). Na medula óssea, as MSCs fazem parte da população de células do estroma da medula que apoia coletivamente a persistência e diferenciação das células estaminais hematopoiéticas (Stewart & Stewart, 2011). As células estaminais mesenquimatosas derivadas da medula óssea (BM-MSCs, Bone marrow-derived mesenchymal stem cells) são conhecidas por apoiar naturalmente a hematopoiese através da secreção de várias

moléculas tróficas, incluindo glicoproteínas solúveis da matriz extracelular, citocinas e fatores de crescimento (Jang et al., 2015). No entanto, desde esta descrição inicial, reconhece-se agora que as MSCs residem em pequenas quantidades em muitos, se não todos, os tecidos e órgãos adultos e desempenham um papel ativo na homeostase desses tecidos (Stewart & Stewart, 2011; Mambelli et al., 2014). Atualmente em equinos, as células estaminais mesenquimatosas (MSCs) são isoladas a partir de vários tecidos, incluindo a medula óssea, sangue, tecido do cordão umbilical e tecido adiposo, os quais constituem a alternativa mais promissora para fins clínicos e de investigação, devido ao fácil acesso (Peroni & Börjesson, 2011; Falomo, Ferroni, Tocco, Gardin & Zavan, 2015). Quanto mais se descobre sobre fontes alternativas de MSCs, menos complexas se tornam as recolhas de amostras e melhor se desenvolvem as suas aplicações clínicas (Stewart & Stewart, 2011).

#### **4.3.2 Caraterísticas**

As células estaminais mesenquimatosas são multipotentes, podem ser encontradas *in vivo* em pequenos números e têm a capacidade de se diferenciar em vários tecidos derivados da mesoderme, incluindo osso, cartilagem, tendão, músculo, tecido adiposo e outros tipos de tecido conjuntivo, dependendo dos estímulos e condições de cultura (Singer & Caplan, 2011; Mambelli et al., 2014). Podem também multiplicar-se *in vitro* e, sob condições apropriadas, podem dar origem a vários tipos de células (Figura 5) (Singer & Caplan, 2011; Peroni & Börjesson, 2011).



**Figura 5** As MSCs podem diferenciar-se em osso, músculo ou tecido adiposo, dependendo dos estímulos a que são expostas *in vitro*. É mostrada uma hipótese do processo mesengénico que as MSCs sofrem tanto *in vitro* como *in vivo*. Adaptado de Singer & Caplan, 2011.

As funções fisiológicas de MSCs foram mais extensamente estudadas no contexto da homeostase da medula óssea (Nicolay, Perez, Debus & Huber, 2015). A secreção de proteínas da matriz tais como N-caderina, anexina II e VCAM-1 por MSCs sugere que contribuem para a regulação da proliferação, diferenciação e mobilização de células

estaminais hematopoiéticas dentro da medula óssea através da secreção de várias moléculas e citocinas (Nicolay et al., 2015).

As células estaminais mesenquimatosas (MSCs) foram isoladas pela primeira vez a partir da medula óssea e caracterizadas por Friedenstein em 1974, utilizando a capacidade destas células em aderir ao plástico para cultura de tecidos (Friedenstein, Deriglasova & Kulagina, 1974). Também em medicina veterinária, a aderência ao plástico e o crescimento numa monocamada são características comuns a todas as populações de MSCs isoladas (Koch, Heerkens, Thomsen & Betts 2007). As MSCs são normalmente identificadas por uma combinação de características moleculares e funcionais. Eles expressam os marcadores de superfície celular CD13, CD29 / ITGB1, CD44, CD73, CD90, CD105 e CD106 / VCAM-1 e, tipicamente não têm proteínas de superfície hematopoiéticas CD31 / PECAM-1, CD34, CD45 / ACV e CD116 (Nicolay et al., 2015). Até à data, não foi definido um padrão único de marcadores de superfície para a identificação destas células estaminais (Nicolay et al., 2015). Assim, são usadas outras características fenotípicas e funcionais para caracterizar as MSCs, tais como a sua forma fusiforme semelhante a fibroblastos, a capacidade de aderir a superfícies de plástico e seu potencial de diferenciação *in vitro* ao longo das linhagens osteogénica, adipogénica e condrogénica (Nicolay et al., 2015). As MSCs apresentam baixa imunogenicidade pois conseguem escapar à resposta imunitária e não induzem nem a proliferação nem a ativação dos linfócitos T. Isto torna-as ideais para tratamentos de pacientes imunodeprimidos pois podem ser administradas sem ser necessário causar imunossupressão (Álvarez, Levine & Rojas, 2015). Embora o estudo com MSCs de diferentes tecidos em equinos esteja apenas no início, as MSCs de equinos parecem ser muito semelhantes às de outras espécies descritas até hoje (Peroni & Börjesson, 2011).

Apesar das MSCs serem capazes de uma divisão celular considerável, esta capacidade é limitada (Stewart & Stewart, 2011). Neste aspecto, as MSCs diferem das células estaminais embrionárias. As células estaminais adultas estão num estado quase-inativo *in vivo*, sendo as divisões celulares raras (Stewart & Stewart, 2011). Contudo, há um aumento acentuado da proliferação de MSCs *in vitro*. A taxa de proliferação e persistência das MSCs varia com a origem do tecido e entre os diferentes locais anatómicos do mesmo tecido (Stewart & Stewart, 2011). Em geral, as células estaminais derivadas da medula óssea têm uma menor capacidade de proliferação do que as MSCs derivadas de outros tecidos. Essa diferença pode refletir o diferencial na proliferação *in vivo* destas populações de MSCs (Stewart & Stewart, 2011). Ao contrário das HSCs, as MSCs podem propagar-se *in vitro* até 40 a 50 duplicações celulares sem diferenciação (Singer & Caplan, 2011). As MSCs estão presentes em todos os tecidos vascularizados. Devido ao facto de a densidade vascular diminuir com a idade, a disponibilidade local de MSCs diminui também substancialmente com o envelhecimento (Singer & Caplan, 2011). As MSCs apresentam *in vitro* propriedades imunomoduladoras notáveis na reparação de tecidos, sendo por isso a sua potencial

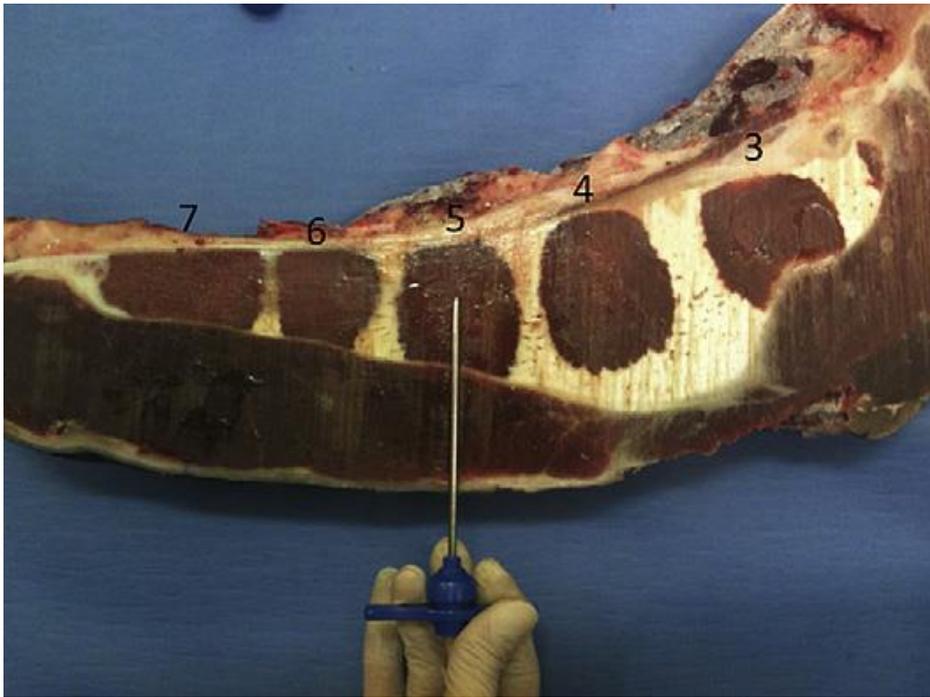
utilização como agentes terapêuticos *in vivo* extensivamente estudada (Mambelli et al., 2013).

#### **4.4 Colheita de células estaminais mesenquimatosas derivadas da medula óssea**

Em equinos, as células estaminais mesenquimatosas derivadas da medula óssea (BM-MSCs, Bone Marrow derived Mesenchymal Stem Cells) são frequentemente isoladas de aspirados da medula óssea, recolhidas a partir do esterno, sendo a quinta estérnebra o local mais seguro para a aspiração (Figura 6) (Kasashima, Ueno, Tomita, Goodship & Smith, 2011). Embora os primeiros 5 ml de um aspirado são os que contêm maior quantidade de MSCs, é recomendado um volume de aspirado entre 10 a 20 ml (Kasashima et al., 2011).

Devido ao facto das MSCs serem células raras e do seu número diminuir com a idade, a escolha de dadores para a recolha destas células é mais indicada em cavalos jovens (até 7 anos de idade). Nestes animais, há aproximadamente 10 a 100 MSCs por  $1 \times 10^5$  células da medula óssea (Börjesson & Peroni, 2011).

Resumidamente, o cavalo é sedado com um agonista de  $\alpha^2$  com ou sem opiáceo e é realizada a tricotomia de uma área de 10 cm<sup>2</sup> sobre o esterno (Taylor & Clegg, 2011). As estérnebras são palpadas e em seguida é realizada a ultrassonografia com uma sonda linear de 10 MHz para identificar duas estérnebras e o espaço interesternal. O local é então limpo e preparado assepticamente e se necessário, o local é identificado com uma caneta estéril (Taylor & Clegg, 2011). É administrada analgesia local e é feita uma incisão sobre a estérnebra com uma lâmina de bisturi. Uma agulha Jamshidi de calibre 12 é introduzida na incisão e avançada até que contacte com o osso. A agulha é então avançada 1,5 cm através do osso cortical da estérnebra para o interior da cavidade medular (Taylor & Clegg, 2011). Uma seringa de 20 ml pré-carregada com 5000 UI de heparina é ligada à agulha Jamshidi e 10 a 15 ml de medula óssea são aspirados (Figura 7). A amostra aspirada é misturada e transferida assepticamente para um tubo falcon estéril de 20 ml. Locais alternativos para aspiração da medula óssea incluem a tuberosidade coxal, tibia e úmero (Taylor & Clegg, 2011).



**Figura 6** Corte sagital do esterno de um equino, exibindo o posicionamento correto de uma agulha Jamshidi dentro da cavidade medular da quinta estérnebra. Adaptado de Taylor & Clegg, 2011.



**Figura 7** Aspiração de medula óssea através do esterno em equinos. Introdução de uma agulha Jamshidi através de uma pequena incisão sobre a quinta estérnebra e aspiração de medula óssea. Adaptado de Kasashima et al., 2011

#### **4.5 Isolamento, cultura e proliferação de células estaminais mesenquimatosas derivadas da medula óssea**

A densidade das MSCs na medula óssea é muito baixa, por isso foram desenvolvidas técnicas *in vitro*, com o objetivo de aumentar o número de MSCs (Taylor & Clegg, 2011; Kasashima et al. 2011). A produção de MSCs para uso clínico deve seguir boas práticas de produção para garantir a realização de uma terapêutica celular segura e eficiente. Várias técnicas de isolamento e cultura de MSCs derivadas da medula óssea já foram descritas com diferentes protocolos, embora sejam necessárias avaliações comparativas para orientar na seleção de protocolos ideais (Taylor & Clegg, 2011).

O aspirado de medula óssea puro pode ser transferido para frascos para cultura de tecidos numa câmara de fluxo laminar e cultivado com um meio de crescimento (DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium), 10% de soro fetal de bovino, penicilina e estreptomicina: aproximadamente 1 ml de aspirado de medula óssea adicionado a um frasco para cultura de tecidos T75 contendo 18 ml de meio de crescimento (Taylor & Clegg, 2011). Alternativamente, o aspirado de medula óssea pode ser centrifugado a 1000 x g durante 15 minutos e a fração celular é suspensa no meio antes de ser semeada (Taylor & Clegg, 2011). Mais vulgarmente, o aspirado de medula óssea é colocado numa solução de gradiente de densidade e a fração de células mononucleares é separada por centrifugação, antes da cultura. O gradiente de densidade separa a fração de células mononucleares dos eritrócitos, plaquetas, granulócitos, e precursores imaturos do aspirado inicial (Taylor & Clegg, 2011). As duas soluções de gradiente de densidade mais usadas em equinos são o Ficoll e Percoll (Taylor & Clegg, 2011).

A fração mononuclear do aspirado é recolhida e semeada em frascos para cultura de tecidos a  $1-25 \times 10^3$  MSC/cm<sup>2</sup> (Taylor & Clegg, 2011). A densidade de revestimento é altamente variável tanto entre laboratórios como entre os tipos de tecido (Börjesson & Peroni, 2011). Densidades de revestimento mais baixas permitem um maior número de células aderentes. Esta técnica "clássica" usada para selecionar MSCs derivadas da medula óssea é baseada na capacidade daquelas de aderir ao plástico dos frascos para cultura de tecidos (Taylor & Clegg, 2011). As MSCs equinas podem ser semeadas em frascos para cultura de tecidos padrão e cultivadas em condições de incubação padrão (37 °C com 5% de CO<sup>2</sup> e 21% de O<sup>2</sup>) (Börjesson & Peroni, 2011).

As condições de cultura podem ser modificadas para melhorar o isolamento e a proliferação de MSCs a partir de diferentes tecidos ou para determinar a diferenciação para uma linhagem celular específica (Börjesson & Peroni, 2011). As condições de cultura ideais mantêm as MSCs com características fenotípicas e funcionais semelhantes às exibidas no seu nicho original, com capacidade de auto-renovação e a capacidade de se diferenciarem em várias linhagens (Börjesson & Peroni, 2011).

As MSCs equinas crescem rapidamente num meio com o mínimo essencial (usualmente baixo teor de glucose, DMEM ou um meio essencial mínimo) com glutamina e 1% de penicilina / estreptomicina. Este meio facilita a proliferação das MSCs, limitando o crescimento de outras células sanguíneas, incluindo células hematopoéticas e macrófagos (Börjesson & Peroni, 2011). A cultura de MSCs é normalmente realizada num meio de crescimento contendo 10% de soro fetal de bovino (FBS, fetal bovine serum) para fornecer proteínas essenciais para a adesão e crescimento celular (Taylor & Clegg, 2011). Antibióticos e agentes antifúngicos são normalmente adicionados ao meio de crescimento (100 U / mL de penicilina, 100 mg / mL de estreptomicina, e 2,5 mg / mL de anfotericina B). A composição específica do meio de crescimento varia em diferentes estudos publicados (Taylor & Clegg, 2011). A proliferação de MSCs ocorre após uma fase de latência inicial de 5 a 10 dias, seguida de uma rápida multiplicação com um tempo médio de duplicação da população celular de 12 a 36 horas (Börjesson & Peroni, 2011). O meio é normalmente mudado a cada 2 a 3 dias durante a cultura das células (Taylor & Clegg, 2011).

Se se permitir que as células se sobreponham, podem tornar-se senescentes ou podem começar a diferenciar-se (Taylor & Clegg, 2011). Uma incubação demasiado longa e de elevada densidade celular são fatores determinantes para a perda de potencial de diferenciação das MSCs equinas (Börjesson & Peroni, 2011). Foi recentemente demonstrado que as MSCs equinas derivadas da medula óssea (BM-MSCs) alcançam a senescência mais rapidamente do que MSCs derivadas de tecido adiposo ou do cordão umbilical. As BM-MSCs tornam-se senescentes após 30 duplicações da população em comparação com 60 a 80 duplicações da população de MSCs derivadas de tecido adiposo ou do cordão umbilical (Taylor & Clegg, 2011).

Assim que as MSCs estão confluentes, as células são libertadas do frasco para cultura de tecidos por digestão com tripsina e recuperadas (Taylor & Clegg, 2011). Quando o descolamento celular é observado ao microscópio, as células são então pipetadas para cima e para baixo várias vezes para produzir uma suspensão de células individuais, sendo então transferidas para um tubo Falcon estéril. A suspensão de células é centrifugada a 1100g durante 4 minutos e o sedimento celular é ressuspenso num volume apropriado de meio de cultura de células após a contagem destas (Taylor & Clegg, 2011). As células são depois injetadas ou implantadas num paciente. É importante direcionar as células estaminais para o local da lesão para assegurar que se distribuem pelo tecido (Nadig, 2009)

#### **4.6 Efeitos anti-inflamatórios, imunomoduladores e anti-fibróticos da terapêutica com células estaminais mesenquimatosas**

Vários estudos e experiências clínicas sugerem que as MSCs têm um papel na regeneração de lesões em diferentes tecidos (Nicolay et al., 2015). As MSCs podem migrar para os locais da lesão e diferenciam-se em células funcionais de tecidos específicos, podendo também criar um microambiente de apoio dentro da lesão através da secreção de várias moléculas que actuam por via parácrina, apoiando assim outros tipos de células na regeneração de lesões teciduais (Nicolay et al., 2015). No entanto, permanece a controvérsia se as MSCs contribuem principalmente para a regeneração da lesão integrando-se nela e diferenciando-se em células do tecido lesionado ou através da secreção de fatores anti-inflamatórios, vasoativos e imunomoduladores (Peroni & Börjesson, 2011). Análises ao perfil das proteínas segregadas por MSCs indicam que estas células segregam uma gama diversificada de citocinas, fatores de crescimento, quimiocinas, mediadores inflamatórios e proteínas imunomoduladoras que atuam para inibir a formação de cicatriz, inibir a apoptose, aumentar a angiogénese e estimular as células progenitoras intrínsecas para regenerar a função do tecido. (Stewart & Stewart, 2011; Börjesson & Peroni, 2011).

##### **4.6.1 Propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras**

As MSCs segregam um conjunto diversificado de moléculas bioativas que são imunomoduladoras (Mambelli et al., 2014). O efeito imunomodulador das MSCs tem sido extensivamente estudado e documentado, particularmente por causa da sua importância no transplante de órgãos (Usunier et al., 2014). Avanços recentes na imunobiologia das MSCs têm levado ao aumento do interesse na sua utilização como uma nova modalidade terapêutica para tratar a inflamação crónica associada à fibrose (Usunier et al., 2014). As MSCs exibem potentes efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores através de interações celulares e/ou libertação de fatores solúveis para o meio ambiente local (Peroni & Börjesson, 2011). As MSCs influenciam as respostas imunitárias do hospedeiro *in vivo* e *in vitro* por interagirem com quase todas as células do sistema imunitário, incluindo linfócitos B e T, células NK (natural Killer), células dendríticas (DC), macrófagos / monócitos e neutrófilos (Peroni & Börjesson, 2011).

As MSCs inibem a proliferação dos linfócitos T, bloqueando-os na fase G0 / G1 do ciclo celular (Singer & Caplan, 2011; Usunier et al., 2014). Inibem também a produção de imunoglobulinas por plasmócitos (IgA, IgG, e IgM) e a diferenciação dos linfócitos B (Singer & Caplan, 2011; Usunier et al., 2014). Induzem uma alteração da polaridade nos linfócitos T de um estado pró-inflamatório Th1 para uma condição anti-inflamatória Th2 (Usunier et al.,

2014) e inibem a diferenciação e maturação das células dendríticas (Singer & Caplan, 2011). Além disso, as MSCs inibem a atividade citotóxica das células Natural Killer (NK), reduzem a produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ) e IFN- $\gamma$  (interferão- $\gamma$ , que exerce um efeito pró-inflamatório através da indução da IL-6 e TNF- $\alpha$ ) e aumentam a expressão das citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10, o que sugere a transição dos linfócitos T para um perfil Th2 (Usunier et al., 2014). Depois do transplante de MSCs, uma diminuição da infiltração de monócitos / macrófagos, neutrófilos, e linfócitos no tecido foi observada em vários modelos, que pode ser devida em alguns casos à diminuição da expressão da proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1, Monocyte Chemoattractant Protein 1) (Usunier et al., 2014).

Foi também observada uma diminuição da apoptose celular em tecidos fibróticos após o tratamento com MSCs. Por isso, os seus efeitos anti-apoptóticos também podem ser discutidos, uma vez que a diminuição da apoptose celular leva à redução da inflamação (Usunier et al., 2014). As principais moléculas bioativas responsáveis por este processo são o fator de crescimento de hepatócitos (HGF, Hepatocyte Growth Factor), o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor) e o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1, Insulin-like Growth Factor 1), entre outros (Singer & Caplan, 2011). As MSCs alteram assim a função de células imunitárias, levando a um aumento de citocinas anti-inflamatórias e a uma diminuição das citocinas pró-inflamatórias e apoptose celular (Usunier et al., 2014).

A capacidade imunomoduladora das MSCs é dependente de vários fatores, incluindo a sua ativação, o tecido de origem, a dose de MSCs, a fase da lesão e o contato das MSCs com as células do sistema imunitário (Peroni & Börjesson, 2011). As MSCs não segregam proteínas imunomoduladoras na ausência de ativação. *In vitro*, as células T ativas, citocinas tais como o interferão- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) ou o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), são utilizados para ativar as MSCs (Peroni & Börjesson, 2011). Outros estímulos que parecem ativar as MSCs são o TGF- $\beta$ 1, a interação com os monócitos CD14+ e a citocina pró-inflamatória IL-1 $\beta$  (Singer & Caplan, 2011). Por sua vez, as MSCs então ativadas produzem citocinas imunomoduladoras como a interleucina-6 (IL-6), a prostaglandina E2 (PGE2) e variavelmente podem produzir óxido nítrico (NO). Estas citocinas levam posteriormente à diminuição da proliferação de linfócitos (Peroni & Börjesson, 2011). As MSCs não necessitam de ser ativadas para serem utilizadas *in vivo* (Singer & Caplan, 2011), uma vez que *in vivo* as MSCs injetadas tornam-se ativas pelo meio inflamatório local, daí ser tão importante entender o nicho inflamatório em que as MSCs são injetadas (Peroni & Börjesson, 2011). Uma lesão aguda caracterizada pela IL-6, IL-1 ou TNF- $\alpha$  irá ativar as MSCs de forma diferente das lesões crônicas ou imunomediadas caracterizadas por células T ativas ou IFN- $\gamma$  (Peroni & Börjesson, 2011).

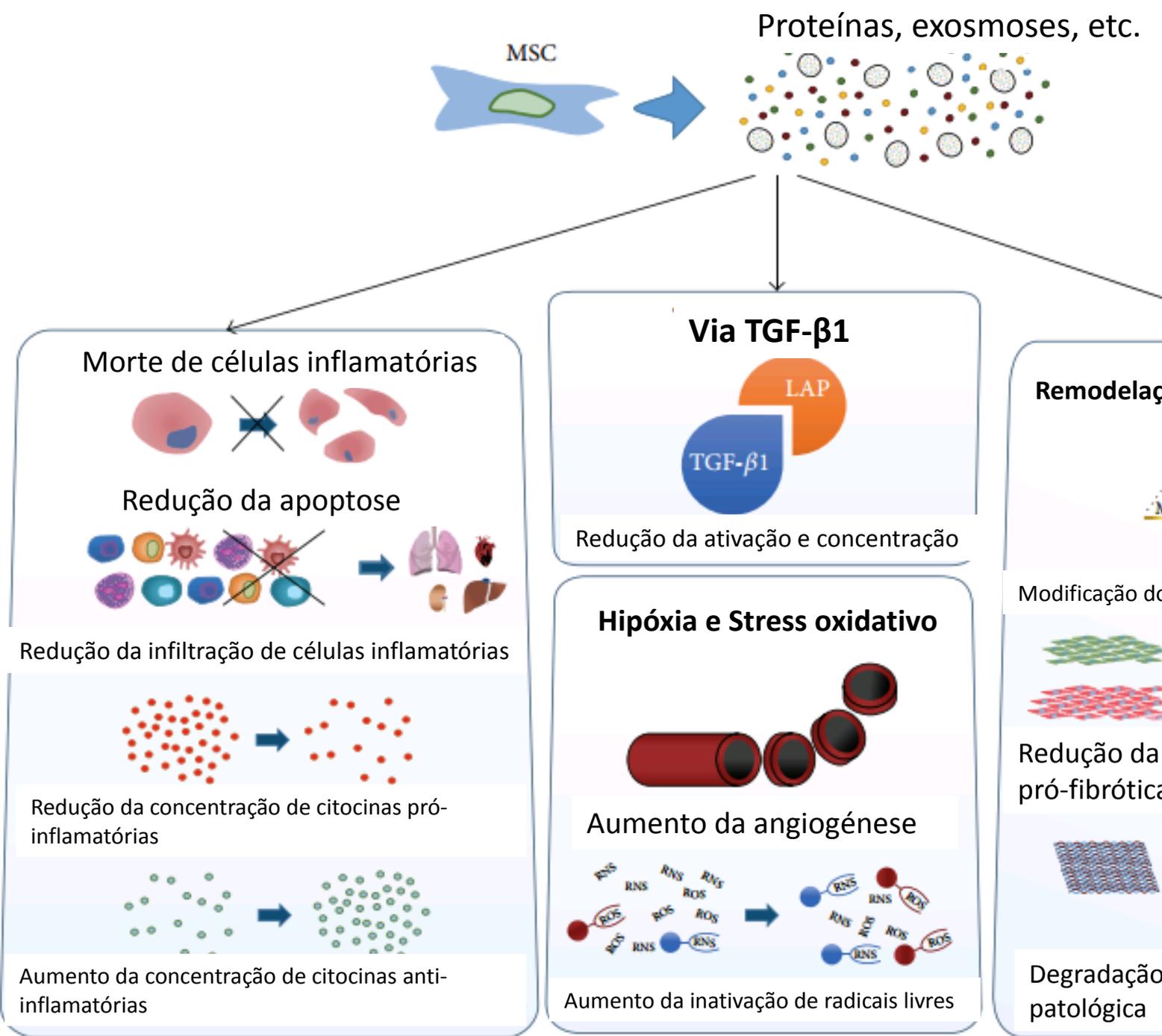
Ao inibir a reação inflamatória aguda, é provável que as MSCs reduzam a consequente inflamação crônica (Usunier et al., 2014). Estes mecanismos imunitários contribuem para uma modificação do microambiente, diminuindo assim formação de tecido fibroso e eventualmente conduzindo à regeneração do tecido lesado (Usunier et al., 2014). Reconhece-se cada vez mais que a chave para compreender a eficácia das MSCs na reparação de tecidos ou doenças inflamatórias é entender como as MSCs modulam o nicho inflamatório (Peroni & Börjesson, 2011).

#### **4.6.2 Propriedades anti-fibróticas**

A via de ativação do TGF- $\beta$ 1 é um dos principais alvos de terapêuticas anti-fibróticas e a sua regulação tem sido abundantemente estudada em ensaios com MSCs (Usunier et al., 2014). As MSCs inibem a ativação do TGF- $\beta$ 1 e reduzem a sua expressão e concentração, impedindo principalmente a passagem da sua forma latente à sua forma ativa (Usunier et al., 2014). Jang et al. (2015) demonstraram num trabalho sobre fibrose hepática que as células estaminais mesenquimatosas derivadas da medula óssea modulam a ativação do TGF- $\beta$ 1 através da inibição da via TGF- $\beta$ 1/Smad. Assim, as MSCs evitam a sobre-expressão pós-lesional do TGF- $\beta$ 1 e modificam o microambiente circundante para diminuir a concentração de fatores de ativação do TGF- $\beta$ 1 (Usunier et al., 2014). A diminuição da concentração de TGF- $\beta$ 1 ativo levaria a uma redução da proliferação de miofibroblastos, alterando consequentemente o equilíbrio entre síntese e degradação da matriz extracelular (Usunier et al., 2014).

A acumulação de matriz extracelular no tecido, a morte de células endoteliais e o aumento dos níveis de ROS e RNS resultam em hipóxia e stress oxidativo durante a fibrose. Estes fatores conduzem a um aumento da apoptose e à ativação do TGF- $\beta$ 1 (Usunier et al., 2014). A capacidade das MSCs em reduzir o stress oxidativo tem sido demonstrada em vários trabalhos. Em primeiro lugar, elas parecem aumentar a expressão e a concentração de enzimas responsáveis pela eliminação de radicais livres, tais como a NADPH quinona oxidoreductase 1 (NQO1), a glutathiona reductase (Gr), a glutathiona peroxidase (GPx) e a heme oxigenase 1 (HO-1) (Usunier et al., 2014). Além disso as MSCs levam a um aumento do Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2) e de superóxido-dismutase (SOD), que podem reduzir a acumulação de ROS, diminuindo assim o stress oxidativo (Usunier et al., 2014).

As MSCs estimulam a angiogénese local através da segregação de uma grande variedade de fatores angiogénicos, tais como o VEGF, o fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF-2, Fibroblast Growth Factor 2), o IGF-1, o MCP-1, o fator de crescimento básico de fibroblastos (bFGF, basic Fibroblast Growth Factor) e a interleucina 6 (IL-6) (Singer & Caplan, 2011). As MSCs podem, portanto, atuar de maneiras diferentes contra a hipóxia e o stress oxidativo, aumentando a angiogénese no tecido e melhorando a inativação de ROS e RNS. Estas características, que contribuem para a inibição da ativação do TGF- $\beta$ 1 e para a redução da apoptose, podem contribuir para os efeitos antifibróticos das MSCs (Usunier et al., 2014). Os efeitos das MSCs estão sintetizados na figura 8.



**Figura 8** Efeitos comuns da terapêutica com MSCs em várias doenças fibróticas. Vários mecanismos têm sido salientados, principalmente em relação à reação inflamatória e apoptose, modulação do stress oxidativo e hipóxia e remodelação da matriz extracelular. As moléculas secretadas pelas MSCs parecem ativar uma ampla gama de vias antifibróticas. Adaptado de Usunier et al. 2014

As MSCs também estimulam a mitose de células estaminais ou das células progenitoras intrínsecas do tecido através da secreção do fator de células estaminais (SCF, Stem Cell Factor), do fator estimulante de colônias de macrófagos (M-CSF, Macrophage Colony-Stimulating Factor), do fator derivado de células do estroma 1 (SDF-1, Stromal cell-derived Factor 1), do fator inibidor da leucemia (LIF, Leukemia Inhibitory Factor) e da angiopoietina 1 (Singer & Caplan, 2011).

Assim, há várias evidências de que as MSCs recrutam e estimulam as células estaminais residentes, enquanto ao mesmo tempo inibem a inflamação e a fibrose (Stewart & Stewart, 2011). Embora o efeito coletivo destas atividades possa não resultar na regeneração autêntica dos tecidos, é bastante provável que as terapêuticas com MSCs melhorem substancialmente a qualidade funcional da reparação dos tecidos, como já foi demonstrado em vários estudos que abordam o tratamento do tendão flexor, lesões da cartilagem articular e lesões de tecidos moles em equinos com estas células (Stewart & Stewart, 2011).

#### **4.7 Utilização de células estaminais mesenquimatosas em processos terapêuticos regenerativos**

O objetivo das terapêuticas regenerativas é restaurar a estrutura normal e a função biomecânica de um tecido lesado (Peroni & Börjesson, 2011). Entre todas as células estaminais, as células estaminais mesenquimatosas (MSCs) têm vantagens práticas na medicina regenerativa devido à sua elevada capacidade de autorrenovação, ao seu potencial de diferenciação multipotente e à sua baixa imunogenicidade. Além disso, dado que as MSCs podem ser isoladas e o seu número aumentado a partir de uma grande variedade de tecidos adultos, estas células têm sido objeto de grande interesse na comunidade biomédica desde a descoberta de Friedenstein (Stewart & Stewart, 2011; Gattegno-Ho et al., 2012). Células estaminais mesenquimatosas derivadas da medula óssea de equinos já são usadas para tratar lesões agudas e crônicas, principalmente lesões ortopédicas, lesões dos tendões e ligamentos, fraturas, laminites e doenças articulares tais como quistos subcondrais ósseos, lesões do menisco e defeitos da cartilagem (Peroni & Börjesson, 2011). No entanto, à medida que o conhecimento da biologia das células estaminais aumenta, é agora claro que as MSCs representam agentes terapêuticos eficazes para uma variedade de doenças (Stewart, 2011). Estudos pré-clínicos e clínicos também apresentaram a capacidade das MSCs se adaptarem ao seu ambiente. Com efeito, a

regulação das moléculas segregadas pelas MSCs é altamente influenciada pelo tecido circundante. Portanto, a terapêutica com MSCs produz vários resultados em diferentes doenças (Usunier et al., 2014).

O sucesso de terapêuticas com células estaminais depende em parte da distribuição das células, que deve ser ampla, sendo importante direcionar as MSCs para os tecidos lesionados (Dai et al., 2009; Mambelli et al., 2014; Usunier et al., 2014). Os métodos de administração de MSCs podem ser classificados em duas categorias: administração direcional ou específica e administração sistêmica (infusão endovenosa, por exemplo) (Dai et al., 2009). Investigadores chineses provaram que as BM-MSCs são capazes de sobreviver, de proliferar e de se diferenciar depois de serem transplantadas em tecidos, o que evidencia o seu potencial na reparação de tecidos (Kim et al., 2015). Num dos seus trabalhos, Mambelli et al. (2013) mostraram pela primeira vez que as células estaminais mesenquimatosas derivadas do tecido adiposo (AT-MSCs, Adipose Tissue-derived Mesenchymal Stem Cells) foram capazes de se incorporar no útero de éguas com endometrose e aí foram amplamente distribuídas por um método muito simples de transplante de células (semelhante à inseminação artificial). Para substituir as células danificadas e melhorar a integridade e função do tecido, uma suspensão de células pode ser simplesmente injetada no tecido danificado (Mambelli et al., 2013).

Noutro trabalho, para avaliar os efeitos das MSCs no endométrio alterado, Mambelli et al. (2014) administraram AT-MSCs alogénicas no endométrio de éguas com endometrose. Mambelli et al. (2014) tinham como objetivo a avaliação da expressão de laminina, vimentina,  $\alpha$ -SMA e citoqueratina 18 (CK18) depois da administração de AT-MSCs, bem como testar a capacidade destas células para causar a remodelação do tecido endometrial em éguas com endometrose. O endométrio equino com endometrose parece incapaz de proporcionar um ambiente adequado para a expressão correcta destas proteínas quando comparado com um endométrio normal (Walter, Handler, Reifinger & Aurich, 2001; Hoffmann et al., 2009a). Mambelli et al. (2014) recolheram evidências de uma alteração morfológica e funcional das células glandulares e das células periglandulares do estroma do endométrio de éguas com endometrose após o transplante de AT-MSCs no endométrio. Após o transplante intra-uterino, as AT-MSCs foram capazes de induzir uma remodelação positiva no tecido endometrial destas éguas com endometrose, tanto precoce (aos 7 dias) como tardia (aos 60 dias). Estas AT-MSCs alogénicas foram capazes de estimular o ambiente local composto por células epiteliais e células do estroma periglandular e modular positivamente a expressão de citoqueratina 18, vimentina,  $\alpha$ -SMA e laminina, evitando assim ainda mais o desenvolvimento de processos patológicos que levam à formação de regiões fibróticas no endométrio equino (Mambelli et al., 2014).

Atualmente, a maioria dos estudos clínicos e protocolos baseia-se na administração de MSCs autólogas, num processo em que as células são recolhidas e administradas ao

mesmo paciente (Stewart, 2011). A colheita de MSCs autólogas é um processo simples, mas requer alguns equipamentos e instalações especializadas e pode demorar de alguns minutos para a recolha de aspirados a várias semanas, para a proliferação *in vitro* de MSCs (Stewart, 2011). O facto de que as células estaminais são capazes de evitar o reconhecimento imunitário permite a utilização alogénica destas células (Stewart, 2011). A utilização de MSCs preservadas criogenicamente e obtidas a partir de outros equinos dadores (alogénicas) oferece a vantagem de um tratamento mais rápido e a utilização de uma população selecionada de células mais homogénea (Börjesson & Peroni, 2011).

A comparação entre diferentes origens de MSCs é uma questão importante, considerando o facto de que alguns tecidos, como o tecido adiposo, serem mais fáceis de recolher e/ou conterem um número maior de células estaminais (Usunier et al., 2014). Nos seres humanos e roedores, a capacidade das MSCs de alterar o sistema imunitário varia com o seu tecido de origem (Peroni & Börjesson, 2011). MSCs podem ser recolhidas a partir de vários tecidos e locais, e podem ter marcadores de superfície e características de crescimento semelhantes, embora estas MSCs exibam várias diferenças. Alguns estudos sugerem que as BM-MSCs e AT-MSCs são mais estreitamente relacionadas do que as MSCs derivadas da placenta (Peroni & Börjesson, 2011). Estas diferenças inerentes parecem ser ainda mais reforçadas pela inflamação, uma vez que vários estudos *in vitro* compararam vários tecidos e mostraram que as MSCs ativadas derivadas da medula óssea, tecido do cordão umbilical e tecido adiposo modulam a resposta imune e respondem aos mediadores inflamatórios de formas distintas (Peroni & Börjesson, 2011).

Os efeitos inibidores das MSCs são também dependentes da sua quantidade (Peroni & Börjesson, 2011). Um estudo avaliou a dose de MSCs num modelo de degenerescência do disco intervertebral canino e descobriu que as MSCs foram menos viáveis após a injeção com uma dose baixa ( $10^5$ ) e que havia mais células apoptóticas com uma dose elevada de MSCs ( $10^7$ ), ao passo que o microambiente estrutural e matriz extracelular do disco foram mantidos com uma dose intermédia de MSCs ( $10^6$ ). A dose ideal de MSCs para qualquer lesão equina é uma importante área de estudo e a dupla capacidade das MSCs de suspender ou suprimir a proliferação de células T deve ser considerada no contexto de aplicações clínicas (Peroni & Börjesson, 2011).

Por último, o momento do transplante de MSCs certamente influencia o sucesso da terapêutica (Usunier et al., 2014). Há muito pouca informação a respeito de quando as MSCs devem ser administradas. As MSCs demonstraram efeitos variáveis quando aplicadas em diferentes estadios da doença. À medida que o nicho inflamatório progride de inflamação aguda a crónica, as células e mediadores presentes podem distorcer a ativação das MSCs de várias maneiras (Peroni & Börjesson, 2011). De facto, o efeito imunomodulador das MSCs deve ser mais eficaz quando a administração das células ocorre durante a reação inflamatória aguda para impedir que a inflamação crónica se instale (Usunier et al., 2014).

Embora os dados pré-clínicos sugiram o forte efeito antifibrótico de MSCs, a maioria dos estudos foram realizados durante os estadios iniciais de desenvolvimento da fibrose (Usunier et al., 2014). Há presumivelmente um ponto no processo de reparação de uma lesão em que as capacidades das células estaminais para influenciar a inflamação e fibrose e para participar na regeneração dos tecidos são perdidas, mas este ponto ainda não foi bem definido (Stewart, 2011). Uma vez que a fibrose é muitas vezes diagnosticada em fases mais avançadas, é necessária a avaliação dos efeitos das MSCs sobre a fibrose estabelecida, a fim de considerar a terapêutica com MSCs em tais doenças (Usunier et al., 2014).

Assim, as MSCs têm um grande potencial no tratamento de doenças fibróticas, que se baseia na sua capacidade para atuar em simultâneo em vários parâmetros da fibrogénese (Usunier et al., 2014). Até hoje nenhuma ocorrência de efeitos pró-fibróticos foi reportada após a utilização de MSCs (Usunier et al., 2014). No entanto, os mecanismos pelos quais as MSCs atuam sobre a fibrose ainda não foram claramente elucidados e são necessários estudos adicionais, além de que os protocolos de tratamento ideais ainda não estão estabelecidos (Usunier et al., 2014).

## Parte III – Trabalho de investigação

### 1. Objetivos

O presente trabalho foi parte integrante do projeto “Stem Cells”, um projeto criado pelo Departamento de Fisiopatologia da Reprodução da Faculdade de Ciências Veterinárias da Universidade Nacional do Centro da Província de Buenos Aires (UNCPBA) em Tandil, Argentina em parceria com o Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, Brasil. O trabalho foi posteriormente desenvolvido no laboratório de Fisiologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV-Ulisboa) e financiado pelo Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA).

O objetivo do trabalho foi avaliar a expressão da citocina pro-fibrótica TGF $\beta$ -1 e dos seus recetores (TGF $\beta$  recetor I e TGF $\beta$  recetor II) por imunohistoquímica em biópsias endometriais antes e após a infusão de células estaminais mesenquimatosas autólogas derivadas da medula óssea no endométrio de éguas com endometrose e avaliar o efeito da terapêutica na expressão das mesmas no endométrio dessas éguas. De acordo com o conhecimento de que dispomos, não foram ainda publicados trabalhos para avaliar a expressão da citocina pró-fibrótica TGF $\beta$ -1 no endométrio da égua.

Assim, os objetivos específicos deste trabalho consistiram em:

- Identificar e caracterizar a expressão da citocina pro-fibrótica TGF $\beta$ -1 e dos seus recetores (recetor I e II) em biópsias endometriais de éguas com endometrose;
- Avaliar a expressão da citocina pro-fibrótica TGF $\beta$ -1 e dos seus recetores (recetor I e II) antes e depois da terapêutica com células estaminais mesenquimatosas no endométrio;
- Testar a capacidade da utilização terapêutica de células estaminais mesenquimatosas para provocar a alteração da expressão da citocina pro-fibrótica TGF $\beta$ -1 e dos seus recetores (recetor I e II) no endométrio em éguas com endometrose.

## 2. Materiais e métodos

Este trabalho foi dividido em duas partes; a primeira parte, na qual não participei, decorreu no Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, Brasil e incluiu a aspiração e cultura de células estaminais mesenquimatosas da medula óssea de um grupo de 7 éguas com diferentes graus de endometrose, a cultura das células estaminais mesenquimatosas, a colheita de biópsias endometriais às mesmas éguas antes do tratamento com células estaminais mesenquimatosas, injeção por histeroscopia das células estaminais mesenquimatosas no endométrio das éguas, colheita de biópsias endometriais aos 30 e 60 dias após o tratamento, processamento das biópsias e preparação de lâminas para imunohistoquímica. A segunda parte decorreu no laboratório de Fisiologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV-ULisboa) com o apoio do Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA) no âmbito do projeto Exp/CVT Rep/1485/2012 e incluiu a determinação por imunohistoquímica da expressão da citocina pro-fibrótica TGF $\beta$ -1 e dos seus recetores (recetor I e II) nas biópsias endometriais antes e depois do tratamento.

### 2.1 Animais

Foram utilizadas neste projeto sete éguas em bom estado geral de saúde e com um ciclo éstrico normal, com idades entre os 14 e 23 anos, da raça quarto de milha, com massa corporal entre 400 e 600 Kg, história pregressa de infertilidade e com grau elevado de fibrose uterina. As éguas foram mantidas num “paddock” com acesso livre a um bebedouro coletivo, suplementação mineral num consumo médio diário de 70 g, ração fornecida duas vezes por dia num total de quatro quilos/égua, feno de coast - cross (*Cynodon dactylon*) fornecido três vezes por dia, num total de doze quilos/égua. Estas éguas encontravam-se no Posto de Monta da Fazenda Lajeado – UNESP – localizado no município de Botucatu, estado de São Paulo. De modo a efetuar-se a recolha do material da medula óssea, as éguas foram encaminhadas para o Departamento de Reprodução Animal da Universidade Estadual Paulista (UNESP-Botucatu) localizado a 20 km da origem. Foram recolhidas biópsias endometriais a cada égua antes do tratamento com células estaminais mesenquimatosas no endométrio (D0), aos trinta dias após a administração das células (D30) e aos sessenta dias (D60). As biópsias foram recolhidas através da colheita de um fragmento endometrial obtido pela introdução intra-uterina, transcervical, de uma pinça de biópsia (modelo “Krause”) devidamente esterilizada. Foi feito o acompanhamento

reprodutivo por ecografia transretal e todas as biópsias foram recolhidas no diestro, entre o dia 5 e 8. Foram recolhidas no total vinte e uma biópsias endometriais das sete éguas.

## **2.2 Células**

Neste trabalho foram usadas células estaminais mesenquimatosas autólogas derivadas da medula óssea. As células foram aspiradas da medula óssea de cada égua, isoladas, multiplicadas e posteriormente injetadas no endométrio. Foram administradas  $8 \times 10^6$  células estaminais mesenquimatosas num volume de 10 ml de PBS em cada égua, como descrito em 2.3.

### **2.2.1 Punção aspirativa de medula óssea**

Previamente à aspiração da medula óssea, as éguas mantidas em estação, contidas na manga e sedadas com detomidina (Eqdomin, 0,02 mg/kg, IV, Ourofino Saúde Animal Ltda, São Paulo), foram tricotomizadas numa área de 5 x 20 cm na região correspondente ao esterno de cada animal, permitindo a execução do exame ultrassonográfico. Após localizada a 5ª estérnebra, foi realizado o bloqueio anestésico local com 10 ml de cloridrato de lidocaína, seguido de anti-sépsia local. Para aspiração foi utilizada uma agulha de punção de medula óssea em equinos, modelo *Jamshidi*, de calibre oito e 12 cm de comprimento. Uma vez bem fixa a agulha dentro do esterno, foi removido o mandril e realizou-se a aspiração das células da medula óssea com auxílio de uma seringa de 20 ml contendo 1 ml de heparina (1000 UI). Foram recolhidas duas seringas que foram utilizadas para a cultura celular. Em seguida, as amostras foram identificadas e encaminhadas para o Laboratório de Pesquisas do Departamento de Reprodução Animal (UNESP, Botucatu, São Paulo) para a separação da fração mononuclear.

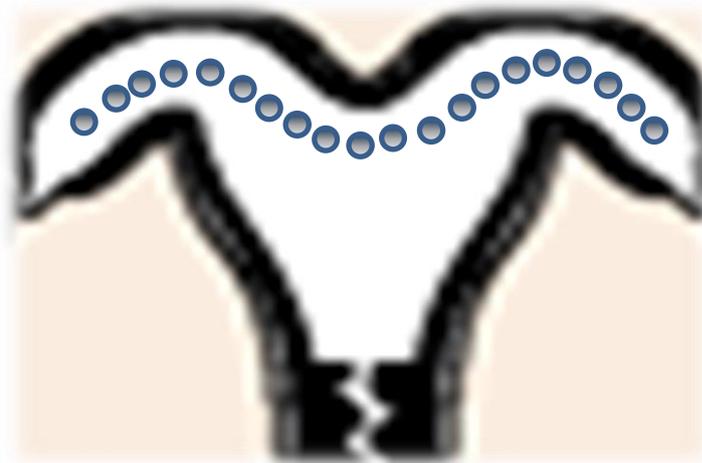
### **2.2.2 Isolamento e cultura das células estaminais mesenquimatosas derivadas da medula óssea**

Após a colheita da medula óssea, a amostra foi centrifugada a 1500 rpm durante 10 minutos para a separação do soro. O material obtido foi ressuspenso na proporção de 1:1 em DMEM de elevada concentração de glicose com L-glutamina (L-Glutamine, ThermoFischer Scientific, Grand Island, Estados Unidos da América) sem soro e transferido para um outro tubo de 15 ml contendo 4 ml de Ficoll-Paque (densidade 1.077 g/ml - Amersham Biosciences, São Paulo, Brasil), na diluição Ficoll-Meio 1:1, sendo centrifugado a 1500 rpm

durante 40 minutos à temperatura ambiente. Após a recolha do anel de células na interface Ficoll-células, este foi ressuspenso em 1 ml de DMEM com 20% de soro fetal de bovino e as células foram contadas por citometria de fluxo. As células foram semeadas em frascos para cultura de tecidos, com 5 ml de meio DMEM de alta concentração de glicose com L-glutamina e 10% FBS e 10% soro Knockout (Knockout™ ThermoFischer Scientific, Grand Island, Estados Unidos da América) contendo penicilina, estreptomina e anfotericina B. O meio de cultura foi trocado a cada 4 a 5 dias, até aos 20 dias de cultura. A tripsinização das células foi realizada quando se atingiu uma confluência de aproximadamente 80%.

### 2.3 Injeção endometrial de células estaminais mesenquimatosas

Este procedimento foi realizado entre o dia 5 e 8 do diestro, sendo o ciclo reprodutivo de cada égua acompanhado por ecografia transrectal. A administração das células estaminais foi realizada através da injeção de  $8 \times 10^6$  células estaminais mesenquimatosas num volume de 10 ml de PBS em 20 diferentes locais de administração, espaçados um centímetro uns dos outros, seguindo uma linha horizontal da extremidade de um corno uterino ao outro (0,5ml em cada ponto) (Figura 9). As injeções realizaram-se por histeroscopia com o auxílio de endoscópio flexível e uma agulha de esclerose.



**Figura 9** Locais de administração das BM-MSCs no endométrio equino. Foram administradas  $8 \times 10^6$  células estaminais mesenquimatosas num volume de 10 ml de PBS em 20 locais de administração diferentes, espaçados um centímetro uns dos outros, seguindo uma linha horizontal da extremidade de um corno uterino ao outro, sendo administrados 0,5ml em cada ponto.

### 2.4 Processamento das biópsias endometriais obtidas

As biópsias endometriais foram fixadas em líquido de Bouin por um período de 18 horas. Em seguida, para proceder à desidratação do tecido, os fragmentos passaram por diversos banhos em soluções de concentrações crescentes de etanol (desde etanol a 70% até etanol a 100%). Após a desidratação, os fragmentos passaram por um solvente orgânico (xilol), para substituir o etanol dos tecidos. A seguir foram incluídos em parafina fundida a 60° em pequenos blocos. Depois dos blocos serem retirados da estufa, a parafina solidifica e eles tornam-se rígidos. Os blocos de parafina que contém os tecidos foram então seccionados. Os cortes são colocados a flutuar sobre a superfície de água aquecida e depois colocados sobre lâminas de vidro, onde aderem. Foram obtidos cortes de 4 µm, montados em lâminas previamente tratadas com organossilano. Tal procedimento foi realizado por um técnico experiente e capacitado nos procedimentos de inclusão e corte de material. Foram realizados cinco cortes de cada fragmento obtido para a realização da técnica de imunohistoquímica.

## **2.5 Imunohistoquímica**

A técnica de imunohistoquímica foi efectuada no laboratório de Fisiologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV-Ulisboa). O procedimento teve início com a desparafinação dos cortes através da colocação das lâminas na estufa a 57°C durante cinco minutos, posteriormente numa cuba de vidro com xilol à temperatura ambiente durante 20 minutos e a seguir foram mantidas em novo banho de xilol durante 15 minutos. Seguiu-se a rehidratação dos cortes por imersão das lâminas em cubas de vidro com etanol em concentrações decrescentes, na seguinte sequência: imersão em etanol 100% I (2 minutos), imersão em etanol 100% II (2 minutos), imersão em etanol 95% I (2 minutos), imersão em etanol 95% II (2 minutos), imersão em etanol 70% I por (2 minutos) e imersão em etanol 70% II (2 minutos). No fim as lâminas foram colocadas numa tina com água destilada durante 5 minutos. O passo seguinte foi a colocação das lâminas numa tina com uma solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,3% em H<sub>2</sub>O durante 15 minutos para fazer o bloqueio da peroxidase endógena. As lâminas foram depois lavadas em PBS durante 5 minutos. Procedeu-se à recuperação antigénica, necessária para libertar os epítomos antigénicos do tecido, com a utilização de tampão citrato a pH 6.0, em micro-ondas, durante 15 minutos a 700 W. Seguiu-se um período de arrefecimento gradual em gelo. Depois, realizou-se o bloqueio de proteínas, aplicando-se 100 µl de soro bloqueador “Goat serum” 5% em PBS. Este passo teve como objetivo o bloqueio dos locais de ligação inespecífica. As lâminas ficaram a incubar durante 45 minutos à temperatura ambiente. O passo seguinte foi a aplicação do anticorpo primário. Neste trabalho foram utilizados 3 anticorpos diferentes: anti-TGFβ-1, anti-TGFβ receptor I e anti-TGFβ receptor II. Dependendo do anticorpo foram

utilizadas diferentes diluições, como resumido na Tabela 3. Os anticorpos foram diluídos em soro bloqueador e foram aplicados 100 µl por lâmina, sendo uniformemente distribuídos por toda a superfície do corte. As lâminas ficaram a incubar durante a noite (durante 16 horas) em câmara húmida, a 4°C. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com PBS durante 20 minutos e foi depois aplicado o anticorpo secundário “Antigoat” na diluição de 1:100 durante 1 hora à temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas mais uma vez em PBS durante 10 minutos e seguidamente foi aplicada uma solução cromogénica com diaminobenzidina (DAB) (*kit ImmPACT™ DAB Peroxidase Substrate Kit* – VectorLabs, Burlingame, CA), 100 µl por lâmina durante de 2 minutos, ao abrigo da luz. Após este passo, as lâminas foram lavadas em água destilada durante 5 minutos e depois contrastadas com Hematoxilina durante 1 minuto. As lâminas foram novamente lavadas em água destilada durante 5 minutos e depois procedeu-se à desidratação dos tecidos da seguinte forma: imersão em etanol a 70% por dois minutos, imersão em etanol a 95% por dois minutos, imersão em etanol a 100% por três minutos, imersão em etanol a 100% por cinco minutos, imersão em xilol por cinco minutos e imersão num novo banho de xilol por mais 5 minutos. As lamelas foram montadas sobre as lâminas com Entellan e foram deixadas a secar. Como controlo negativo foi feita a substituição do anticorpo primário pela imunoglobulina da mesma espécie deste, ou seja, foram utilizadas frações de imunoglobulinas séricas de coelho (IgG rabbit) para os anticorpos policlonais, diluídas em soro bloqueador na concentração de 1:50, mantendo-se inalteradas as outras etapas do processo. Foi ainda realizado o controlo negativo com a substituição do anticorpo primário por PBS (100 µl).

<b>Anticorpo primário</b>	<b>Origem</b>	<b>Tipo</b>	<b>Diluição</b>	<b>Laboratório</b>
TGFβ-1	Coelho	policlonal	1:100	AbCam, Cambridge, Reino Unido
TGFβ receptor I	Coelho	policlonal	1:25	AbCam, Cambridge, Reino Unido
TGFβ receptor II	Coelho	policlonal	1:50	Biorbyt, Reino Unido

**Tabela 3** Anticorpos primários usados na imunohistoquímica

## 2.6 Fotografias dos cortes histológicos

Os cortes histológicos das biópsias após a imunohistoquímica foram observados através do microscópio OLYMPUS BX51 associado a uma câmara fotográfica (Olympus DP21 U-CMAD-2). Foram tiradas cerca de 30 fotografias digitais a cada corte histológico de modo aleatório em diferentes ampliações: (40x), (100x) e (400x).

## **2.7 Avaliação das biópsias endometriais**

A classificação das biópsias endometriais de cada égua foi avaliada no laboratório de Fisiologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV-ULisboa) com base nos cortes histológicos das biópsias das éguas antes de serem submetidas ao tratamento com células estaminais, segundo o modelo proposto por Kenney & Doig (1986) em grau de fibrose: Grau I - normal, Grau IIA – inflamação e fibrose ligeira, Grau IIB – inflamação e fibrose moderada, Grau III – inflamação e fibrose grave, alterações irreversíveis.

### **3. Resultados**

#### **3.1 Classificação da endometrose**

Todas as 7 éguas apresentavam um grau de endometrose entre IIb e III segundo o modelo proposto por Kenney & Doig (1986).

#### **3.2 Expressão imunohistoquímica do TGF- $\beta$ 1, TGF $\beta$ RI e TGF $\beta$ RII**

Para avaliar os possíveis benefícios da infusão de células estaminais mesenquimatosas derivadas da medula óssea no endométrio de éguas com endometrose, foi avaliada a expressão da citocina pró-fibrótica TGF- $\beta$ 1 e dos seus recetores, TGF $\beta$ RI e TGF $\beta$ RII no endométrio antes do tratamento, e 30 e 60 dias após o tratamento (Figuras 15, 16 e 19). Foi realizada a avaliação qualitativa da imunomarcagem das biópsias em microscópio óptico nas ampliações (100x) e (400x).

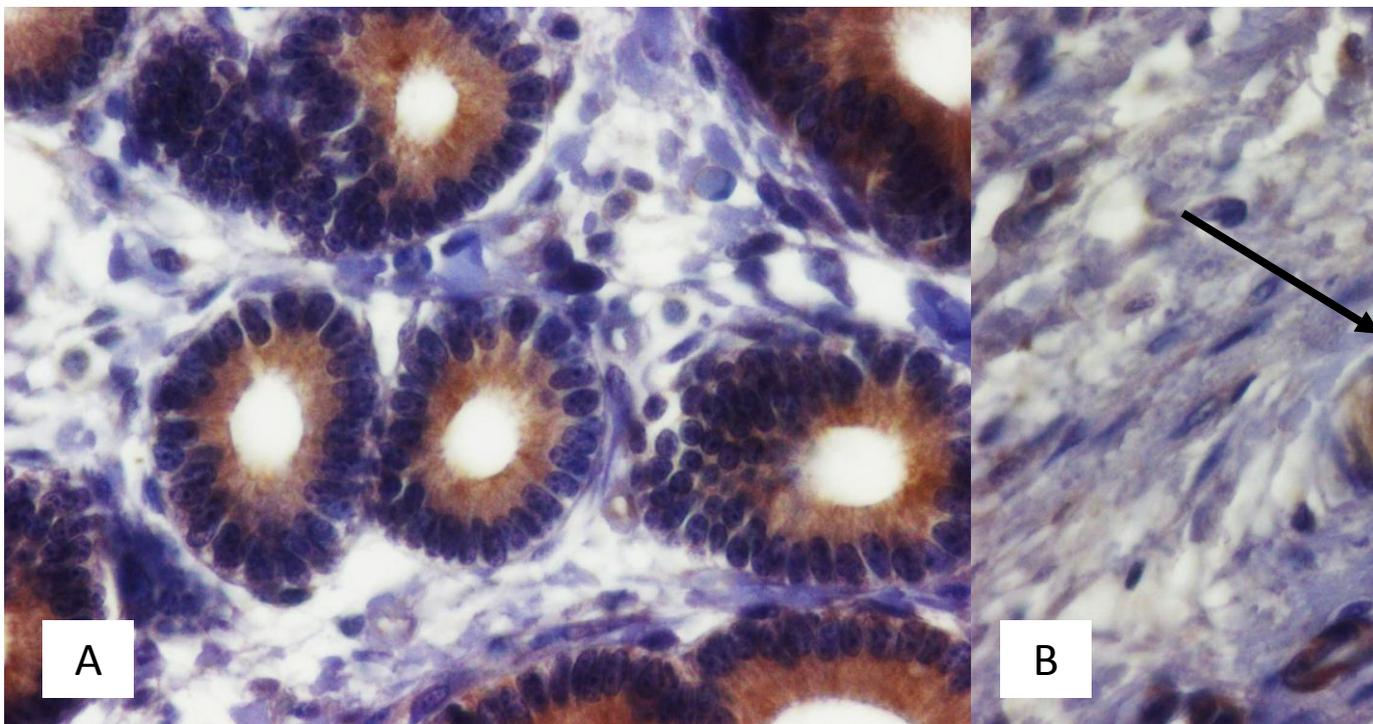
##### **3.2.1 TGF- $\beta$ 1**

A expressão do TGF- $\beta$ 1 foi observada em todas as 7 éguas antes do tratamento com células estaminais mesenquimatosas derivadas da medula óssea (BM-MSCs, Bone marrow-derived mesenchymal stem cells) (D0). Em todas as éguas foi observada a marcação do TGF- $\beta$ 1 no endotélio dos vasos e no citoplasma das células do epitélio glandular (Figura 10). Em 4 éguas, a expressão do TGF- $\beta$ 1 apareceu com maior intensidade em glândulas dilatadas ou em glândulas em focos fibróticos (Figura 11). Apenas numa égua com o grau de endometrose IIb foi possível observar a expressão do TGF- $\beta$ 1 na parte apical do citoplasma das células do epitélio glandular em algumas glândulas (Figura 12). Além disso, verificou-se em todas as éguas a expressão moderada do TGF- $\beta$ 1 no citoplasma em algumas células do estroma, principalmente no estrato compacto (Figura 13). A imunomarcagem do TGF- $\beta$ 1 foi também observada em macrófagos.

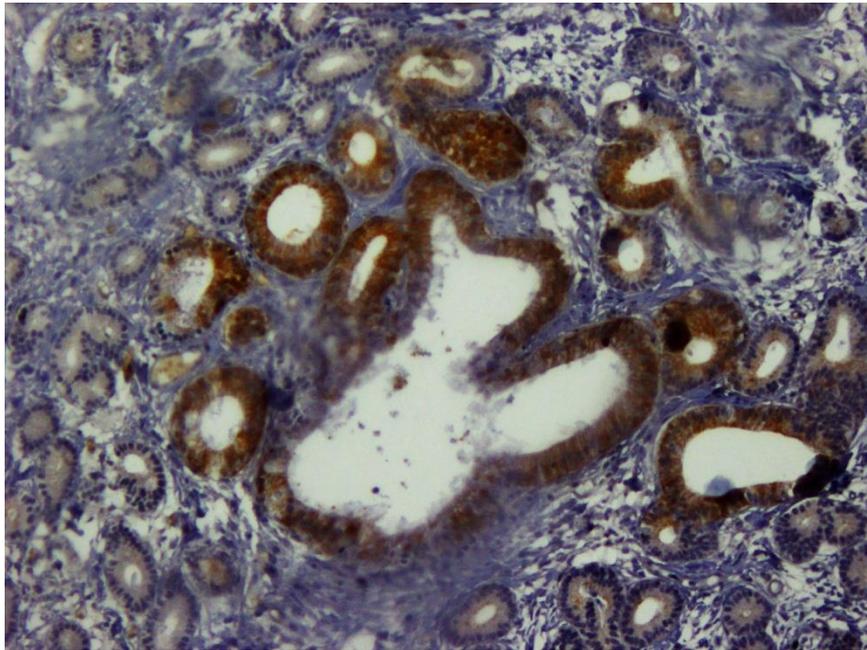
Trinta dias depois do tratamento com BM-MSCs (D30) foi igualmente observada a marcação do TGF- $\beta$ 1 no endotélio dos vasos de todas as éguas assim como no citoplasma das células do epitélio glandular. Em duas éguas houve uma diminuição da intensidade da marcação do TGF- $\beta$ 1 no citoplasma das células do epitélio glandular aos 30 dias em comparação com D0. Em duas éguas houve um aumento de intensidade da marcação do TGF- $\beta$ 1 no citoplasma das células do epitélio glandular em comparação com D0, enquanto nas outras éguas não houve alteração da intensidade da marcação do TGF- $\beta$ 1 no citoplasma das

células do epitélio glandular ao D30. Do mesmo modo, houve uma maior intensidade da marcação do TGF- $\beta$ 1 no citoplasma das células do epitélio glandular nas glândulas dilatadas e nas que estavam organizadas em focos fibróticos e ninhos. Em duas éguas verificou-se a expressão do TGF- $\beta$ 1 na parte basal do citoplasma das células do epitélio glandular, perinuclear, enquanto numa outra égua observou-se a expressão do TGF- $\beta$ 1 na parte apical do citoplasma da célula (Figura 14). É também de mencionar a expressão moderada do TGF- $\beta$ 1 em algumas células do estroma em todas as éguas, principalmente no estrato compato.

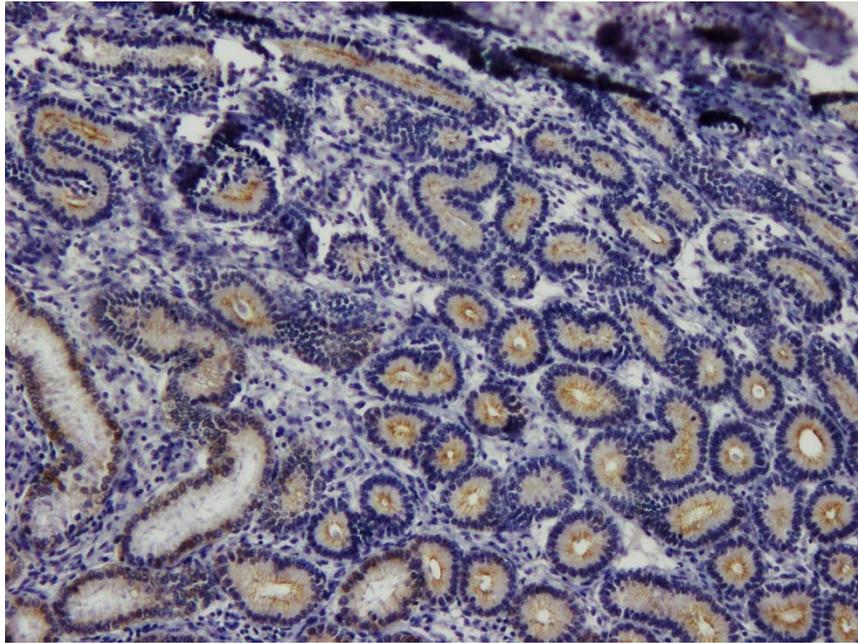
Sessenta dias após o tratamento (D60) a imunomarcação do endotélio estava presente em todas as éguas. A intensidade da marcação do citoplasma das células do epitélio glandular apresentou-se diminuída em 2 éguas, podendo observar-se uma marcação mais ténue do citoplasma do epitélio glandular e em menos glândulas em comparação com D0 e D30. Em duas éguas houve um aumento de intensidade da marcação do TGF- $\beta$ 1 no citoplasma das células do epitélio glandular em comparação com D0, enquanto as outras 3 éguas não apresentaram alterações da intensidade da marcação do citoplasma das células do epitélio glandular entre D0, D30 e D60. Pôde igualmente verificar-se a marcação moderada em algumas células do estroma em todas as éguas, principalmente no estrato compato.



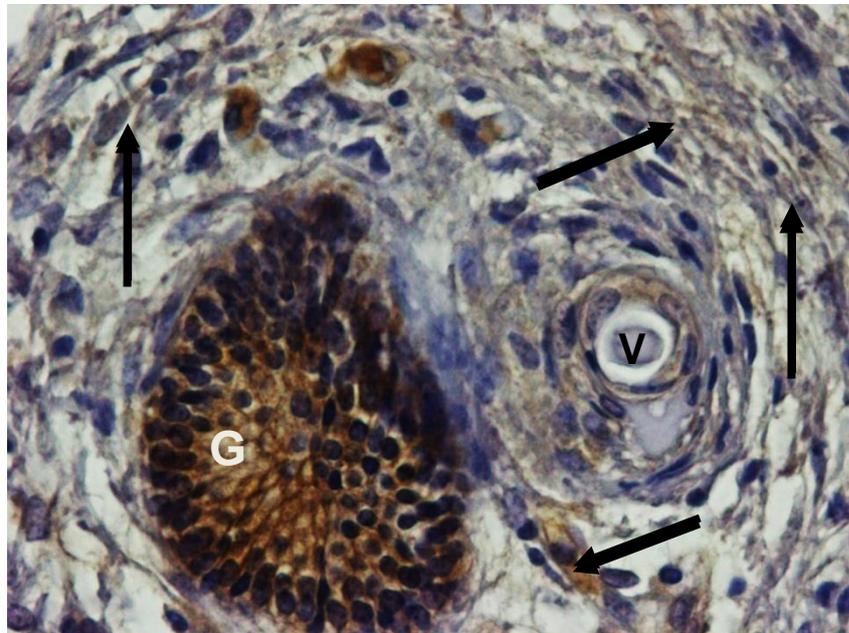
**Figura 10** Imunomarcção do TGF- $\beta$ 1 no endométrio da égua antes do tratamento com BM-MSCs (D0). A: marcação difusa do citoplasma das células epiteliais; B: marcação das células endoteliais de um vaso (seta). (400x)



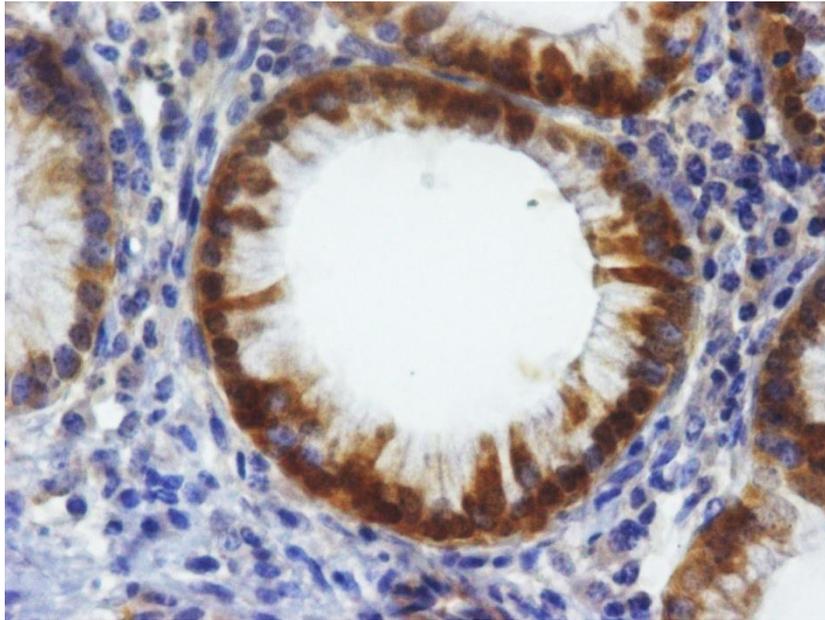
**Figura 11** Imunomarcção do TGF- $\beta$ 1 no endométrio da égua antes do tratamento com BM-MSCs (D0). Notar a maior intensidade de marcação no citoplasma das células epiteliais de glândulas dilatadas. (100x)



**Figura 12** Imunomarcção do TGF- $\beta$ 1 no endométrio da égua antes do tratamento com BM-MSCs (D0). Notar a marcação na porção apical do citoplasma das células epiteliais de glândulas endometriais. (100x)



**Figura 13** Imunomarcção do TGF- $\beta$ 1 no endométrio da égua antes do tratamento com BM-MSCs (D0). Marcação de células do estroma (setas); vaso (V), glândula endometrial (G). (400x)



**Figura 14** Imunomarcção do TGF- $\beta$ 1 no endométrio da égua 30 dias após o tratamento com BM-MSCs (D30). Marcação basal do citoplasma das células do epitélio glandular. (400x)

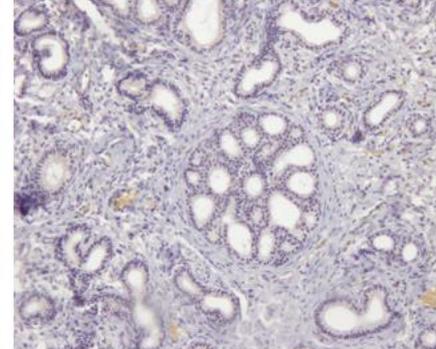
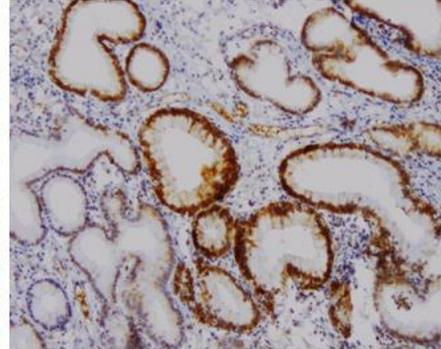
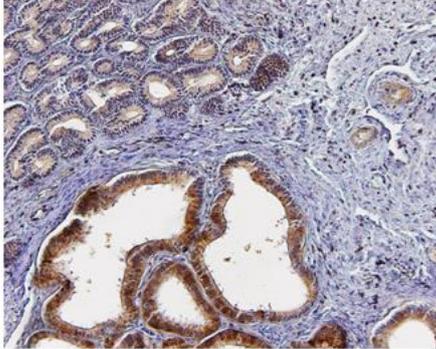
## TGF- $\beta$ 1

D0

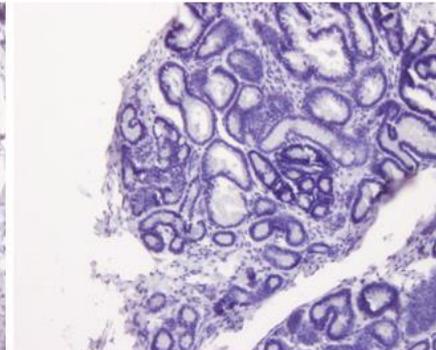
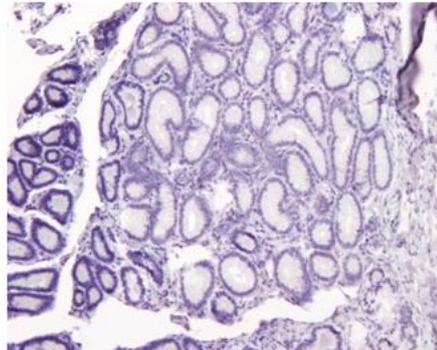
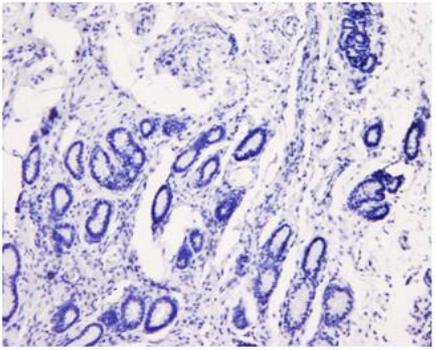
D30

D60

Tratamento  
com  
BM-MSCs



IgG

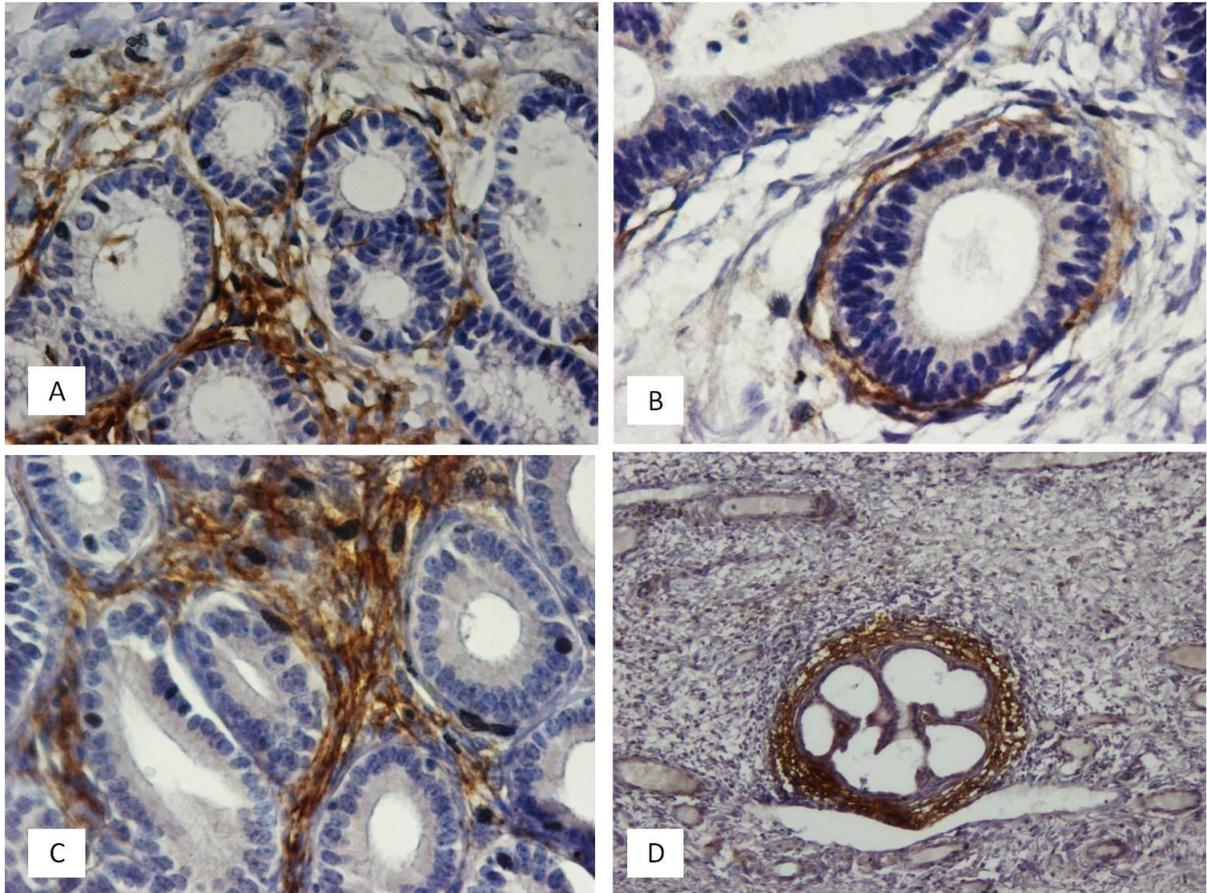


**Figura 15** Imunomarcção do TGF- $\beta$ 1 no endométrio da mesma égua antes do tratamento com BM-MSCs (D0), trinta dias após o tratamento (D30) e sessenta dias depois do tratamento (D60). (100x)

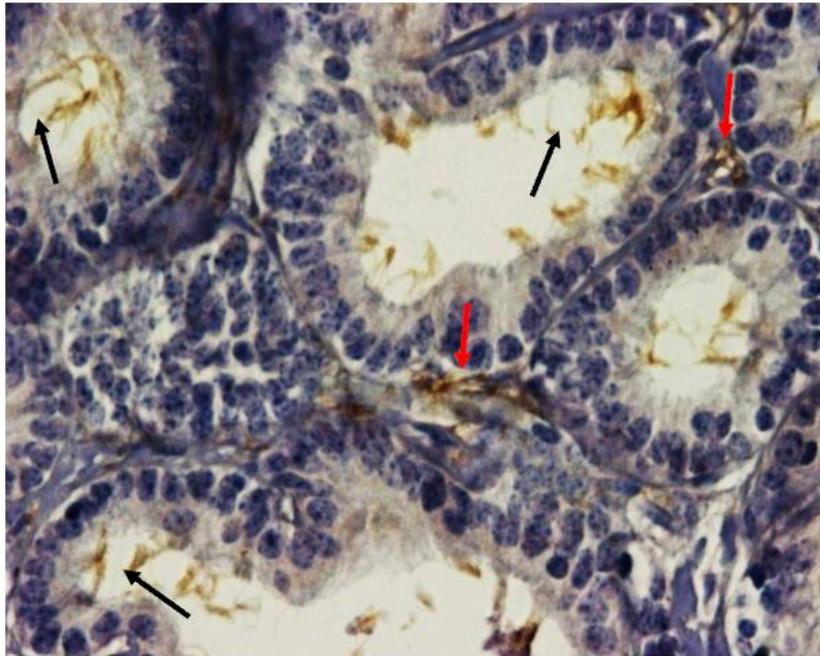
### 3.2.2 TGF $\beta$ RI

Antes do tratamento (D0), o padrão de marcação do recetor 1 do TGF- $\beta$ 1 (TGF $\beta$ RI) no endométrio equino com endometrose foi semelhante ao padrão de marcação do TGF- $\beta$ 1. Em todas as éguas houve marcação de intensidade moderada do endotélio e pôde observar-se marcação de intensidade moderada a intensa do citoplasma das células do epitélio glandular em todas as éguas. Houve um aumento da intensidade da marcação nas glândulas dilatadas, que se encontravam em focos fibróticos ou numa localização mais profunda do endométrio. Houve também marcação de algumas células do estroma. Trinta dias (D30) após o tratamento com BM-MSCs, verificou-se igualmente a marcação do TGF $\beta$ RI no endotélio dos vasos de todas as éguas assim como no citoplasma das células do epitélio glandular. Apenas em duas éguas houve uma diminuição da intensidade da marcação do citoplasma das células do epitélio glandular enquanto em 3 éguas não houve alteração da intensidade da marcação. Em 2 éguas observou-se um aumento da intensidade da imunomarcação em comparação com D0. Pôde igualmente observar-se um aumento da intensidade da marcação do citoplasma das células do epitélio glandular nas glândulas dilatadas, que estavam em focos fibróticos ou numa localização mais profunda do endométrio, assim como a marcação de algumas células do estroma. Sessenta dias (D60) após o tratamento ainda foi possível observar a marcação do endotélio dos vasos e do citoplasma das células do epitélio glandular em todas as éguas. A intensidade da marcação do citoplasma do epitélio glandular apresentou-se mais ténue e numa menor quantidade de glândulas em 2 éguas, em comparação com D30 e D0. Em 3 éguas não houve alteração da intensidade da marcação e em 2 éguas observou-se um aumento da intensidade da imunomarcação em comparação com D0. Verificou-se também a marcação de algumas células do estroma.





**Figura 17** Imunomarcção do TGFβRII no endométrio da égua antes do tratamento com BM-MSCs (D0). **A e C:** Marcação de células do estroma num ninho glandular. Ampliação 400x; **B:** Marcação de células do estroma a envolver uma glândula. Ampliação 400x; **D:** Marcação de células do estroma a envolver um ninho com glândulas dilatadas. (100x)



**Figura 18** Imunomarcção do TGF $\beta$ RII no endométrio da égua antes do tratamento com BM-MSCs (D0). Notar marcação dos cílios das células do epitélio glândular num ninho glandular (setas pretas) e células do estroma entre as glândulas (setas vermelha). (400x)

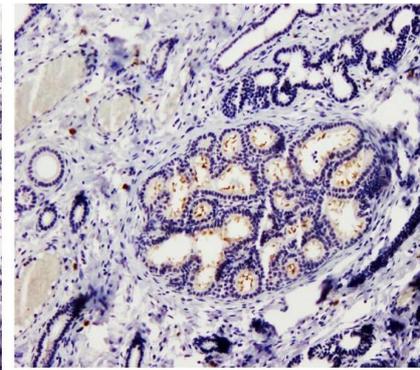
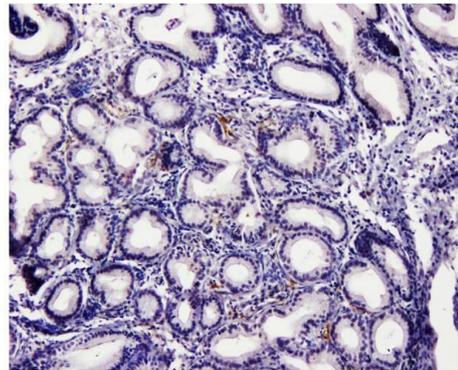
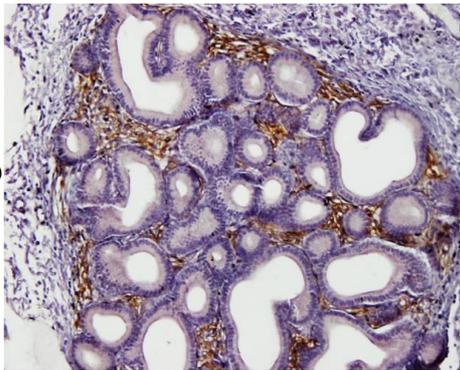
### TGF $\beta$ RII

D0

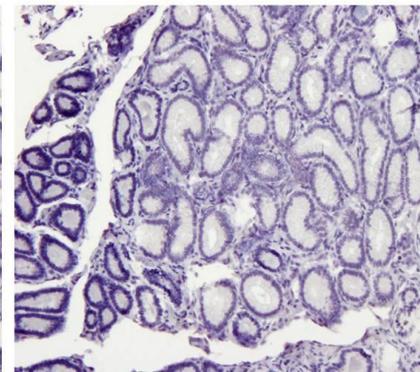
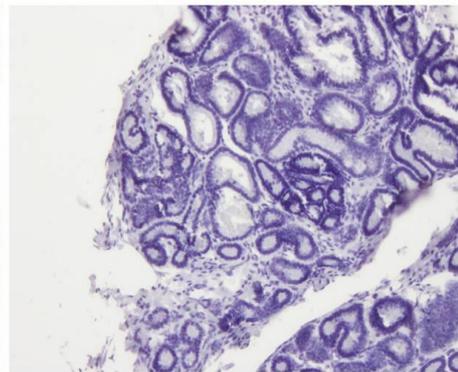
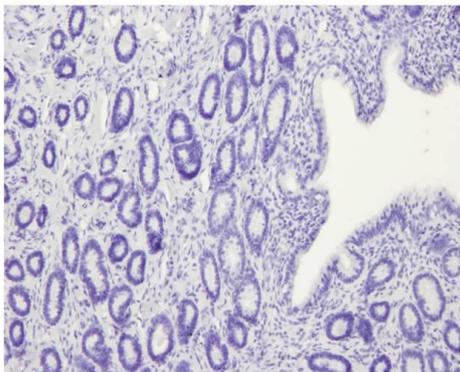
D30

D60

Tratamento  
com  
BM-MSCs



IgG



**Figura 19** Imunomarcagem do TGF $\beta$ RII no endométrio da mesma égua antes do tratamento com BM-MSCs (D0), trinta dias após o tratamento (D30) e sessenta dias após o tratamento (D60). (100x)

#### 4. Discussão

Em muitas doenças a patogênese da fibrose envolve processos exuberantes de cicatrização iniciados para proteger o hospedeiro de estímulos nocivos (Wynn, 2007). Em resposta a estímulos nocivos de vários tipos, estes processos de reparação levam à deposição excessiva de matriz extracelular, que perturba a homeostasia do tecido normal (Sakai & Tager, 2013). O mesmo se passa no endométrio da égua, que em resposta às bactérias ou a estímulos não-infecciosos, tais como o sêmen que atinge o útero, tem a particularidade de desenvolver fibrose no estroma, levando à endometrose (Kenney, 1992; Hoffmann et al., 2009). O processo de reparação envolve vários tipos de células, incluindo células epiteliais, fibroblastos, células endoteliais e leucócitos, que interagem umas com as outras (Sakai & Tager, 2013). Vários fatores de crescimento e citocinas libertados por células inflamatórias estão envolvidos em processos inflamatórios e fibrose em todos os tecidos do organismo (Wynn & Ramalingam 2012). Em tecidos inflamados, uma rede complexa de citocinas pró-fibróticas interage com a matriz extracelular, com os fibroblastos e outras células para regular a deposição de colagénio e de fibrose tecidual (Atamas, 2002). O envolvimento de citocinas na patogênese da fibrose em outras espécies além de éguas e outros tecidos além do endométrio, como pulmões, fígado ou rim, deve ser considerado como base para abordar os mecanismos de estabelecimento da endometrose (Wynn, 2008).

O TGF- $\beta$ 1 pertence a uma superfamília de polipéptidos envolvidos em diversos processos biológicos, incluindo o crescimento, a proliferação e diferenciação celular, angiogénese, apoptose e remodelação da matriz extracelular (Haralson, 1997). No entanto, quando a homeostase do tecido é perturbada por alguma lesão, o TGF- $\beta$ 1 atua como uma importante citocina pró-fibrótica, aumentando o recrutamento, proliferação e diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos e a produção de matriz extracelular (Sheppard, 2006). A expressão elevada de TGF- $\beta$ 1 nos órgãos afetados e a subsequente desregulação das funções do TGF- $\beta$ 1, está relacionada com a deposição anormal de tecido conjuntivo observada durante o aparecimento de doenças fibróticas (Verrecchia & Mauviel, 2007). A

concentração de TGF- $\beta$ 1 no tecido endometrial aumenta proporcionalmente com o grau de gravidade da fibrose periglandular e sugere um papel desta citocina pró-fibrótica na progressão da endometrose equina (Sun et al., 1997).

O TGF- $\beta$ 1 é produzido por diversos tipos de células parenquimatosas (Kopp & Branton, 1999), e por todas as linhagens de leucócitos, incluindo os linfócitos, macrófagos e células dendríticas e sua expressão serve de modo autócrino e parácrino para controlar a diferenciação, proliferação e estado da ativação destas células imunes (Letterio & Roberts, 1998).

As MSCs segregam uma grande variedade de moléculas bioativas, algumas das quais modulam a resposta inflamatória e outras proporcionam a regeneração e remodelação do tecido lesionado (Falomo et al., 2015). Geralmente, o transplante de MSCs reduz a expressão e a concentração de TGF- $\beta$ 1 (Unusier et al., 2014). Para avaliar os efeitos das MSCs na fibrose endometrial, foram injetadas BM-MSCs autólogas no endométrio de sete éguas com endometrose em diestro e foi avaliada a expressão do TGF- $\beta$ 1 e dos seus recetores no endométrio por imunohistoquímica. Uma diminuição da expressão do TGF- $\beta$ 1 trinta (D30) e sessenta (D60) dias após o transplante de células estaminais mesenquimatosas derivadas da medula óssea no endométrio poderia induzir uma redução do desenvolvimento da fibrose. O TGF- $\beta$ 1 foi expresso em todas as éguas no endotélio dos vasos, nas células epiteliais das glândulas uterinas, em algumas células do estroma e em macrófagos, apresentando uma expressão citoplasmática. Os monócitos e macrófagos segregam TGF- $\beta$ 1 e medeiam muitos dos efeitos do TGF- $\beta$ 1 na inflamação e, indirectamente, na fibrose associada à inflamação crónica (Letterio & Roberts, 1998). A expressão de TGF- $\beta$ 1 por macrófagos e outros leucócitos desempenha um papel central não só na inflamação mas também na fibrose por estimulação parácrina de células mesenquimatosas residentes para produzir uma matriz extracelular excessiva (Letterio & Roberts, 1998). Em humanos, estudos em células endometriais mostraram que o padrão da expressão do TGF- $\beta$ 1 e dos seus receptores sofre alterações durante as diferentes fases do ciclo menstrual e que pode ser influenciado por hormonas esteroides (Piestrzeniewicz-Ulanska, Brys, Semczuk, Jakowicki & Krajewska, 2002). Portanto, o mesmo pode passar-se com a égua ou seja, o padrão da expressão do TGF- $\beta$ 1 pode variar ao longo do ciclo éstrico. Foi observada uma maior intensidade da expressão do TGF- $\beta$ 1 nas células epiteliais das glândulas dilatadas e localizadas em focos fibróticos, talvez porque os miofibroblastos segregam mediadores que causam a apoptose das células epiteliais, incluindo a angiotensina II e espécies reativas de oxigénio como o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Os estímulos que lesam as células epiteliais induzem a sua apoptose e a produção e/ou a ativação de mediadores pró-fibróticos, incluindo o TGF- $\beta$ 1 (Sakai & Tager, 2013). As células epiteliais alteradas induzem a ativação do TGF- $\beta$ 1 através das suas integrinas (Sakai & Tager, 2013). A integrina  $\alpha$ v $\beta$ 6,

ativadora do TGF- $\beta$ 1, é restrita ao epitélio e a sua expressão aumenta em resposta a lesões ou inflamação (Breuss et al., 1995; Miller et al., 2001).

Trinta e sessenta dias após o transplante de MSCs no endométrio das éguas também foi possível observar a expressão do TGF- $\beta$ 1 no endotélio dos vasos, nas células epiteliais das glândulas, em algumas células do estroma e em macrófagos. Em duas éguas parece ter havido diminuição da intensidade e da quantidade da marcação de TGF- $\beta$ 1. No entanto, nas outras éguas não foi possível distinguir esta alteração e em duas éguas parece mesmo ter havido um aumento de intensidade e quantidade da marcação do TGF- $\beta$ 1 em D30 e D60. As biópsias foram todas recolhidas na mesma fase do ciclo éstrio, entre o dia 5 e 8 do diestro. Estes resultados podem dever-se às condições do tecido das biópsias, encontrando-se alguns um pouco deteriorados, às diferentes respostas individuais de cada organismo às MSCs ou devido à fase tardia do processo de fibrose em que as MSCs foram administradas, uma vez que foi demonstrado através de modelos animais que as MSCs têm um efeito benéfico na fibrose apenas se forem administradas numa fase precoce da doença e não quando já existem alterações fibróticas (Weiss & Ortiz, 2013).

A sinalização de TGF- $\beta$ 1 é fortemente regulada em diferentes níveis e a modulação da atividade dos recetores do TGF- $\beta$ 1 é um passo crítico para a regulação da sua sinalização (Huang & Chen, 2012). A sinalização do TGF- $\beta$ 1 é iniciada pela sua ligação aos seus recetores, o tipo II (TGF $\beta$ RII) e tipo I (TGF $\beta$ RI) localizados na membrana celular (Huang & Chen, 2012). Os ligandos TGF- $\beta$ 1 têm uma elevada afinidade para o receptor de tipo II e por ligação a este receptor, o receptor tipo I é recrutado (Lebrin, Deckers, Bertolino & Dijke, 2005). Foi possível observar a expressão de ambos os recetores (TGF $\beta$ RII e TGF $\beta$ RI) em todas as éguas. No entanto, o padrão da expressão de ambos os recetores difere bastante. O TGF $\beta$ RII, em D0, está presente principalmente em algumas células do estroma em focos fibróticos a envolver as glândulas, assim como em alguns macrófagos e nos cílios das células do epitélio das glândulas. A sua expressão é mais esporádica que o TGF $\beta$ RI e TGF- $\beta$ 1. Em D30 e D60 não houve alteração da intensidade e quantidade de marcação do TGF $\beta$ RII. A expressão do TGF $\beta$ RI em D0 segue um padrão muito semelhante à do TGF- $\beta$ 1, estando presente no endotélio dos vasos, células epiteliais das glândulas, células do estroma e macrófagos. Em D30 e D60, a expressão do TGF $\beta$ RI diminuiu de intensidade e quantidade nas mesmas duas éguas em que houve uma diminuição da expressão do TGF- $\beta$ 1. Nas outras éguas não foi possível distinguir esta alteração e em duas éguas houve mesmo um aumento de intensidade e quantidade da marcação do TGF $\beta$ RI em D30 e D60. Não é possível identificar uma relação entre o tratamento com MSCs e a alteração da expressão do TGF $\beta$ RI e TGF $\beta$ RII. No entanto, as células do estroma expressam tanto o TGF $\beta$ RI como TGF $\beta$ RII, o que sugere que este tipo de células pode transmitir um sinal induzido pelo TGF- $\beta$ 1.

## 5. Conclusão

Apesar dos recentes avanços na ciência e medicina veterinária, a endometrose continua a ter um impacto negativo na fertilidade da égua. Este foi o primeiro trabalho a tentar avaliar a expressão da citocina pró-fibrótica TGF- $\beta$ 1 e dos seus recetores TGF $\beta$ RI e TGF $\beta$ RII no endométrio da égua e a analisar os efeitos de uma terapêutica regenerativa baseada na utilização de células estaminais mesenquimatosas autólogas derivadas da medula óssea na expressão do TGF- $\beta$ 1, TGF $\beta$ RI e TGF $\beta$ RII. Neste trabalho não foi possível detetar um efeito claro das BM-MSCs autólogas transplantadas no endométrio de éguas com endometrose na expressão da citocina pró-fibrótica TGF- $\beta$ 1 e dos seus recetores TGF $\beta$ RI e TGF $\beta$ RII. No entanto, em duas éguas as BM-MSCs pareceram exercer um efeito positivo, diminuindo a expressão do TGF- $\beta$ 1 e TGF $\beta$ RI 30 dias e 60 dias após o tratamento. É possível que as BM-MSCs exerçam um efeito positivo na endometrose e na expressão da citocina pró-fibrótica TGF- $\beta$ 1 e dos seus recetores mas são necessários mais estudos com um maior número de animais e com diferentes graus de fibrose endometrial, assim como o estudo de outros fatores pró-fibróticos, como por exemplo o fator de crescimento de tecido conjuntivo (CTGF, connective tissue growth factor), o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF, platelet derived growth factor) e o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ ), o inibidor tecidual de metaloproteinase-1 (TIMP-1) e colagénio I e III. Há ainda várias questões a responder, nomeadamente, que concentração de células estaminais deve ser utilizada, qual o melhor método de aplicação, qual o número ideal de tratamentos ou até qual o momento ideal de aplicação do tratamento.

## 6. Bibliografia

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2002). *Molecular biology of the cell*. (4th ed.). London: GSGarland Science, Taylor & Francis Group.

Allen, W.R., (1993). Proceedings of the John P. Hughes international workshop on equine endometritis. *Equine Vet J*; 25:186

Álvarez, D., Levine, M., & Rojas, M. (2015). Regenerative medicine in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: current position. *Stem cells and cloning: advances and applications*, 8, 61–65

Annes, J. P., Munger, J. S., & Rifkin, D. B. (2003). Making sense of latent TGFbeta activation. *Journal of Cell Science*, 116, 217–224.

Aresu, L., Benali, S., Giannuzzi, D., Mantovani, R., Castagnaro, M., & Falomo, M. E. (2012). The role of inflammation and matrix metalloproteinases in equine endometriosis. *Journal of Veterinary Science*, 13(2), 171–177.

Atamas, S. (2002) Complex cytokine regulation of tissue fibrosis. *Life Sciences* 72,631-643

Avasthi, S., Srivastava, R. N., Singh, A. & Srivastava, M. (2008). Stem Cell: past, present and future- a review article. *Internet Journal of Medical Update*, 3(1), 22–30.

Barczyk, M., Carracedo, S. & Gullberg, D. (2009). Integrins. *cell and tissue research*, 339(1), 269–280

Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M. S., Brem, H. & Tomic-Canic, M. (2008). Growth factors and cytokines in wound healing, *Wound Repair and Regeneration*, vol. 16, no. 5, pp. 585–601

Blobe, G.C., Schiemann, W.P. & Lodish, H.F., (2000). Role of transforming growth factor beta in human disease. *N. Engl. J. Med.* 342, 1350–1358.

Börjesson, D. L., & Peroni, J. F. (2011). The regenerative medicine laboratory: facilitating stem cell therapy for equine disease. *Clinics in Laboratory Medicine*, 31(1), 109–123

Branton, M. H. & Kopp, J. B. (1999). TGF-β and fibrosis. *Microbes and Infection*, 1(15), 1349–1365

Breuss, J. M., Gillett, N., Lu, L., Sheppard, D. & Pytela, R. (1993). Restricted distribution of integrin beta 6 mRNA in primate epithelial tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 41, 1521-1527.

Breuss, J. M., Gallo, J., DeLisser, H. M., Klimanskaya, I. V., Folkesson, H. G., Pittet, J. F., Nishimura, S. L., Aldape, K., Landers, D. V. & Carpenter, W. (1995). Expression of the beta 6 integrin subunit in development, neoplasia and tissue repair suggests a role in epithelial remodeling. *J. Cell Sci.* 108, 2241-2251.

Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D.S., Weinrauch, Y. & Zychlinsky, A., (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303, 1532–1535.

Brinkmann, V., (2011). Neutrophil extracellular traps in microbial infections. In: Tacchini-Cottier, F., Zandbergen, G. (Eds.), *Neutrophils in Infectious Diseases*. Bentham eBooks, Dubais, pp. 3–10.

- Brinkmann, V. & Zychlinsky, A. (2012). Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *J Cell Biol*, 198, 773–783.
- Buczowska, J., Kozdrowski, R., Nowak, M., Raś, A. & Mrowiec, J. (2014). Endometriosis – significance for horse reproduction, pathogenesis, diagnosis, and proposed therapeutic methods. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 17(3), 547–554.
- Bulun, S.E. (2009). Endometriosis. *N Engl J Med*; 360:268 –79.
- Coward, W.R., Saini, G. & Jenkins, G. (2010) The pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis, *Ther. Adv. Respir. Dis.* 4 367–388
- Dai, L. J., Li, H. Y., Guan, L.-X., Ritchie, G. & Zhou, J. X. (2009). The therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on hepatic cirrhosis. *Stem Cell Research*, 2(1), 16–25
- 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),1431–43.
- Ehrhart, E. J., Segarini, P. M., Tsang, L.-S., Carroll, A. G. & Barcellos-Hoff, M. H., (1997). “Latent transforming growth factor  $\beta$ 1 activation in situ: quantitative and functional evidence after low-dose  $\gamma$ -irradiation,” *The FASEB Journal*, vol. 11, no. 12, pp. 991–1002.
- Falomo, M. E., Ferroni, L., Tocco, I., Gardin, C., & Zavan, B. (2015). Immunomodulatory role of adipose-derived stem cells on equine endometriosis, *BioMed Research International*, vol. 2015, Article ID 141485, 1-6
- Feng, X.H. & Derynck, R., (2005). Specificity and versatility in TGF- $\beta$  signaling through Smads. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 659–693.
- Ferreira-Dias, G., Nequin, L.G. & King, S.S., (1994). Morphological characteristics of equine endometrium classified as Kenney categories I, II and III, using light and scanning electron microscopy. *Am. J. Vet. Res.* 55, 1060–1065.
- Ferreira-Dias, G.M., Nequin, L.G. & King, S.S., (1999). Morphologic comparisons among equine endometrium categories I, II, and III, using light and transmission electron microscopy. *Am. J. Vet. Res.* 60, 49–55.
- Flores, J.M., Rodriguez, A., Sanchez, J., Gomez-Cuetara, C. & Ramiro, F., (1995). Endometriosis in mares: incidence of histopathological alterations. *Reprod. Domest. Anim.* 30, 61–65.
- Fortier, L.A., (2005). Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. *Vet Surg*; 34:415–23.
- Friedenstein, A.J., Deriglasova, U.F. & Kulagina, N.N., (1974). Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method, *Exp. Hematol.* 2, 83–92.
- Fuchs, T.A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., Weinrauch, Y., Brinkmann, V. & Zychlinsky, A., (2007). Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 176, 231–241.
- Ganjam, V. K., & Evans, T. J. (2006). Equine endometrial fibrosis correlates with 11 $\beta$ -HSD<sub>2</sub>, TGF- $\beta$ 1 and ACE activities. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 248(1-2), 104–108

- Gattegno-Ho, D., Argyle, S. A., & Argyle, D. J. (2012). Stem cells and veterinary medicine: tools to understand diseases and enable tissue regeneration and drug discovery. *Veterinary Journal*, 191(1), 19–27
- Grainger, D.J., (2007). TGF- $\beta$  and atherosclerosis in man. *Cardiovasc. Res.* 74, 213–222.
- Gressner, A.M., Weiskirchen, R., Breitkopf, K. & Dooley S. (2002). Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci.* 1;7: 793-807.
- Haralson, M.A., (1997). Transforming growth factor- $\beta$ , other growth factors, and the extracellular matrix, *J. Lab. Clin. Med.* 130 455–458.
- Henderson, N.C., Arnold, T.D., Katamura, Y., Giacomini, M.M., Rodriguez, J.D. & McCarty, J.H., (2013). Targeting of  $\alpha$ v integrin identifies a core molecular pathway that regulates fibrosis in several organs. *Nat Med*;19(12):1617–24.
- Hinz, B., (2007). Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J. Investig. Dermatol.* 127, 526–537.
- Hinz, B. (2015a). Myofibroblasts. *Experimental Eye Research*, 2-55
- Hinz, B. (2015b). The extracellular matrix and transforming growth factor- $\beta$ 1: Tale of a strained relationship. *Matrix Biology*, 1176, 1–12
- Hoffmann, C., Bazer, F. W., Klug, J., Allen, W. R. T., Aupperle, H., & Ellenberger, C. (2003). Morpho-functional studies regarding the pathogenesis of the equine endometrosis with special emphasis on uterine secretions - preliminary results, *Pferdeheilkunde*, 19, 666–669.
- Hoffmann, C., Ellenberger, C., Mattos, R. C., Aupperle, H., Dhein, S., Stief, B., & Schoon, H. A. (2009a). The equine endometrosis: new insights into the pathogenesis. *Animal Reproduction Science*, 111(2-4), 261–278
- Hoffmann, C., Bazer, F. W., Klug, J., Aupperle, H., Ellenberger, C., & Schoon, H. a. (2009b). Immunohistochemical and histochemical identification of proteins and carbohydrates in the equine endometrium. Expression patterns for mares suffering from endometrosis. *Theriogenology*, 71(2), 264–274
- Huang, F. & Chen, Y. (2012). Regulation of TGF-  $\beta$  receptor activity. *Cell & Bioscience*, 2(1), 9.
- Hynes, R.O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110:673–687
- Jang, Y. O., Jun, B. G., Baik, S. K., Kim, M. Y. & Kwon, S. O. (2015). Inhibition of hepatic stellate cells by bone marrow- derived mesenchymal stem cells in hepatic fibrosis, *Clinical and Molecular Hepatology*, 21, 141–149.
- Jang, Y. O., Kim, M. Y., Cho, M. Y., Baik, S. K., Cho, Y. Z., & Kwon, S. O. (2015). Effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on hepatic fibrosis in a thioacetamide-induced cirrhotic rat model. *BMC Gastroenterology*, 14(1), 1–12
- Junqueira, L. C. & Carneiro, J. (2008). *Histologia básica*. (11<sup>a</sup> edição). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan

- 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(3), 288–294.
- Kenney, R.M. (1978) Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 172, 241-262.
- Kenney, R.M., (1992). The aetiology, diagnosis and classification of chronic degenerative endometritis. In: Hughes, J.P. (Ed.), *Workshop on Equine Endometritis*. Newmarket, UK. *Equine Vet. J.* 25, 186.
- Kenney, R.M. & Doig, P.A., (1986). Equine endometrial biopsy. In: Morrow, D.A. (Ed.), *Current Therapy in Theriogenology*. W.B. Saunders Company, pp. 723–729.
- Kim, Y.S., Lee, H.J., Yeo, J.E., Kim, Y.I., Choi, Y.J. & Koh, Y.G., (2015). Isolation and characterization of human mesenchymal stem cells derived from synovial fluid in patients with osteochondral lesion of the talus. *Am J Sports Med*; 43 (2):399-406
- Koch TG, Heerkens T, Thomsen PD, Betts DH. (2007). Isolation of mesenchymal stem cells from equine umbilical cord blood. *BMC Biotechnol*;7:26.
- Leask, A., & Abraham, D. J. (2004). TGF-beta signaling and the fibrotic response. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 18(7), 816–827.
- Lebrin, F., Deckers, M., Bertolino, P. & ten Dijke, P. (2005). TGF- $\beta$  receptor function in the endothelium. *Cardiovascular Research*, 65 (3), 599–608.
- Lee, C.G., Homer, R.J., Zhu, Z., Lanone, S., Wang, X. & Koteliansky, V., (2001). Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor  $\beta$ 1. *J. Exp. Med.* 6, 809–821.
- Lehmann, J., Ellenberger, C., Hoffmann, C., Bazer, F. W., Klug, J., Allen, W. R., Sieme, H. & Schoon, H. A. (2011). Morpho-functional studies regarding the fertility prognosis of mares suffering from equine endometrosis. *Theriogenology*, 76(7), 1326–1336.
- Letterio, J. & Roberts, A. (1998). Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annual Review of Immunology*, 16(1), 137–61.
- Lögters, T., Margraf, S., Altrichter, J., Cinatl, J., Mitzner, S., Windolf, J. & Scholz, M., (2009). The clinical value of neutrophil extracellular traps. *Med Microbiol Immunol* 198, 211–219
- Mambelli, L. I., Mattos, R. C., Winter, G. H. Z., Madeiro, D. S., Morais, B. P., Malschitzky, E., Miglino, M. A., Kerkis, A. & Kerkis, I. (2014). Changes in expression pattern of selected endometrial proteins following mesenchymal stem cells infusion in mares with endometrosis. *PLOS ONE*, 9(6), 1–8.
- Mambelli, L. I., Winter, G. H. Z., Kerkis, a., Malschitzky, E., Mattos, R. C., & Kerkis, I. (2013). A novel strategy of mesenchymal stem cells delivery in the uterus of mares with endometrosis. *Theriogenology*, 79(5), 744–750.
- Marcos, V., Zhou, Z., Yildirim, A., Bohla, A., Hectorm A., Vitkovm L., Wiedenbauerm E-M., Krautgartner, W.D., Stoiber, W., Belohradsky, B.H., Rieberm N., Kormann, M., Koller, B., Roscher, A., Roos, D., Griese, M., Eickelberg, O., Döring, G., Mall, M.A. & Hartl, D., (2010). CXCR2 mediates NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation in cystic fibrosis airway inflammation. *Nat Med* 16, 1018–1024.

- McAnulty, R. J. (2007). Fibroblasts and myofibroblasts: Their source, function and role in disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39(4), 666–671.
- McKinnon, A. O., Squires, E. L., Vaala, W. E. & Varner, D. D. (2011). *Equine Reproduction*. (2ª edição). Wiley Blackwell
- Miller, L. A., Barnett, N. L., Sheppard, D. & Hyde, D. M. (2001). Expression of the beta 6 integrin subunit is associated with sites of neutrophil influx in lung epithelium. *J. Histochem. Cytochem.* 49, 41-48.
- Moustakas, A. & Heldin, C.H. (2009). The regulation of TGFbeta signal transduction, *Development* 136. 3699–3714.
- Munger, J.S., Harpel, J.G., Gleizes, P.E., Mazzieri, R., Nunes, I. & Rifkin, D.B., (1997). Latent transforming growth factor-beta: structural features and mechanisms of activation. *Kidney Int*; 51:1376–1382.
- Munger, J. S., Huang, X., Kawakatsu, H., Griffiths, M. J., Dalton, S. L., Wu, J., Pittet, J. F., Kaminski, N., Garat, C. & Matthay, M. A., (1999). The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell* 96, 319-328.
- Munson, L., Upadhyaya, N.B. & Van Meter, S., (1995). Platelet derived growth factor promotes endometrial epithelial cell proliferation. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 173, 1820–1825
- Nadig, R. R. (2009). Stem cell therapy – hype or hope? A review. *Journal of Conservative Dentistry*, 12(4): 131–138.
- Neeli, I., Dwivedi, N., Khan, S. & Radic, M., (2009). Regulation of extracellular chromatin release from neutrophils. *J Innate Immun* 1, 194–201.
- Nicolay, N. H., Lopez Perez, R., Debus, J., & Huber, P. E. (2015). Mesenchymal stem cells – a new hope for radiotherapy-induced tissue damage? *Cancer Letters*, 366(2), 133–140.
- Nielsen, J. M. (2013). Chronic uterine degeneration: when to retire? *British Equine Veterinary Association Congress BEVA Charter* 1, 13–14.
- Ou, R., Sun, Y., Ganjam, V.K. & Weber, K.T., (1996). In situ production of angiotensin II by fibrosed rat myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 28, 1319–1327.
- Peroni, J. F., & Börjesson, D. L. (2011). Anti-Inflammatory and immunomodulatory activities of stem cells. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*, 27(2), 351–362.
- Piestrzeniewicz-Ulanska, D., Brys, M., Semczuk, A., Jakowicki, J., & Krajewska, W. M. (2002). Expression of TGF-beta type I and II receptors in normal and cancerous human endometrium. *Cancer Letters*, 186(2), 231–239.
- Pohlers, D., Brenmoehl, J., Löffler, I., Müller, C. K., Leipner, C., Schultze-Mosgau, S., Wolf, G. (2009). TGF-β and fibrosis in different organs - molecular pathway imprints. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1792(8), 746–756.
- Raghow, R. (1991). Role of transforming growth factor-β in repair and fibrosis. *Chest*. Vol. 99, 61-65

- Rebordão, M., Galvão, a, Szóstek, a, Amaral, a, Mateus, L., Skarzynski, D., & Ferreira-Dias, G. (2014). Physiopathologic mechanisms involved in mare endometrosis. *Reproduction in Domestic Animals*, 49, 82–87.
- Rebordão, M., Pereira, C., Galvão, a., Bravo, P., Szóstek, a, Skarzynski, D. J., & Ferreira-Dias, G. (2014). What is new on the physiopathology of endometrosis in the mare? *Pferdeheilkunde*, 30, 15–18.
- Rebordão, M. R., Carneiro, C., Alexandre-Pires, G., Brito, P., Pereira, C., Nunes, T., Galvão, A., Leitão, A., Vilela, C. & Ferreira-Dias, G. (2014). Neutrophil extracellular traps formation by bacteria causing endometritis in the mare. *Journal of Reproductive Immunology*, 106, 41–49.
- Ricketts, S.W. & Alonso, S., (1991). The effects of age and parity on the development of equine endometrial disease. *Eq. Vet. J.* 23, 189–192.
- Rifkin, D. B. (2005). Latent transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) binding proteins: Orchestrators of TGF- $\beta$  availability. *Journal of Biological Chemistry*, 280(9), 7409–7412.
- Ruiz-Ortega, M., Rodriguez-Vita, J., Sanchez-Lopez, E., Carvajal, G. & Egido, J., (2007). TGF-beta signaling in vascular fibrosis. *Cardiovasc. Res.* 74, 196–206.
- Sakai, N. & Tager, A. M. (2013). Fibrosis of two: Epithelial cell-fibroblast interactions in pulmonary fibrosis. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1832(7), 911–921.
- Salamonsen, L. A. (2003). Tissue injury and repair in the female human reproductive tract. *Reproduction* 125, 301–311
- Schlafer, D. H. (2007). Equine endometrial biopsy: Enhancement of clinical value by more extensive histopathology and application of new diagnostic techniques? *Theriogenology*, 68(3), 413–422.
- Sheppard, D. (2006). Transforming growth factor beta: a central modulator of pulmonary and airway inflammation and fibrosis. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 3(5), 413–417.
- Sheppard, D. (2015). Epithelial–mesenchymal interactions in fibrosis and repair. transforming growth factor- $\beta$  activation by epithelial cells and fibroblasts. *Annals of the American Thoracic Society*, 12 (Supplement 1), S21–S23.
- Siegel, P.M. & Massague, J., (2003). Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat. Rev.Cancer* 3, 807–821.
- Singer, N. G. & Caplan, A. I. (2011). Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. *Annual Review of Pathology*, 6, 457–478.
- Snider, T., Sepoy, C., & Holyoak, G. R. (2011). Equine endometrial biopsy reviewed: observation, interpretation, and application of histopathologic data. *Theriogenology*, 75(9), 1567–1581.
- Stewart, F., Gerstenberg, C., Suire, S. & Allen W.R. (2000). Immunolocalization of a novel protein (P19) in the endometrium of fertile and subfertile mares. *J. Reprod. Fertil.* 56: (Suppl.): 593–599

- Stewart, M. C. (2011). Cell-based therapies: current issues and future directions. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*, 27(2), 393–399.
- Stewart, M. C. & Stewart, A. A. (2011). Mesenchymal stem cells: characteristics, sources, and mechanisms of action. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*, 27(2), 243–261.
- Suire S., Stewart F., Beauchamp J. & Kennedy M.W. (2001). Uterocalin, a lipocalin provisioning the preattachment equine conceptus: fatty acid and retinol binding properties, and structural characterization. *Biochem. J.* 356: 369–376
- Sun, Y., Ramires, F.J., Zhou, G., Ganjam, V.K. & Weber, K.T., (1997). Fibrous tissue and angiotensin II. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 29, 2001–2012.
- Taipale, J., Saharinen, J. & Keski-Oja, J., (1998). Extracellular matrix-associated transforming growth factor-beta: role in cancer cell growth and invasion. *Adv. Cancer Res.* 75, 87–134
- Taylor, A. W. (2009). Review of the activation of TGF-beta in immunity. *Journal of Leukocyte Biology*, 85(1), 29–33.
- Taylor, S. E., & Clegg, P. D. (2011). Collection and propagation methods for mesenchymal stromal cells. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*, 27(2), 263–274.
- ten Dijke, P. & Arthur, H.M., (2007). Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 857–869.
- Ueha, S., Shand, F. H. W., & Matsushima, K. (2012). Cellular and molecular mechanisms of chronic inflammation-associated organ fibrosis. *Frontiers in Immunology*. Vol. 3, 1-6
- Usunier, B., Benderitter, M., Tamarat, R., & Chapel, A. (2014). Management of fibrosis: the mesenchymal stromal cells breakthrough. *Stem Cells International*, 2014, Article ID 340257, 1-26
- van Bezooijen, R.L., Deruiter, M.C., Vilain, N., Monteiro, R.M., Visser, A., van der Wee-Pals, L., van Munsteren, C.J., Hogendoorn, P.C., Aguet, M., Mummery, C.L., Papapoulos, S.E., Ten Dijke, P. & Lowik, C.W., (2007). SOST expression is restricted to the great arteries during embryonic and neonatal cardiovascular development. *Dev. Dyn.* 236, 606–612.
- Van Camp, S.D., (1988). Endometrial biopsy of the mare - a review and update. *Vet Clin North Am Equine Pract* 1988;4:229–45.
- Verrecchia, F. & Mauviel, A. (2007). Transforming growth factor- $\beta$  and fibrosis. *World Journal of Gastroenterology* : WJG, 13 (22), 3056–3062.
- Wahl, S. M., Hunt, D. A., Wakefield, L. M., McCartney-Francis, N., Wahl, L. M., Roberts, A. B. & Sporn, M. B. (1987) Transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 5788–5792
- Walter, I., Handler, J., Reifinger, M. & Aurich, C., (2001) Association of endometriosis in horses with differentiation of periglandular myofibroblasts and changes of extracellular matrix proteins. *Reproduction* 121: 581–586.
- Wakefield, L.M. & Stuelten, C., (2007). Keeping order in the neighborhood: new roles for TGFbeta in maintaining epithelial homeostasis. *Cancer Cell* 12, 293–295.

- Weber, K.T. & Brilla, C.G., (1991). Pathological hypertrophy and cardiac interstitium fibrosis and rennin–angiotensin–aldosterone system. *Circulation* 83, 1849–1865.
- Weiss, D.J. & Ortiz, L.A. (2013) Cell therapy trials for lung diseases: progress and cautions. *Am J Respir Crit Care Med.* 188(2):123–125.
- Wipff, P. J. & Hinz, B. (2008). Integrins and the activation of latent transforming growth factor  $\beta$ 1 - An intimate relationship. *European Journal of Cell Biology*, 87(8-9), 601–615.
- Wynn, T.A., (2007). Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases,” *Journal of Clinical Investigation*, vol. 117, no. 3, pp. 524–529
- Wynn, T.A., (2008). Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 214, 199–210.
- Wynn, T.A., Ramalingam, T.R., (2012). Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med* 18, 1028–1040.