

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

FERNANDA ZETTEL BASTOS

**EFEITOS DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DERIVADAS DE
MEDULA ÓSSEA SOBRE A FUNÇÃO DO MACRÓFAGO
ALVEOLAR DE EQUINOS COM OBSTRUÇÃO RECORRENTE
DAS VIAS AÉREAS**

*(Effects of bone marrow-derived mononuclear cells on the function of alveolar
macrophages from horses with Recurrent Airway Obstruction)*

SÃO JOSÉ DOS PINHAIS

2015

FERNANDA ZETTEL BASTOS

**EFEITOS DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DERIVADAS DE
MEDULA ÓSSEA SOBRE A FUNÇÃO DO MACRÓFAGO ALVEOLAR
DE EQUINOS COM OBSTRUÇÃO RECORRENTE DAS VIAS
AÉREAS**

*(Effects of bone marrow-derived mononuclear cells on the function of alveolar
macrophages from horses with Recurrent Airway Obstruction)*

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciência Animal, área
de concentração Saúde, Tecnologia e
Produção Animal, da Escola de Ciências
Agrárias e Medicina Veterinária da
Pontifícia Universidade Católica do
Paraná, para obtenção do título de Mestre
em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Vicente
Michelotto Junior

Coorientador: Prof^a. Dra. Anita Nishiyama

SÃO JOSÉ DOS PINHAIS

2015

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Câmpus São José dos Pinhais

B327e
2015

Bastos, Fernanda Zettel

Efeitos das células mononucleares derivadas de medula óssea sobre a função do macrófago alveolar de equinos com obstrução recorrente das vias aéreas = Effects of bone marrow-derived mononuclear cells on the function of alveolar macrophages from horses with Recurrent Airway Obstruction / Fernanda Zettel Bastos ; orientador, Pedro Vicente Michelotto Junior; co-orientadora, Anita Nishiyama. – 2015.
xv, 78 f.: il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná,
São José dos Pinhais, 2015

Inclui bibliografias

Texto português e inglês

1. Aparelho Respiratório – Doenças. 2. Cavalo. 3. Terapêutica Veterinária. I. Michelotto Junior, Pedro Vicente. II. Nishiyama, Anita. III. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título. Título: Effects of bone marrow-derived mononuclear cells on the function of alveolar macrophages from horses with Recurrent Airway Obstruction.

CDD 20. ed. – 636.08



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal
Câmpus São José dos Pinhais

PUCPR
GRUPO MARISTA

**ATA Nº 0066 E PARECER FINAL DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
EM CIÊNCIA ANIMAL DA ALUNA FERNANDA ZETTEL BASTOS**

Aos vinte dias do mês de março do ano de dois mil e quinze, às 13:30 horas, realizou-se na sala 08 da Pós-Graduação, 2º andar, Bloco Amarelo, Escola de Ciências Agrárias e Medicina Veterinária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, localizada no Campus de Curitiba, Rua Imaculada Conceição, nº 1155, Prado Velho – Curitiba – PR, a sessão pública de defesa da Dissertação da mestranda Fernanda Zettel Bastos, intitulada: **“EFEITOS DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DERIVADAS DE MEDULA ÓSSEA SOBRE A FUNÇÃO DO MACRÓFAGO ALVEOLAR DE EQUINOS COM OBSTRUÇÃO RECORRENTE DAS VIAS AÉREAS”**. A mestranda concluiu os créditos exigidos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, segundo os registros constantes na secretaria do Programa. Os trabalhos foram conduzidos pelo Professor orientador e Presidente da banca, Dr. Pedro Vicente Michelotto Junior (PUCPR), auxiliado pelas Professoras Doutoras Fernanda Ferreira Cruz (UFRJ) e Alexandra Cristina Senegaglia (PUCPR). Procedeu-se à exposição da Dissertação, seguida de sua arguição pública e defesa. Encerrada a fase, os examinadores expediram o parecer final sobre a Dissertação, que nos termos do Artigo 53 do Regulamento deste Programa de Pós-Graduação, foi considerada Aprovada.

Prof. Dr. Pedro Vicente Michelotto Junior (Presidente)

Assinatura Pedro Vicente Michelotto Junior

Profa. Dra. Fernanda Ferreira Cruz (UFRJ)

Assinatura Fernanda Ferreira Cruz

Profa. Dra. Alexandra Cristina Senegaglia (PUCPR)

Assinatura Alexandra Cristina Senegaglia

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

São José dos Pinhais, 20 de março de 2015.

Renata Ernland Freitas de Macedo

Profa. Dra. Renata Ernland Freitas de Macedo

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Caroline Nocera Bertton

Caroline Nocera Bertton

Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	vi
FORMATO DA DISSERTAÇÃO.....	vii
RESUMO GERAL.....	viii
ABSTRACT.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	X
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
CAPÍTULO 1	
1 INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO 2	
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1A DOENÇA.....	3
2.2 RESPOSTA INFLAMATÓRIA	4
2.2.1 Macrófago Alveolar	5
2.2.2 Neutrófilo	8
2.2.3 Mediadores Inflamatórios	9
2.3 TRATAMENTO	11
2.3.1 Corticoesteróides	11
2.3.2 Terapia Celular e as Células Mononucleares Derivadas de Medula Óssea	13
CAPÍTULO 3	
3 EM EQUINOS, O NÚMERO DE CÉLULAS MONONUCLEARES É MAIOR NA PRIMEIRA ASPIRAÇÃO MEDULAR EM RELAÇÃO ÀS ASPIRAÇÕES SEGUINTE	17
Resumo	17
Abstract	17

3.1 Introdução	18
3.2 Material e Métodos	19
3.2.1 Animais	20
3.2.2 Coleta de Medula Óssea e Contagem de Células Mononucleares	20
3.2.3 Análise Estatística	21
3.3 Resultados	21
3.4 Discussão e Conclusão	22
CAPÍTULO 4	
4 RESPOSTA CELULAR DOS TRATAMENTOS COM DEXAMETASONA ORAL OU INSTILAÇÃO TRAQUEAL DE CÉLULAS MONONUCLEARES AUTÓLOGAS DERIVADAS DA MEDULA ÓSSEA EM EQUINOS COM OBSTRUÇÃO RECORRENTE DAS VIAS AÉREAS	25
Resumo	25
Abstract	26
4.1 INTRODUÇÃO	27
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.2.1 Animais	29
4.2.2 Coleta e Processamento do Fluido do Lavado Broncoalveolar....	31
4.2.3 Isolamento do Macrófago Alveolar	32
4.2.4 Adesão do Macrófago Alveolar	33
4.2.5 Atividade Fagocitária do Macrófago Alveolar.....	33
4.2.6 Mensuração de Citocinas Inflamatórias.....	34
4.2.7 Mensuração da Apoptose Celular	34
4.2.8Análise Estatística	35
4.3 RESULTADOS	35
4.3.1 Animais.....	35
4.3.2 Coleta e Processamento do Fluido do Lavado Broncoalveolar	36

4.3.3 Adesão do Macrófago Alveolar	41
4.3.4 Atividade Fagocitária do Macrófago Alveolar	42
4.3.5 Mensuração de Citocinas Inflamatórias.....	42
4.3.6 Mensuração da Apoptose Celular	44
4.4 DISCUSSÃO.....	45
4.5 CONCLUSÃO.....	51
CAPÍTULO 5	
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
REFERÊNCIAS	53
ANEXOS	75

Aos cavalos,
que sempre foram o motivo de tudo.

AGRADECIMENTOS

À minha família, especialmente minha mãe, que sempre esteve ao meu lado e me apoiou desde o início.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Pedro Vicente Michelotto Jr., que mesmo sem me conhecer confiou seu projeto a mim, me incentivando e ensinando durante esses dois anos.

À Profa. Dra. Cláudia Turra Pimpão, que me incentivou a participar deste programa de mestrado e me indicou ao Prof. Pedro.

Aos companheiros de mestrado Fernanda Mendes, Sandra, Luís Fernando, Amarildo e Luiza, pela ajuda sempre que fosse necessária.

À equipe do Laboratório de Metabolismo Celular da UFPR, da coorientadora Profa. Dra. Anita Nishiyama, Ana Lúcia e Dalva, que contribuíram com o conhecimento necessário para o início do projeto.

Ao Laboratório de Cultivo Celular da PUCPR, do Prof. Dr. Paulo Brofman, com a equipe parceira desse projeto durante toda sua execução, Alexandra, Lidiane, Letícia, Fabiane, Felipe, obrigada por nos fornecer espaço, compartilhar conhecimentos e pelas risadas nos momentos de descontração.

Ao Regimento de Polícia Montada Coronel Dulcídio e a equipe do Centro Veterinário da PMPR, Ênio, Filipe, Amanda, Vladimir, por nos ceder alguns de seus animais para o estudo e a estrutura física do Haras Barigui.

FORMATO DA DISSERTAÇÃO

A presente dissertação é composta por capítulos.

O capítulo 1 apresenta uma introdução geral e os objetivos de estudo desta dissertação.

O capítulo 2 trata-se de revisão de literatura.

O capítulo 3 se refere a um “short communication”, produzido a partir dos pilotos do estudo, para publicação em periódico científico.

O capítulo 4 se refere a um artigo para publicação em periódico científico.

O capítulo 5 finaliza esta dissertação com conclusões gerais deste trabalho e com sugestões para estudos futuros.

As referências de todos os capítulos se encontram em lista única ao final da dissertação.

RESUMO GERAL

Introdução: A Obstrução Recorrente das Vias aéreas (ORVA) é uma doença inflamatória e obstrutiva, comum em cavalos adultos estabulados. **Objetivo:** Estudar a recuperação de células mononucleares na coleta de medula óssea do esterno de equinos em idade avançada, e avaliar a segurança e a resposta a nível celular das células mononucleares derivadas de medula óssea (CMDMO) como tratamento de cavalos com ORVA crônica. **Material e Métodos:** Previamente ao experimento, quatro animais tiveram a medula óssea coletada sob sedação com acepromazina, xilazina e cloridrato de petidina, obtendo-se 200 mL de medula óssea a partir do esterno. Aliquotas de 500 µL da primeira e da última seringa coletadas, em cada ponto de punção, foram armazenadas para contagem do número total de células nucleadas. Para o tratamento da ORVA, oito cavalos foram incluídos no estudo, divididos aleatoriamente em grupo tratado com única instilação traqueal de CMDMO (Gcel) e outro com terapia convencional de dexametasona oral por 21 dias (Gdex). Os tratamentos iniciaram a partir da confirmação do quadro clínico e os animais foram avaliados antes do início do tratamento (0 dia), aos 7 e 21 dias. Após a sedação com detomidina e cloridrato de petidina, coletou-se o fluido do lavado broncoalveolar (LBA) com instilação de 500 mL de solução salina estéril a 37°C. A partir do fluido do LBA foi feita análise de volume recuperado, avaliação citológica total e diferencial, atividade dos macrófagos alveolares (adesão e fagocitose), mensuração de interleucina 1β e fator de necrose tumoral α, e apoptose celular. **Resultados:** Foi possível a obtenção de 200 mL de medula por animal, por meio de duas até quatro punções. A média para a primeira seringa de cada punção foi de $41,73 \times 10^6$ células vs. $5,88 \times 10^6$ células para a última seringa ($p < 0,0001$). Para o estudo da ORVA, em ambos os tratamentos a percentagem de neutrófilos reduziu significativamente na avaliação dos 7 dias (Gdex: $15,7 \pm 6,8\%$ vs. $63,0 \pm 12,8\%$, $p < 0,0001$ – Gcel: $19,0 \pm 20\%$ vs. $53,2 \pm 19,8\%$, $p = 0,004$) e 21 dias (Gdex: $15,0 \pm 9,9\%$ vs. $63,0 \pm 12,8\%$, $p < 0,0001$ – Gcel: $22,0 \pm 28,5\%$ vs. $53,2 \pm 19,8\%$, $p = 0,023$) em comparação com a avaliação inicial. Essa diminuição foi acompanhada pelo aumento significativo no número de macrófagos alveolares, igualmente aos 7 dias (Gdex: $61,2 \pm 7,4\%$ vs. $24,2 \pm 10,7\%$, $p < 0,0001$ – Gcel: $52,2 \pm 17,4\%$ vs. $24,7 \pm 5,3\%$, $p = 0,0012$) e 21 dias (Gdex: $60,0 \pm 20,2\%$ vs. $24,2 \pm 10,7\%$, $p = 0,0006$ – Gcel: $54,7 \pm 21,5\%$ vs. $24,7 \pm 5,3\%$, $p = 0,0026$). A adesão e a fagocitose do macrófago alveolar apresentaram aumento significativo apenas no grupo Gdex ($p < 0,05$). Já a secreção de interleucina 1β foi menor no grupo Gcel quando comparado ao Gdex aos 7 dias ($p = 0,0077$) e 21 dias de tratamento ($p = 0,0020$). A apoptose celular diminuiu significativamente em ambos os grupos aos 21 dias (Gdex $p = 0,0039$ – Gel $p = 0,0285$). **Conclusão:** Houve redução do número de células mononucleares após sucessivas aspirações de medula óssea em um mesmo ponto de coleta. O tratamento com CMDMO se mostrou seguro, melhorou o perfil celular no fluido do LBA de cavalos com ORVA, diminuiu a secreção de IL-1β e interferiu positivamente na atividade do macrófago alveolar.

Palavras-chave: Macrófago Alveolar. Neutrófilo. Fluido do Lavado Broncoalveolar. Terapia celular.

ABSTRACT

Introduction: Recurrent Airway Obstruction (RAO) is an inflammatory and obstructive disease, common in adult stabled horses. **Objective:** Study the recovery of mononuclear cells in the bone marrow collection from the sternum in animals with advanced age, and evaluate the safety and response at the cellular level of bone marrow-derived mononuclear cells (BMDMC) as a treatment of horses with chronic RAO. **Material and Methods:** Prior to the experiment, four animals had the bone marrow collected under sedation with acepromazine, xylazine and hydrochloride of pethidine for the collection of 200 mL of bone marrow from the sternum. Aliquots of 500 μ L from the first and last syringe collected in each puncture point were stored for counting to the total number of nucleated cells. For the treatment of RAO, eight horses were studied, randomly divided into the group treated with a single tracheal instillation of BMDMC (Gcel) or treated with conventional therapy of oral dexamethasone for 21 days (Gdex). The treatments started from the confirmation of the disease and the animals were evaluated before treatment (0 day), after 7 and 21 days. After sedation with detomidine and hydrochloride of pethidine, it was collected the bronchoalveolar lavage (BAL) fluid, instilling 500 mL of a sterile saline solution at 37 °C. From the BAL fluid was made the recovered volume analysis, cytological analysis with total and differential cell count, activity of alveolar macrophages (adhesion and phagocytosis), interleukin-1 β and tumor necrosis factor α mensuration, and cell apoptosis. **Results:** It was possible to obtain 200 mL of bone marrow per animal, with two to four punctures. The mean for the first syringe was 41.73×10^6 cells vs. 5.88×10^6 cells for the last syringe ($p < 0.0001$). For the study of RAO, in both treatments the percentage of neutrophils was significantly reduced after 7 days (Gdex: $15,7 \pm 6,8\%$ vs. $63,0 \pm 12,8\%$, $p < 0,0001$ – Gcel: $19,0 \pm 20\%$ vs. $53,2 \pm 19,8\%$, $p = 0,004$) and 21 days (Gdex: $15,0 \pm 9,9\%$ vs. $63,0 \pm 12,8\%$, $p < 0,0001$ – Gcel: $22,0 \pm 28,5\%$ vs. $53,2 \pm 19,8\%$, $p = 0,023$) compared to baseline. This reduction was accompanied by a significant increase in alveolar macrophages also after 7 days (Gdex: $61,2 \pm 7,4\%$ vs. $24,2 \pm 10,7\%$, $p < 0,0001$ – Gcel: $52,2 \pm 17,4\%$ vs. $24,7 \pm 5,3\%$, $p = 0,0012$) and 21 days (Gdex: $60,0 \pm 20,2\%$ vs. $24,2 \pm 10,7\%$, $p = 0,0006$ – Gcel: $54,7 \pm 21,5\%$ vs. $24,7 \pm 5,3\%$, $p = 0,0026$). The adhesion and phagocytosis of alveolar macrophages increased significantly only in Gdex group ($p < 0,05$). The secretion of interleukin 1 β was lower in the Gcel group compared to Gdex group at 7 days ($p = 0,0077$) and 21 days of treatment ($p = 0,002$). Cell apoptosis was significantly decreased in both groups in the 21 days evaluation (Gdex $p = 0,0039$ - Gcel $p = 0,0285$). **Conclusion:** There was a reduction in the number of nucleated cells after repeated aspirations at the same puncture. The treatment with BMDMC was safe, improved BAL cell profile, reduced IL-1 β secretion and positive influenced the activity of alveolar macrophage.

Keywords: Alveolar Macrophage. Neutrophil. Bronchoalveolar Lavage Fluid. Cellular Therapy.

LISTA DE ABREVIATURAS

7-AAD	7-aminoactinomicina
ANOVA	Análise de variância
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CMDMO	Células mononucleares derivadas de medula óssea
ELISA	<i>Enzyme linked immuno sorbant assay</i>
Gcel	Grupo tratado com células mononucleares autólogas derivadas de medula óssea
Gdex	Grupo tratado com dexametasona oral
IFN- γ	Interferon gama
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucina
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
IV	Intravenosa
LBA	Lavado Broncoalveolar
M1	Macrófago ativado pela via clássica
M2	Macrófago ativado pela via alternativa
MIP-2	Proteína inflamatória de macrófago 2 (<i>macrophage inflammatory protein 2</i>)
NF- κ B	Fator nuclear kappa B (<i>nuclear fator kappa B</i>)
NO	Óxido nítrico (<i>nitric oxide</i>)
ORVA	Obstrução Recorrente das Vias Aéreas
PBS	Solução salina fosfatada tamponada (<i>Phosphate buffered saline solution</i>)
PUCPR	Pontifícia Universidade Católica do Paraná
SD	Desvio padrão (<i>standard deviation</i>)
Th	T auxiliar (<i>T helper</i>)
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa (<i>tumor necrosis fator alpha</i>)

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Valores em milhões de células mononucleares por mililitro de medula óssea coletada do esterno de equinos, na primeira e última seringa de cada punção	22
Tabela 2. Percentagem de volume recuperado, contagem de células nucleadas e contagem percentual dos diferentes tipos celulares no fluido do lavado broncoalveolar de equinos com Obstrução Recorrente das Vias Aéreas, do grupo tratado com dexametasona (Gdex) e do grupo tratado com instilação traqueal de células mononucleares derivadas de medula óssea (Gcel). Valores expressos como média $\pm$ SD	37

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	A) Coleta de medula óssea a partir do esterno de equinos, com agulha Jamshidi 11G e seringa de 20 mL. B) Seringas de 20 mL previamente preenchidas com meio IMDM e heparina sódica, e seringas já com aproximadamente 7 mL de medula óssea coletada.....	21
Figura 2.	Equino durante o período de indução, com a cama de serragem sendo revirada uma vez por dia.....	30
Figura 3.	Esquema do delineamento experimental utilizado com os oito animais do estudo, desde o início do experimento, até a última avaliação prevista, aos 21 dias após início do tratamento dos equinos com Obstrução Recorrente das Vias Aéreas.....	31
Figura 4.	Coleta do fluido do lavado broncoalveolar em equino, utilizando uma sonda flexível de silicone introduzida via nasotraqueal.....	32
Figura 5.	Lâminas confeccionadas a partir do fluido do lavado broncoalveolar de equinos com Obstrução Recorrente das Vias Aéreas, grupo tratado com dexametasona oral. Coloração: Panótico Rápido. Aumento: 1000 x. A) Avaliação inicial e confirmação do quadro clínico. B) Avaliação após sete dias de tratamento com dexametasona oral. C) Avaliação após 21 dias de tratamento com dexametasona oral.....	38

- Figura 6. Lâminas confeccionadas a partir do fluido do lavado broncoalveolar de equinos com Obstrução Recorrente das Vias Aéreas, grupo tratado com instilação traqueal de células mononucleares autólogas derivadas de medula óssea. Coloração: Panótico Rápido. Aumento: 1000 x. A) Avaliação inicial e confirmação do quadro clínico. B) Avaliação após sete dias da instilação traqueal de células mononucleares. C) Avaliação após 21 dias da instilação traqueal de células mononucleares..... 39
- Figura 7. Percentagem de neutrófilos no fluido do lavado broncoalveolar de equinos com Obstrução Recorrente das Vias Aéreas do quadro inicial à avaliação dos 21 dias de tratamento com dexametasona oral (Gdex) e do quadro inicial aos 21 dias após instilação traqueal de células mononucleares autólogas derivadas da medula óssea (CMDMO). ^ap<0,0001 vs. Gdex 0d; ^bp=0,004 vs. Gcel 0d; ^cp=0,023 vs. Gcel 0d..... 39
- Figura 8. Percentagem de macrófagos no fluido do lavado broncoalveolar de equinos com Obstrução Recorrente das Vias Aéreas do quadro inicial à avaliação dos 21 dias de tratamento com dexametasona oral (Gdex) e do quadro inicial aos 21 dias após instilação traqueal de células mononucleares autólogas derivadas da medula óssea (CMDMO). ^ap<0,0001 vs. Gdex 0d; ^bp=0,0006 vs. Gdex 0d; ^cp=0,0012 vs. Gcel 0d; ^dp=0,0026 vs. Gcel 0d..... 40

- Figura 9. Capacidade de adesão de macrófagos alveolares de equinos com Obstrução Recorrente das Vias Aéreas do quadro inicial à avaliação dos 21 dias de tratamento com dexametasona oral (Gdex) e do quadro inicial aos 21 dias após instilação traqueal de células mononucleares autólogas derivadas da medula óssea (CMDMO). ^ap<0,0001 vs. Gdex 0d; ^bp=0,0006 vs. Gdex 0d; ^cp=0,0082 vs. Gdex 0d..... 41
- Figura 10. Atividade fagocitária de macrófagos alveolares de equinos com Obstrução Recorrente das Vias Aéreas do quadro inicial à avaliação dos 21 dias de tratamento com dexametasona oral (Gdex) e do quadro inicial aos 21 dias após instilação traqueal de células mononucleares autólogas derivadas da medula óssea (CMDMO). ^ap=0,0386 vs. Gdex 0d..... 42
- Figura 11. Secreção de interleucina 1 β (pg/mL) por macrófagos alveolares de cavalos com Obstrução Recorrente das Vias Aéreas, tratados com dexametasona oral ou com instilação traqueal de células mononucleares autólogas derivadas de medula óssea. O método utilizado para detecção foi o ELISA (*Enzyme linked immuno sorbant assay*). ^ap=0,0077 vs. Gdex 7d; ^bp=0,002 vs. Gdex 21d.... 43
- Figura 12. Secreção de fator de necrose tumoral α (pg/mL) por macrófagos alveolares de cavalos com Obstrução Recorrente das Vias Aéreas, tratados com dexametasona oral ou com instilação traqueal de células mononucleares autólogas derivadas de medula óssea. O método utilizado para detecção foi o ELISA (*Enzyme linked immuno sorbant assay*)..... 44

Figura 13. Apoptose das células de cavalos com Obstrução Recorrente das Vias Aéreas, tratados com dexametasona oral ou com instilação traqueal de células mononucleares autólogas derivadas de medula óssea. O resultado foi obtido por meio de citometria de fluxo das células do fluido do lavado broncoalveolar com o reagente Annexin V. ^ap=0,0039 vs. Gdex 0d, ^bp=0,0285 vs. Gcel 0d.....

45

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

As doenças respiratórias são a segunda causa de queda de desempenho em cavalos, ficando atrás apenas das afecções musculoesqueléticas (Wilsher et al., 2006). Dentro desse quadro, a Obstrução Recorrente das Vias Aéreas (ORVA) se tornou uma das doenças respiratórias mais comuns diagnosticadas em animais adultos (Bowles et al., 2002), visto que muitos cavalos são mantidos estabulados e expostos ao contato com poeira, esporos de fungos e endotoxinas (Robinson et al., 2002; Couëtil et al., 2007; Marinkovic et al., 2007).

Os pulmões dos equinos necessitam ter um bom sistema de limpeza de partículas, sendo este altamente dependente da fagocitose, onde os macrófagos alveolares e os neutrófilos são importantes (Muehlmann et al., 2012). O fluido do lavado broncoalveolar (LBA) de cavalos saudáveis possui cerca de 60% de macrófagos alveolares (McKane et al., 1993; Fernandes et al., 2000), enquanto os cavalos com ORVA apresentam uma concentração de neutrófilos que pode chegar a 50-70% (Leclerc et al., 2011).

O macrófago alveolar é o principal responsável pela resposta imunológica inata para eliminação de partículas que atingem as vias aéreas (Peters-Golden, 2004; Geiser, 2010). Em animais com ORVA, a contínua fagocitose de alérgenos e irritantes exercida pelos macrófagos leva-os a secretarem interleucina (IL)-8, que atrai os neutrófilos aos alvéolos (Franchini et al., 1998). Uma vez nos pulmões, os neutrófilos liberam mediadores pró-inflamatórios que contribuem para o agravamento do quadro clínico, sendo necessário tratar o animal.

Os tratamentos atuais para a ORVA buscam o alívio dos sintomas e melhora na qualidade de vida dos animais acometidos, visto que a doença não tem cura conhecida. O ideal é realizar um controle ambiental para a redução da exposição aos antígenos e, quando possível, manter o cavalo a pasto (Couëtil et al., 2005). Aliado a essas medidas, pode-se iniciar a administração de corticosteróides.

Apesar dos corticoesteróides terem se mostrado efetivos no controle dos sintomas clínicos da ORVA (Leclere et al., 2011), seu uso crônico está associado a inúmeros efeitos colaterais, o que torna necessária a busca por novas abordagens terapêuticas.

Os estudos com aplicação da terapia celular para o tratamento de doenças respiratórias vêm apresentando efeitos benéficos. A terapia com células-tronco pode reduzir o nível de citocinas inflamatórias secretadas por macrófagos (Gupta et al., 2007; Xu et al., 2007), modular a resposta imunológica (Abreu et al., 2011) e reduzir o número de neutrófilos (Cruzetal., 2012).

Dentro do contexto da terapia celular, as células mononucleares derivadas de medula óssea (CMDMO) apresentaram bons resultados em doenças respiratórias e algumas vantagens em termos de técnica, tendo menores custos e menor tempo de processamento (Abreu et al., 2013).

Contudo, apesar dos efeitos benéficos e promissores da terapia celular nas doenças respiratórias em humanos e em camundongos, não se tem estudo sobre os benefícios desta no processo inflamatório pulmonar em equinos.

Assim, o objetivo desse trabalho é avaliar a segurança e a resposta a nível celular das CMDMO, como tratamento de cavalos com ORVA crônica, comparando-as com a terapia convencional com dexametasona. Os parâmetros avaliados serão divididos em avaliação do volume recuperado e composição celular do fluido do LBA, atividade dos macrófagos alveolares dos cavalos tratados, mensuração da secreção de moduladores inflamatórios e da apoptose celular. Adicionalmente, objetivou-se estudar a recuperação de células mononucleares na coleta de medula óssea do esterno de equinos em idade avançada.

A hipótese do trabalho é de que as CMDMO podem interferir na resposta das células envolvidas no quadro inflamatório, influenciando no perfil celular, secreção de moduladores inflamatórios, adesão e fagocitose dos macrófagos alveolares de equinos com ORVA.

CAPÍTULO 2

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A DOENÇA

A Obstrução Recorrente das Vias Aéreas (ORVA) é uma doença inflamatória e obstrutiva que se torna evidente em cavalos adultos, estabulados por longos períodos (Robinson et al., 2002; Marinkovic et al., 2007) e é uma das afecções mais comuns diagnosticadas no pulmão equino (Bowles et al., 2002), afetando entre 10 e 20% dos cavalos em climas temperados (Hotchkiss et al., 2007).

Nenhum gênero ou raça foi descrito até agora com predisposição à doença, porém existem estudos genéticos que afirmam que potros de ambos os pais afetados tem de 38% a 48% de risco de desenvolver a ORVA (Ramseyer et al., 2007). Klukowska-Rötzler et al. (2012) comprovaram o envolvimento do gene para o receptor de interleucina (IL)-4 na patogênese da ORVA. Em humanos asmáticos essa característica já é bem descrita, onde se afirma ocorrer mutações na região promotora do gene para o receptor de IL-4.

A estabulagem e as pistas de treinamento as quais os cavalos são expostos frequentemente levam o animal a inalar uma grande quantidade de partículas e a deposição das mesmas no epitélio alveolar, o que prejudica a função pulmonar (Tetley, 2002).

Entre as partículas inaladas estão incluídas endotoxinas, β -D-glucan de fungos, partículas ultrafinas (<100nm de diâmetro), microorganismos, material vegetal, esporos, poeira inorgânica e gases tóxicos (Robinson, 2001; Couëtil et al., 2007). A alimentação também é um risco para os animais, uma vez que existem fatores presentes no feno que favorecem a doença, como toxinas e esporos de *Faenia rectivirgula* e *Aspergillus fumigatus* (McGorum et al., 1993; Pirie et al., 2003).

Uma outra forma da ORVA ocorre quando os cavalos estão a pasto, durante os meses de verão, e é chamada de Doença Pulmonar Obstrutiva Associada à Pastagem de Verão (Bowles et al., 2002).

A ORVA é clinicamente caracterizada pela presença de tosse, dispneia, queda de desempenho em animais atletas, broncoconstrição e ausência de febre. O padrão respiratório de cavalos doentes é típico, tendo à expiração prolongada e o músculo abdominal oblíquo é recrutado para ajudar, o que causa sua hipertrofia e a formação da chamada linha de heaves.

Na auscultação, percebem-se sons respiratórios proeminentes devido a obstrução e ao esforço respiratório, concomitante a sibilos em vários pontos (Robinson, 2001; Robinson et al., 2002; Couëtil et al., 2007; Kutasi et al., 2011; Aharonson-Raz et al., 2012). Essas alterações estão relacionadas a quatro mecanismos principais: estresse oxidativo, inflamação, desequilíbrio protease-antiprotease e apoptose (MacNee, 2005).

O diagnóstico da ORVA é realizado com a associação de vários métodos, incluindo o exame clínico, endoscopia das vias aéreas, análise do fluido do lavado broncoalveolar (LBA), citologia e teste de função pulmonar (Hoffman, 2002).

O cavalo com ORVA tem quadro de desenvolvimento natural muito semelhante à asma humana, sendo utilizado como modelo de estudo. Isso possibilita o estudo da doença do cavalo e também da asma, em diferentes momentos e condições, para o entendimento dos mecanismos fisiopatológicos e da resposta a tratamentos propostos (Leclerc et al., 2011).

2.2 RESPOSTA INFLAMATÓRIA

Como sugerido por Medzhitov (2010), a inflamação tem quatro componentes básicos: (a) Indutores, que são estímulos endógenos ou exógenos para a inflamação, tais como os produtos de microorganismos ou células lesionadas; (b) Sensores, que consistem principalmente de macrófagos e mastócitos residentes que expressam receptores para os indutores e respondem através da produção de uma variedade de mediadores pró-inflamatórios; (c) Os mediadores na forma de citocinas, quimiocinas, aminas, e eicosanóides liberados pelos sensores; (d) Os efetores que consistem em células adjacentes em tecidos que respondem aos mediadores, amplificando seus sinais para iniciar o exsudado de plasma e leucócitos.

Em cavalos, o enorme volume da área broncoalveolar dos pulmões, em torno de 2.000m², representa a maior interface entre os meios exterior e interior, além de uma grande porta de entrada para os invasores. Portanto, isto requer um grande número de células especializadas na fagocitose e eliminação de partículas inaláveis (Carlton e McGavin, 1998).

O fluido do LBA de animais sadios apresenta predominantemente macrófagos alveolares, seguidos de linfócitos, e não deve exceder 5% para neutrófilos, 2% de mastócitos e de 1% de eosinófilos (Viel, 2003). Já em cavalos com ORVA, a citologia é alterada para uma diminuição no número de macrófagos, mas que agora aparecem ativados, e um aumento significativo no número de neutrófilos (Derksen, 1985), totalizando no mínimo 25% das células totais (Leclerc et al. 2011), sendo considerado um indicador para o diagnóstico da doença (McGorum and Dixon, 1994). Porém, este quadro característico é observado na fase aguda da ORVA e no período de remissão clínica, a predominância é de linfócitos (Derksen, 1985).

Outra característica do fluido do LBA na ORVA é o aumento na contagem total de células e a presença de muco (Lessa et al., 2007). Um achado consistente no muco de cavalos doentes são as espirais de Curschmann, mas as mesmas não são patognomônicas para a doença, podendo ser encontradas em outras morbidades, como pneumonia e tuberculose (Marinkovic et al., 2007).

As duas principais células envolvidas na ORVA, macrófagos alveolares e neutrófilos, estão relacionadas desde a chegada de um alérgeno ao pulmão, até o final do processo de fagocitose. Se um alérgeno chega ao pulmão, os macrófagos alveolares começam a secretar fatores quimiotáticos que recrutam neutrófilos para o local. Na sequência, os neutrófilos vão englobar as partículas invasoras e são então fagocitados pelos macrófagos, que podem ser engolidos ou expectorados junto ao muco (Lehnert, 1992; Geiser, 2010).

2.2.1 Macrófago Alveolar

O macrófago alveolar é uma célula grande, com 15-40 µm de diâmetro, e com uma alta relação citoplasma:núcleo de 3:1. Essas células apresentam-se

frequentemente vacuolizadas e podem conter debris celulares fagocitados (Horohov, 2004).

O macrófago é a célula residente do sistema imunológico que predomina nas vias aéreas e, devido à sua localização e fenótipo particular, é o principal responsável pela resposta imunológica inata para eliminação de partículas que atingem as vias aéreas (Peters-Golden, 2004; Geiser, 2010).

O macrófago alveolar pertence a um fenótipo de macrófagos com funções biológicas distintas, mas com papel fisiopatológico importante (Wu et al., 2005), sendo responsável por ativar as respostas inflamatórias de forma suficiente a eliminar agentes agressores, mas sem exagerar na resposta afim de não comprometer a troca gasosa (Peters-Golden, 2004), além de apresentar a capacidade de aumentar ou de suprimir respostas inflamatórias (Wu et al., 2005).

Uma vez nos tecidos, os macrófagos adquirem propriedades funcionais e morfológicas distintas, direcionadas pelo tecido e o microambiente imunológico. Os macrófagos podem ser divididos em duas subpopulações. Os macrófagos ativados pela via clássica (M1), apresentam propriedades pró-inflamatórias e citotóxicas, e podem proteger o organismo contra patógenos intracelulares. Estes são gerados pela combinação entre interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Já os macrófagos ativados pela via alternativa (M2), apresentam propriedades anti-inflamatórias, agem no reparo tecidual e são gerados pela IL-4 e IL-13 (Verreck et al., 2006; Martinez et al., 2009).

No geral, macrófagos M1 tem fenótipo para alta expressão de IL-12 e IL-23, baixa expressão de IL-10, são produtores de moléculas efetoras (espécies reativas do oxigênio e nitrogênio) e citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF, IL-6), participam como indutores e efetores de respostas Th1 e mediam a resistência contra parasitas intracelulares e tumores (Mantovani et al., 2013). Em contraste, os macrófagos M2 tem um fenótipo para baixa expressão de IL-12 e IL-23 e alta expressão de IL-10, com a capacidade de produzir citocinas inflamatórias, dependendo do sinal. Em geral, células M2 participam de respostas Th2, defesa de parasitas (Noel et al., 2004), atenuam a inflamação, levam à promoção do remodelamento de tecidos (Wynn, 2004), reparação e cicatrização, além de imuno-regulação (Biswas e Mantovani, 2010).

Macrófagos M1 podem produzir óxido nítrico (NO), que é importante para a sua atividade microbicida (MacMicking et al., 1997). Já os macrófagos M2 não produzem NO, mas expressam altos níveis de Arg1, que catalisa a produção de poliaminas, o que é necessário para a síntese de colágeno, proliferação celular, fibrose e outras funções relacionadas ao remodelamento (Pesce et al., 2009). Na asma humana, o remodelamento tecidual, incluindo a deposição de colágeno e hiperplasia celular, envolve a polarização de macrófagos M2 por IL-4 e IL-13 (Wynn, 2003), embora células de múltiplos fenótipos são encontrados *in situ* (Moreira e Hogaboam, 2011).

A atuação pró-inflamatória do macrófago alveolar ocorre pela elaboração de citocinas produzidas por linfócitos T auxiliares (Th)1, como IL-1 β e TNF- α (Laan et al., 2006), o que causa a hiperresponsividade das vias aéreas. Em adição, as ações microbicidas dos macrófagos alveolares podem ser mediadas pelo NO, através do seu efeito positivo na atividade do fator nuclear kappa B (NF- κ B) (Connelly et al., 2003).

Por outro lado, os efeitos supressores da inflamação ocorrem através da síntese de 15-deoxy-PGJ2 e lipoxina A4 (Peters-Golden, 2004). A proteína-A da substância surfactante também exerce ação antiinflamatória sobre os macrófagos alveolares, resultando no aumento da eliminação de diversos microorganismos e reduzindo a secreção de citocinas inflamatórias (Alcorn e Wright, 2004).

Laan et al. (2006) estudaram a resposta dos macrófagos alveolares em cavalos suscetíveis e não suscetíveis à ORVA e sugeriram que a suscetibilidade à doença não depende somente da imunidade adaptativa, mas também da resposta imunológica inata. O mesmo autor afirma que o macrófago alveolar cultivado de equinos fornece um modelo *ex vivo* conveniente, reprodutível, e relevante com o qual se pode avaliar a patogênese de doenças respiratórias (Laan et al., 2005).

Considerando-se as células que participam da resposta imunológica inata, é evidente o papel dos macrófagos nas doenças respiratórias (Peters-Golden, 2004) e relevante o estudo dos mesmos para entendimento dos seus mecanismos de ação, associação com outras células e secreção de mediadores químicos que podem agravar o quadro.

2.2.2 Neutrófilo

A contínua fagocitose exercida pelos macrófagos os estimula a secretarem IL-8, que atrai neutrófilos ao alvéolo (Franchini et al., 1998) e assim, o achado citológico mais consistente no fluido do lavado broncoalveolar (LBA) em cavalos com ORVA é a neutrofilia, representando 50-70% do total de células presentes (Rush et al., 1998).

Em um cavalo saudável esse quadro é reversível após cessamento da exposição, com apoptose dos neutrófilos e sua fagocitose pelos macrófagos alveolares. Já os cavalos doentes apresentam uma apoptose espontânea tardia, causando uma injúria ao tecido pelas enzimas dos neutrófilos que continuam no local (Haslett, 1999; Brazil et al., 2005).

A apoptose é o maior mecanismo de controle de neutrófilos no local da inflamação. Uma falha nesse mecanismo pode levar uma inflamação simples a se tornar aguda. O grande aumento no número de neutrófilos no pulmão pode levar os macrófagos a falharem na fagocitose dos neutrófilos apoptóticos, levando à necrose e consecutivamente o aumento de moléculas pró-inflamatórias (Haslett, 1999).

Com a participação de mediadores inflamatórios como a proteína inflamatória de macrófago 2 (MIP-2), TNF- α e IL-1 β , além da IL-8 (Joubert et al., 2011; Leclerc et al., 2011), entre três e cinco horas ocorre um aumento importante na quantidade de neutrófilos no fluido broncoalveolar (Fairbairn et al., 1993; Léguillette, 2003). Uma vez nos pulmões, os neutrófilos contribuem para a broncoconstrição, hipersecreção de muco e remodelamento pulmonar, pela liberação de mediadores pró-inflamatórios tais como oTNF- α , matriz metaloproteinases, elastase e espécies reativas do oxigênio e do nitrogênio (Weiss, 1989; Linden et al., 2000).

O remodelamento causado pelo influxo de neutrófilos resulta em aumento na produção de muco, hipertrofia da musculatura lisa, fibrose peribronquial, estreitamento das vias aéreas e neovascularização, com consequente agravamento da dispnéia, o que conduz a perda de função pulmonar, e a menores possibilidades de tratamento efetivo (Robinson, 2001; Nelson et al., 2003).

O estresse oxidativo evidenciado no pulmão dos cavalos com ORVA está diretamente relacionado à inflamação pulmonar e à neutrofilia (Kirschvink et al., 2008),

que leva ao aumento da produção de ânion superóxido por neutrófilos após exposição à poeira orgânica ambiental (Marr et al., 1997).

Níveis aumentados de oxidantes provenientes do oxigênio aumentam a resposta inflamatória, diretamente ou via formação de produtos da peroxidação lipídica, induzem a broncoconstrição, aumentam a responsividade e permeabilidade das vias aéreas (Caramori e Papi, 2004), além de estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias (Deaton, 2006), levando a um agravamento da doença (Kirkham e Rahman, 2006).

2.2.3 Mediadores Inflamatórios

Citocinas e mediadores inflamatórios são responsáveis pela coordenação e persistência do quadro inflamatório crônico nas vias aéreas, já que são capazes de induzir vários efeitos pró-inflamatórios (Chung e Barnes, 1999).

Embora os sintomas clínicos da ORVA sejam bem definidos, os mecanismos imunológicos ainda estão sendo discutidos. No entanto, uma resposta predominantemente Th2 tem sido demonstrada com um aumento de IL-4, IL-5 e IL-13 e uma diminuição da expressão de IFN- γ e IL-2 no fluido do LBA (Lavoie et al., 2001; Bowles et al., 2002).

Entretanto, com a cronicidade da reação inflamatória nas vias aéreas dos cavalos afetados, a inversão da resposta para o perfil Th1 também tem sido observada (Ainsworth et al., 2003). Esta discrepância pode ser atribuída a diferenças no estágio clínico da doença ou no tempo de amostragem.

Recentemente, Cordeau et al. (2004) avaliaram os perfis de expressão Th1 e Th2 no fluido do LBA. Os resultados mostraram que cavalos durante a crise têm uma predominância do tipo Th2 na resposta à inalação de alérgenos, associada ao agravamento da obstrução das vias aéreas. Após à exposição prolongada a alérgenos, esta resposta entra em uma fase crônica caracterizada por um aumento de produção de IL-8 e IFN- γ , características Th1 (Horohov et al., 2002). É possível observar o aumento de um perfil e a diminuição de outro porque existem alguns mecanismos antagonistas, como IFN- γ produzido por Th1 inibe as células Th2 e IL-10 produzido por células Th2 inibe Th1.

Além disso, acredita-se que a IL-17 seja um dos primeiros fatores de controle para secreção de citocinas em doenças pulmonares. Ela induz a liberação de outros mediadores químicos através das células epiteliais brônquicas, macrófagos e fibroblastos, dominando a atividade da elastase e mieloperoxidase com o agravamento da inflamação (Hoshino et al., 2000; Molet et al., 2001). Um estudo de Debrue et al. (2005) demonstrou que a IL-17 tem sua expressão aumentada em cavalos com ORVA e não em animais controle, expostos às mesmas condições, podendo ser um contribuinte do fenótipo da doença e recrutamento de neutrófilos para as vias aéreas.

O papel da IL-17 em doenças pulmonares envolve a ativação e recrutamento de neutrófilos para as vias aéreas, por meio de quimiocinas como a IL-8 (Franchini et al., 2000; Hellings et al., 2003). Ela também pode contribuir para a hipersecreção de muco, por estimular a expressão de gene MUC5AC (Gerber et al., 2003), que curiosamente, dentro de um painel de 19 citocinas, apenas a IL-17 e a IL-6 foram capazes de estimular sua expressão. Os genes-alvo da IL-17 incluem genes de citocinas pró-inflamatórias e hematopoiéticas, quimiocinas, peptídeos antimicrobianos e substâncias de remodelamento de tecidos (Xu e Cao, 2010).

O aumento inicial de IL-4 e IL-13 nos animais doentes é consistente com o nível aumentado de imunoglobulina E (IgE) antígeno específico no soro e no fluido do LBA (Schmallenbach et al., 1998). A IL-13 tem outros efeitos patofisiológicos na ORVA que são independentes da resposta IgE, como uma resposta inflamatória por células mononucleares, metaplasia de células produtoras de muco, fibrose das vias aéreas, produção de eotaxina, obstrução das vias aéreas, hiperresponsividade não específica e a sua expressão crônica leva a uma maior acumulação de colágeno nas vias aéreas (Wills-Karp et al., 1998, Zhu et al., 1999), o que faz-se acreditar que esta citocina é responsável pela cronicidade do quadro inflamatório.

Da mesma maneira, a IL-4 também apresenta respostas diferenciadas, uma vez que receptores funcionais de IL-4 estão presentes em neutrófilos e a sua ativação leva a rearranjos no citoesqueleto celular, a síntese pela via “*de novo*” de proteínas e a inibição da apoptose dos neutrófilos (Girard et al., 1997). A IL-4 também estimula a resposta apoptótica dos neutrófilos (Bober et al., 1995), aumenta a sua atividade

bactericida, induz a liberação de lisozima e aumenta o *burst* respiratório (Boey et al., 1989).

Todo o panorama de fagocitose, recrutamento de células e secreção de mediadores químicos inflamatórios, contribui para o agravamento do quadro clínico da doença.

2.3 TRATAMENTO

Não há cura conhecida para a ORVA. Portanto, os cavalos suscetíveis que apresentam a doença de maneira recorrente, devem ser submetidos a um controle ambiental para a redução da exposição aos antígenos, o que requer uma diminuição na concentração de poeira e partículas principalmente próximas ao cavalo (Woods et al., 1993).

As medidas de manejo incluem manter o cavalo a pasto, remover a alfafa da dieta e utilizar rações peletizadas (Couetil et al., 2005). Se não existe a possibilidade de fornecer capim fresco ao animal, pode-se molhar o feno de gramínea (Dixon et al., 1995).

Caso não seja possível manter o animal a pasto, um cuidado a se tomar com os cavalos em ambientes com pouca ventilação é em relação aos outros animais dos estábulos. Se animais saudáveis continuarem com um manejo contendo altas cargas de poeira, as partículas chegarão até o ambiente do cavalo com ORVA (Jackson et al., 2000).

Quando uma completa mudança no manejo e no ambiente não é possível, associa-se um tratamento com broncodilatadores e corticoesteróides.

2.3.1 Corticoesteróides

Os corticoesteróides são utilizados como potentes agentes anti-inflamatórios. Porém, a controvérsia permanece em seus possíveis efeitos diferenciados sobre Th1 e Th2. Em estudo de Braun et al (1997), a dexametasona mostrou uma inibição equivalente para Th1 e para Th2, diminuindo ou cessando a expressão das citocinas

IL-4, IL-5, IL-13 e IFN- γ . Em outros estudos, os corticoesteróides promoveram uma resposta Th2 pela inibição da produção de IL-12, IFN- γ e TNF- α , e pela estimulação da IL-4, IL-13 e IL-10 (Ramirez et al., 1996). Através deste mecanismo, os corticoesteróides podem causar uma supressão seletiva da resposta Th1 e um deslocamento para a imunidade humoral mediada por Th2, no lugar de uma imunossupressão generalizada (Elenkov, 2004). Embora ainda não exista uma convenção sobre qual resposta é inibida pela administração dos corticoesteróides, fica claro que o seu mecanismo de supressão da resposta inflamatória ocorre pela modulação da produção de citocinas por linfócitos T (Brinkmann et al., 1995).

Para Rush et al. (1998), o tratamento da ORVA com dexametasona só se mostrou efetivo quando acompanhado de uma mudança no ambiente e no manejo do animal. Já outro estudo mais recente demonstrou a melhora dos animais quando tratados com 0,1mg/kg de dexametasona intravenosa (IV), que tiveram uma melhora na função pulmonar em três dias, e em sete dias a mesma estava equiparada com a de animais soltos a pasto. O tratamento também resultou em queda na contagem de neutrófilos no fluido do LBA (Robinson et al., 2002).

A dexametasona, quando administrada por via oral, mostrou boa biodisponibilidade, especialmente em cavalos em jejum, e demonstrou maior eficácia do que a prednisolona oral em cavalos com ORVA durante a exposição contínua a antígenos. Embora o início da ação seja mais lenta quando a dexametasona é administrada oralmente em comparação com a via intravenosa, a duração da ação é mais prolongada (Cornelisse et al., 2004).

Em relação ao muco nas vias aéreas, a administração de dexametasona diminuiu a expressão do gene da mucina epitelial, MUC5AC, em células epiteliais brônquicas humanas (Chen et al., 2006).

O uso dos corticoesteróides tem sido o tratamento mais efetivo para o controle dos sintomas clínicos da doença (Leclerc et al., 2011), mas sua administração crônica provoca inúmeros efeitos colaterais, incluindo disfunção e supressão adrenocortical, laminite, hepatopatia, perda de massa muscular, alteração no metabolismo ósseo e aumento da suscetibilidade à infecção (Dauvillier et al., 2011), o que torna sua indicação pertinente apenas na remoção das crises, não como tratamento de

manutenção. Assim, novos protocolos terapêuticos devem ser estudados, buscando uma melhora nos sinais clínicos sem prejudicar outros sistemas do animal.

2.3.2 Terapia Celular e as Células Mononucleares Derivadas de Medula Óssea

Vários estudos vêm sendo conduzidos para analisar a influência da terapia celular nas doenças respiratórias em humanos, ratos e camundongos. Contudo, apesar dos efeitos benéficos e promissores demonstrados, ainda não se tem estudo no processo inflamatório pulmonar dos equinos. O uso de células-tronco na medicina veterinária vem crescendo rapidamente em todo o mundo, mas apenas para o tratamento de distúrbios musculoesqueléticos e de cartilagens (Schnabel et al., 2013).

O uso da terapia celular pode modular a resposta inflamatória por meio de vários caminhos. As citocinas pró-inflamatórias do quadro podem levar as células-tronco a aumentar a secreção de prostaglandinas, que levam à transição de M1 para M2, secretando maior quantidade de citocinas anti-inflamatórias. As células-tronco também diminuem a sinalização celular da inflamação, pela diminuição na secreção de TNF- α pelos macrófagos (Gupta et al., 2007) e outros mediadores que se ligam aos efetores (Choi et al., 2011).

Quando se trata da modulação da resposta inflamatória por meio da interferência na secreção de citocinas, fala-se no efeito parácrino da terapia celular. A capacidade de secretar vários fatores parácrinos é o mecanismo que pode justificar o uso terapêutico das células mesenquimais (Li et al., 2012), expressando citocinas e fatores de crescimento sem estar presente no local do dano (Abreu et al., 2011; Cruz et al., 2012).

O uso da terapia celular em modelos de doenças cardíacas em ratos aponta que a neovascularização proporcionada está diretamente relacionada com a ação parácrina das células-tronco, com liberação de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento que levam à regeneração vascular eficiente e também atenua o circuito apoptótico. Essas ações parácrinas colaboram para um remodelamento reduzido e recuperação do desempenho cardíaco (Tang et al., 2005; Caplan e Dennis, 2006). Já em estudos em pulmão, também em ratos, o tratamento com terapia celular impediu o aumento da

expressão de citocinas inflamatórias e aumentou os níveis circulantes de fatores de crescimento que podem mobilizar as células-tronco endógenas de medula óssea (Rojas et al., 2005).

Os fatores parácrinos podem influenciar as células adjacentes e exercem as suas ações através de vários mecanismos. É provável que os mediadores parácrinos sejam expressos ou liberados de uma forma temporal e espacial exercendo efeitos diferentes dependendo do microambiente após a lesão. Além disso, esses fatores podem ter ações autócrinas sobre a biologia das próprias células-tronco, estendendo o conceito tradicional de nicho de células-tronco para incluir a influência de fatores liberados de células-tronco no microambiente modulando biologia de células-tronco e resposta do tecido, influenciando a sobrevivência celular, a auto renovação e o crescimento (Deb et al., 2008). As células-tronco também podem produzir e liberar moléculas de sinalização que limitam a inflamação local, com a expressão de genes normalmente associados com um aumento de reparação do DNA, enzimas antioxidantes, e genes ligados com sistemas desintoxicantes (Ramalho-Santos et al., 2002). O transplante de células-tronco para aproveitamento dos seus efeitos parácrinos ainda representa uma estratégia em estudo, porque os fatores benéficos permanecem parcialmente identificados e porque vários fatores podem estar funcionando de forma sinérgica (Gnecchi et al., 2008).

Células da medula óssea, além de modular a resposta inflamatória, também são importantes para o reparo das lesões teciduais induzidas por mediadores inflamatórios, migrando ao tecido lesado devido à sinalização e podendo se diferenciar em células epiteliais e endoteliais (Yamada et al., 2004).

Até 2010, mais de 100 estudos já haviam sido registrados com o uso da terapia celular, alguns já em fase II e III, nenhum com efeitos adversos. A transformação maligna é um risco potencial em terapias celulares, mas em relação ao uso de células mononucleares o risco está próximo de zero, já que utiliza células de tecidos adultos e as mesmas não passam por cultura (Prockop et al., 2010).

O termo células mononucleares derivadas de medula óssea (CMDMO) é usado para denominar coletivamente todas as células presentes na medula óssea que contém um núcleo e não apresentam grânulos no citoplasma. Essa característica leva as

CMDMO a terem tamanho e densidade semelhantes, tornando sua separação mais simples.

Dentro da população das CMDMO estão as células progenitoras hematopoiéticas em diferentes estádios de maturação, bem como células linfóides (células plasmáticas e linfócitos), monócitos e macrófagos. Além disso, estão presentes várias células de linhagem não hematopoiética, como as células progenitoras multipotentes adultas, hemangioblastos (células progenitoras que são comuns para a linhagem hematopoiética e vasculogênica), células progenitoras endoteliais (Miyamoto et al., 2007; Cuende et al., 2012) e as células mesenquimais, que apresentam capacidade imunossupressora por um efeito parácrino, ou seja, sem necessitar de contato direto célula-célula, atuando por meio da secreção de fatores solúveis que modulam a resposta imunológica (Araujo et al., 2010; Abreu et al., 2011), e inibem a proliferação de células T e B (Chamberlain et al., 2007).

Em estudo comparativo entre a aplicação de células-tronco mesenquimais e mononucleares em camundongos com modelo de asma aguda, as células mononucleares apresentaram melhores resultados para a diminuição de colapsos alveolares, diminuição da deposição de fibras colágenas e melhoria na mecânica dos pulmões, além das suas vantagens em termos de técnica, tendo menores custos de processamento, menor risco de rejeição e podendo ser injetada no mesmo dia de sua obtenção (Abreu et al., 2013). Esse resultado vantajoso das CMDMO pode ser atribuído à interação entre a fração das células que a compõe e pela expressão de diversos genes relacionados a resposta inflamatória e quimiotaxia (Prota et al., 2010).

Sobre o uso das CMDMO em doenças respiratórias, a terapia com administração intravenosa de células mononucleares em camundongos com enfisema pulmonar levou a uma redução no número de neutrófilos, diminuição no dano do tecido pulmonar e na apoptose celular (Cruz et al., 2012). Mais além, a partir de resultados que precursores celulares circulantes estão diminuídos em doenças pulmonares obstrutivas crônicas em humanos, a administração de CMDMO contribuiu para a diminuição dos danos epiteliais, remodelamento de tecidos e processo inflamatório, por aumento da disponibilidade de células precursoras (Abreu et al., 2011; Cruz et al., 2012).

Em relação aos efeitos das CMDMO sobre os macrófagos alveolares, estudos revelaram que em humanos asmáticos, a presença de macrófagos em cultura de células mononucleares, estimulada com alérgenos aos quais o paciente era reativo, resultou em proliferação das células mononucleares oito vezes maior do que em culturas sem macrófagos (Spiteri et al., 1994), o que condiz com outro estudo que descreve que os macrófagos se comportam como agentes quimiotáticos de células-tronco *in vitro* (Lolmede et al., 2009).

CAPÍTULO 3

3 EM EQUINOS, O NÚMERO DE CÉLULAS MONONUCLEARES É MAIOR NA PRIMEIRA ASPIRAÇÃO MEDULAR EM RELAÇÃO ÀS ASPIRAÇÕES SEGUINTE

(In horses, the number of mononuclear cells is greater in the first aspiration with respect to the following aspirations)

RESUMO

Objetivo: Investigar o número de células mononucleares obtidas após aspirações consecutivas em um mesmo ponto de coleta de medula óssea, além da possibilidade de aspiração de grandes volumes de medula óssea no esterno de animais com idade avançada. **Material e Métodos:** Foram estudados quatro cavalos sem raça definida, free from illness, sedados através da administração de acepromazina, xilazina e cloridrato de petidina, para a coleta de medula óssea a partir do esterno, com agulha Jamshidi 11G, até o volume total de 200 mL de medula óssea por animal. Aliquotas de 500 µL da primeira e da última seringa coletadas em cada ponto foram armazenadas para contagem do número total de células nucleadas. **Resultados:** A coleta de medula ocorreu de forma adequada, sendo possível a obtenção de 200 mL de medula óssea em cada cavalo, com duas a quatro punções por animal. A média para a primeira seringa de cada punção foi de $41,73 \times 10^6$ células vs. $5,88 \times 10^6$ células para a última seringa de cada punção ($p < 0,0001$). **Conclusão:** Foi possível obter grande volume de medula óssea a partir de poucos pontos de coleta, mesmo em animais de idade avançada, mas com redução do número de células em sucessivas aspirações.

Palavras-chave: Terapia celular. Células-tronco. Cavalo.

ABSTRACT

Objective: Investigate the number of mononuclear cells that are obtained after consecutive aspirations at the same point of bone marrow collection and the possibility

of aspiration of large volumes of bone marrow from the sternum in animals with advanced age. **Material and Methods:** Four mongrel horses were studied, sedated by the administration of acepromazine, xylazine and hydrochloride of pethidine for the bone marrow collection from the sternum with a Jamshidi needle 11G, to a total volume of 200 mL of bone marrow per animal. Aliquots of 500 μ L from the first and last syringe collected in each point were stored for counting to the total number of nucleated cells. **Results:** The bone marrow was collected appropriately and it was possible to obtain 200 mL of bone marrow in each horse, with two to four punctures per animal. The mean for the first syringe was 41.73×10^6 cells vs. 5.88×10^6 cells for the last syringe ($p < 0.0001$). **Conclusion:** It was possible to obtain a large amount of bone marrow from a few collection points, even in older animals, but with reduced numbers of cells in the final volume of the aspirated.

Keywords: Cell therapy. Stem cells. Horse.

3.1 INTRODUÇÃO

Apesar do crescimento do uso da terapia celular em equinos, sendo esta difundida em afecções musculoesqueléticas como tendinite, osteoartrite e recentemente, na laminite (Schnabel et al., 2013), alguns aspectos da coleta de medula óssea em cavalos continuam pouco estudados, como os pontos ideais de coleta, volume e número de células obtidas e os riscos nos quais implicam o procedimento (Durando et al., 2006; Adams et al., 2013).

Para a obtenção de um grande número de células derivadas da medula óssea, é necessário coletar um grande volume de medula óssea, ou um pequeno volume que seja destinado à expansão celular (Kasashima et al., 2011; Godwin et al. 2012). Embora não seja completamente estabelecida uma dose adequada para cada terapia celular, os pesquisadores calculam e ponderam os valores baseados na doença em questão e na espécie envolvida. Souza et al. (2005) utilizaram ratos Wistar e os mesmos receberam 3×10^6 células mononucleares derivadas de medula óssea para o tratamento de infarto do miocárdio, diretamente no local da lesão. Murphy et al. (2011)

estudaram a injeção intramuscular de $1.7 \pm 0.7 \times 10^9$ células mononucleares autólogas derivadas de medula óssea em membros com isquemia em humanos. Abreu et al. (2013) utilizaram instilação intratecal de 2×10^6 células mononucleares derivadas de medula óssea em camundongos com asma experimental.

Essa implicação gera algumas questões sobre a quantidade de medula óssea que pode ser aspirada por punção para atingir o número de células desejado tanto para cultivo e expansão, quanto para a aplicação direta de células mononucleares.

Em humanos, são feitas diversas punções de no máximo 5 mL até se obter o volume final desejado, devido ao já conhecido fato da redução no número de células após várias coletas num mesmo ponto (Riul e Aguillar, 1997; Castro Jr et al., 2001). Em cavalos, várias punções podem não ser bem aceitas pelos proprietários, e quando é preciso um grande volume de medula óssea, parece preferível que se obtenha o mesmo por meio do menor número de punções possível.

Nosso grupo vem estudando o efeito de células mononucleares derivadas de medula óssea em cavalos com Obstrução Recorrente das Vias Aéreas, sendo necessário um mínimo de 500 milhões de células que são obtidos habitualmente a partir de 200 mL de medula óssea do esterno. Até o momento, não existem estudos sobre o número de células obtidos em um volume elevado, assim como se é viável obter 200 mL de medula óssea a partir de um número mínimo de punções.

Assim, o presente estudo busca investigar a possibilidade de extração de um grande volume de medula óssea do esterno bem como comparar o número de células mononucleares que são obtidas nas primeiras e últimas aspirações em cada ponto puncionado para a coleta de medula óssea.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Animais

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, sob o número 788.

Foram estudados quatro cavalos sem raça definida, pesando entre 440kg e 520kg e com idade entre 18 e 24 anos, em bom estado de saúde atestado por meio de exame clínico e análise hematológica. Três meses antes do experimento os animais foram desverminados e vacinados contra tétano, influenza equina, raiva e encefalomielite.

3.2.2 Coleta de Medula Óssea e Contagem de Células Mononucleares

Os cavalos foram mantidos em jejum por no mínimo seis horas antes do procedimento, para sedação com acepromazina 1% intravenosa (IV) (Acepran, 0.035 mg/kg, Vetnil, São Paulo, Brasil). O local de coleta entre a quarta e a sexta esternébras foi tricotomizado, seguido por anestesia subcutânea local com 8 mL de cloridrato de lidocaína a 2% (Bravet, Rio de Janeiro, Brasil) e antissepsia com iodo povidona degermante e álcool. Após, a sedação foi complementada com xilazina 10% IV (Sedomin, 0.5 mg/kg, König, São Paulo, Brasil) e cloridrato de petidina 5% IV (Dolosal, Cristália, São Paulo, Brasil).

Para a punção, utilizou-se agulha Jamshidi 11G (Angiotech, Gainesville, Florida, Estados Unidos) e seringas de 20 mL previamente preenchidas com 7 mL de meio Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos) e 0,35 mL de heparina sódica 5000 UI/mL (Hemofol, Cristália, São Paulo, Brasil), sendo coletadas 30 seringas em cada animal, totalizando 200 mL de medula óssea (aproximadamente 7 mL por seringa) (Fig. 1).



Figura 1-A) Coleta de medula óssea a partir do esterno de equinos, com agulha Jamshidi 11G e seringa de 20 mL. B) Seringas de 20 mL previamente preenchidas com meio IMDM e heparina sódica, e seringas já com aproximadamente 7 mL de medula óssea coletada.

Cada seringa foi numerada de forma crescente em cada ponto de coleta para possibilitar a comparação da primeira e da última seringa de cada ponto puncionado e avaliar a quantidade de células nas amostras. Com esta finalidade, foram reservadas alíquotas de 500 μ L da primeira e da última seringa coletadas em cada ponto e a contagem do número total de células nucleadas foi realizada utilizando o contador Cell-Dyn 1300 (Abbott Laboratories, Estados Unidos).

3.2.3 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada por meio do teste de Wilcoxon, usando o software GraphPad Prism versão 3.0 para Windows (San Diego, Califórnia, Estados Unidos). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

3.3 RESULTADOS

O procedimento de coleta de medula óssea ocorreu sem complicações nos quatro cavalos. Foi possível coletar o volume estimado para todos os animais e fazer

mais de uma punção em cada. Dentre os animais utilizados no experimento, dois tiveram dois pontos do esterno puncionados, um teve três pontos e o outro teve quatro, totalizando 11 punções. Nos dias seguintes ao procedimento os animais foram monitorados, e não demonstraram alterações no comportamento.

Depois de obter as contagens por mililitro de medula coletada (Tabela 1), a média para a primeira seringa da punção foi de $41,73 \times 10^6$ células e para a última seringa da mesma punção foi de $5,88 \times 10^6$ células, mostrando uma diferença significativa ($p < 0,0001$).

Tabela 1 – Valores em milhões de células mononucleares por mililitro de medula óssea coletada do esterno de equinos, na primeira e última seringa de cada punção.

	Ponto de Coleta	Primeira aspiração	Última aspiração
Cavalo 1	1º	76,5	9,2
	2º	71,3	6,7
Cavalo 2	1º	36,2	6,4
	2º	50,6	6,8
	3º	22,8	7,0
Cavalo 3	1º	26,4	5,8
	2º	31,6	3,7
	3º	22,2	3,7
	4º	54,8	4,7
Cavalo 4	1º	29,8	6,4
	2º	36,8	4,3
Médias	2,75	41,73	5,88

3.4 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A coleta de medula óssea em cavalos com idade avançada representa um nicho importante, já que estes animais comumente apresentam doenças crônicas e vêm de tratamentos repetidos, muitas vezes tolerantes ou refratários, portanto, são potenciais pacientes para a terapia celular.

O esterno foi escolhido como local de coleta de medula óssea nesse trabalho por ser a fonte mais adequada em animais de meia idade. Isso se deve ao fato de que neste local a atividade hematopoiética persiste durante toda a vida do animal (Alves et

al. 2009), enquanto que na crista ilíaca a coleta pode estar dificultada ou em menor volume, e o rendimento de células obtidas é menor (Delling et al., 2012). Embora o esterno seja uma boa fonte de coleta, existe um grande risco, pelo coração estar logo acima das esternébras indicadas à coleta, podendo ser perfurado durante o processo (Durando et al., 2006), assim o fato de se poder conseguir obter o volume de 200 mL com poucas punções parece vantajoso, especialmente para quem deseja a obtenção de células mononucleares para tratamento direto logo após a coleta.

A aspiração de medula óssea em equinos é comumente praticada em pequenos volumes, variando entre 5 mL a 30 mL (Kasashima et al., 2011; Adams et al. 2013), exceto no trabalho feito por Toupadakis et al. (2010) no qual extraíram 120 mL de medula óssea do esterno dos cavalos. Os volumes aspirados são pequenos porque normalmente são destinados ao cultivo e expansão de células-tronco mesenquimais utilizadas para o tratamento de afecções do sistema musculoesquelético de equinos, necessitando de um baixo número de células, entre 10 e 20 milhões (Godwin et al., 2012; Schnabel et al., 2013). Contudo, para a obtenção de um volume maior de células mononucleares, pode ser necessário um volume maior de medula óssea. Desta forma, no presente estudo foram coletados 200 mL de medula óssea de cada animal. Neste caso, precisou-se estabelecer as diferenças entre o número de células mononucleares obtidas na primeira e na última aspiração, já que em outros trabalhos em humanos e em equinos jovens foi demonstrado que essa diferença é importante (Muschler et al., 1997; Adams et al. 2013).

Em humanos, o volume de medula óssea coletada é estabelecido de acordo com as condições físicas do doador e aproximadamente 10 a 15 mL/kg de peso do paciente podem ser coletados, resultando em um total que pode passar de um litro de medula óssea. Este volume é obtido em diversas aspirações que variam entre 3 mL e 5 mL por local puncionado, o que proporciona um número maior de células progenitoras (Riul e Aguillar 1997; Castro Jr et al., 2001).

Os animais empregados no presente estudo fizeram parte de outro trabalho onde se investigou os efeitos das células mononucleares derivadas da medula óssea na obstrução recorrente das vias aéreas. Assim, foi interessante constatar que a coleta de 200 mL de medula óssea foi possível a partir do esterno desses animais, sem que

houvesse prejuízo à saúde dos mesmos, possibilitando a obtenção do número de células desejado de no mínimo 500 milhões para o tratamento (dados não demonstrados).

Os nossos resultados mostram que o número de células mononucleares obtido na primeira aspiração da medula óssea é significativamente mais elevado do que na aspiração final. Outros estudos demonstram que os primeiros 5 mL aspirados de cada ponto geram uma contagem significativamente maior de células nucleadas por mililitro (Adams et al. 2013) e um maior número de unidades formadoras de colônias quando em cultivo (Kasashima et al., 2011). Em um estudo recente, Kasashima et al. (2011) recomenda múltiplas punções da mesma esternébra com a aspiração de pequenas quantidades.

Esta diferença no número de células de acordo com o volume de aspiração pode ser explicada pela diluição progressiva da medula óssea com o sangue periférico, dependendo das características locais de vasos e fluxo sanguíneo (Muschler et al., 1997). Além disso, alguns autores também alertam sobre as diferenças individuais entre os animais (Carter-Arnold et al., 2013).

Da mesma maneira que encontrado em humanos, a aspiração de volumes iniciais proporcionou um maior número de células mononucleares. Porém, um grande volume aspirado em poucas punções pode significar um ganho importante para o paciente, já que este fica sob efeito anestésico durante um tempo mais curto e sofre menos perfurações, diminuindo a exposição ao risco durante e após o procedimento.

Sendo assim, concluímos que é possível obter grande volume de medula óssea a partir de poucos pontos de coleta, mesmo em animais de idade avançada, mas com redução do número de células em sucessivas aspirações.

CAPÍTULO 4

4 RESPOSTA CELULAR DO TRATAMENTO COM INSTILAÇÃO TRAQUEAL DE CÉLULAS MONONUCLEARES AUTÓLOGAS DERIVADAS DA MEDULA ÓSSEA OU COM DEXAMETASONA ORAL EM EQUINOS COM OBSTRUÇÃO RECORRENTE DAS VIAS AÉREAS (*Cellular Response of Treatments With Tracheal Instillation of Autologous Bone Marrow-Derived Mononuclear Cells or Oral Dexamethasone in Horses with Recurrent Airway Obstruction*)

RESUMO

Introdução: A Obstrução Recorrente das Vias aéreas (ORVA) é uma doença inflamatória e obstrutiva, comum em cavalos adultos estabulados. A ORVA não tem cura e o tratamento com corticoesteróides possui efeitos colaterais, o que leva à busca por novas terapias. **Objetivo:** Avaliar a segurança e a resposta a nível celular das células mononucleares derivadas de medula óssea (CMDMO) como tratamento de cavalos com ORVA crônica, comparando-a com a terapia convencional de dexametasona. **Material e Métodos:** Foram estudados oito cavalos, divididos aleatoriamente em grupo tratado com terapia convencional de dexametasona oral (Gdex) e outro tratado com instilação traqueal de CMDMO (Gcel). Os animais foram avaliados antes do início do tratamento (0 dia), aos sete e 21 dias de tratamento. Após sedação com detomidina e cloridato de petidina, coletou-se o fluido do lavado broncoalveolar (LBA) com instilação de 500 mL de solução salina estéril a 37°C. A partir do fluido do LBA foi feita a análise de volume recuperado, número total de células nucleadas, contagem diferencial, atividade dos macrófagos alveolares (adesão pelo método de Rosen e Gordon (1987) e fagocitose pelo método de Dyrndaet al. (1998)), mensuração de interleucina 1 β e fator de necrose tumoral α pelo método de ELISA, e apoptose celular por citometria de fluxo. **Resultados:** Em ambos os tratamentos, a percentagem de neutrófilos reduziu significativamente na avaliação dos 7 dias (Gdex $p<0,0001$ – Gcel $p=0,004$) e 21dias (Gdex $p<0,0001$ – Gcel $p=0,023$) em comparação com a avaliação inicial. Essa diminuição foi acompanhada pelo aumento significativo no

número de macrófagos alveolares, igualmente aos 7 dias (Gdex $p < 0,0001$ – Gcel $p = 0,0012$) e 21 dias (Gdex $p = 0,0006$ – Gcel $p = 0,0026$). A adesão e a fagocitose do macrófago alveolar apresentaram aumento significativo apenas no grupo Gdex ($p < 0,05$). Já a secreção de interleucina 1β foi menor no grupo Gcel quando comparado ao grupo Gdex aos 7 dias ($p = 0,0077$) e 21 dias de tratamento ($p = 0,002$). A apoptose celular diminuiu significativamente em ambos os grupos aos 21 dias (Gdex $p = 0,0039$ – Gcel $p = 0,0285$). **Conclusão:** o tratamento com CMDMO se mostrou seguro, foi equivalente à terapia com dexametasona na melhora do perfil de células do fluido do LBA e mostrou-se superior na diminuição da secreção de IL- 1β e na regulação da atividade do macrófago alveolar.

Palavras-chave: Macrófago Alveolar. Neutrófilo. Fluido do Lavado Broncoalveolar. Terapia Celular.

ABSTRACT

Introduction: Recurrent Airway Obstruction (RAO) is an inflammatory and obstructive disease, common in stabled adult horses. The disease has no cure and the treatment with corticosteroids has side-effects, which leads to search for new therapies.

Objective: to evaluate the safety and the response at the cellular level of bone marrow-derived mononuclear cells (BMDMC) as a treatment of horses with chronic RAO, comparing it with conventional therapy with dexamethasone. **Material and Methods:**

Eight horses were studied, randomly divided into the group treated with conventional therapy of oral dexamethasone (Gdex) or treated with tracheal instillation of BMDMC (Gcel). The horses were evaluated before treatment (0 day), after seven days and after 21 days. After sedation with detomidine and hydrochloride of pethidine, it was collected the bronchoalveolar lavage (BAL) fluid, instilling 500 mL of a sterile saline solution at 37°C . From the BAL fluid was made the recovered volume analysis, total nucleated cell count, differential cell count, activity of alveolar macrophages (adhesion by the method of Rosen and Gordon (1987) and phagocytosis by the method of Dyrzynda et al. (1998), interleukin- 1β and tumor necrosis factor α mensuration by ELISA, and cell apoptosis by

flow cytometry. **Results:** In both treatments, the percentage of neutrophils was significantly reduced after 7 days (Gdex $p < 0,0001$ – Gcel $p = 0,004$) and 21 days (Gdex $p < 0,0001$ – Gcel $p = 0,023$) compared to baseline. This reduction was accompanied by a significant increase in alveolar macrophages also after 7 days (Gdex $p < 0,0001$ – Gcel $p = 0,0012$) and 21 days (Gdex $p = 0,0006$ – Gcel $p = 0,0026$). The adhesion and phagocytosis of alveolar macrophages increased significantly only in Gdex group ($p < 0,05$). The secretion of interleukin 1β was lower in the Gcel group compared to Gdex group at 7 days ($p = 0,0077$) and 21 days of treatment ($p = 0,002$). Cell apoptosis was significantly decreased in both groups in the 21 days evaluation (Gdex $p = 0,0039$ - Gcel $p = 0,0285$). **Conclusion:** the treatment with BMDMC was safe, equivalent to the therapy with dexamethasone in improving BAL cell profile and was superior in reducing IL- 1β secretion and regulating the activity of alveolar macrophage.

Keywords: Alveolar Macrophage. Neutrophil. Bronchoalveolar Lavage Fluid. Cellular Therapy.

4.1 INTRODUÇÃO

A Obstrução Recorrente das Vias Aéreas (ORVA) é uma doença inflamatória e obstrutiva comumente diagnosticada em cavalos adultos estabulados (Robinson et al., 2002; Marinkovic et al., 2007), que leva a um desequilíbrio no panorama ideal de células presentes no pulmão, uma vez que o fluido do lavado broncoalveolar (LBA) de cavalos sadios possui predominantemente macrófagos alveolares, representando em torno de 60% das células presentes (McKane et al., 1993; Fernandes et al., 2000), e em cavalos com ORVA, o número de neutrófilos pode chegar a 50-70% (Leclerc et al., 2011).

O macrófago alveolar é a célula residente do sistema imunológico nas vias aéreas, sendo o principal responsável pela resposta imunológica inata para eliminação de partículas que atingem as vias aéreas (Peters-Golden, 2004; Geiser, 2010). Em animais com ORVA, a contínua fagocitose de alérgenos exercida pelos macrófagos os

estimula a secretarem inúmeros mediadores inflamatórios que caracterizam o quadro, como a interleucina (IL)-8, que atrai os neutrófilos ao alvéolo (Franchini et al., 1998).

Alguns estudos demonstram que a apoptose espontânea é tardia nos cavalos com ORVA, e a alteração no perfil de células pode levar a necrose de neutrófilos por falta de macrófagos para fagocitá-los, levando a um aumento de moléculas pró-inflamatórias e injúria ao tecido (Haslett, 1999; Brazil et al., 2005).

A ORVA não tem cura e o tratamento convencional com corticoesteróides, mesmo se mostrando efetivo para o controle dos sintomas clínicos, provoca inúmeros efeitos colaterais (Leclerc et al., 2011).

O estudo da aplicação da terapia celular para o tratamento de doenças respiratórias vem apresentando efeitos benéficos. As células-tronco podem reduzir o nível de citocinas inflamatórias secretadas por macrófagos (Gupta et al., 2007; Xu et al., 2007), modular a resposta imunológica (Abreu et al., 2011), reduzir o número de neutrófilos (Cruz et al., 2012), entre outras respostas que levam à diminuição no dano do tecido pulmonar.

Dentro da terapia celular, as células mononucleares derivadas de medula óssea (CMDMO) apresentaram bons resultados em doenças respiratórias, além de algumas vantagens em relação as células mesenquimais, diminuindo o remodelamento pulmonar e apresentando uma técnica de obtenção mais simples, com menores custos e menor tempo de processamento (Abreu et al., 2013). Essas informações foram decisivas na escolha das CMDMO para o tratamento pioneiro de equinos com ORVA neste trabalho.

O objetivo desse trabalho foi avaliar a resposta moduladora da inflamação pelas CMDMO, como tratamento de cavalos com ORVA crônica, comparando-a com a terapia convencional de dexametasona. Os parâmetros avaliados foram divididos em avaliação do volume recuperado e composição celular do fluido do LBA, atividade de macrófagos alveolares dos cavalos tratados (adesão, fagocitose), mensuração da secreção de citocinas inflamatórias e da apoptose celular. Levanta-se a hipótese que a terapia celular com CMDMO pode interferir na resposta das células envolvidas no quadro inflamatório, influenciando no perfil celular, secreção de citocinas inflamatórias, adesão e fagocitose dos macrófagos alveolares de equinos com ORVA.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Animais

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) sob o número 788.

Foram utilizados oito animais adultos sem outras enfermidades, de ambos os gêneros, sem raças definidas, com idade média de $17,4 \pm 6,11$ anos, peso médio de $480 \pm 44,7$ kg, vacinados contra herpes vírus, influenza equina, e desverminados.

Três animais pertenciam ao Regimento de Polícia Militar Montada do Paraná e foram mantidos em atividade e estabulados durante todo o estudo. Os demais pertenciam a Fazenda Experimental Gralha Azul e permaneceram a pasto durante os três meses antecedentes ao início do estudo.

Os cavalos apresentavam histórico de doença respiratória crônica e recorrente progressiva, episódios de dispneia sem sintomas de infecção, períodos recorrentes ou persistentes de tosse na cocheira ou durante o trabalho. Os oito animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos. O grupo controle positivo (Gdex), composto por quatro animais, foi tratado com terapia convencional de dexametasona oral. O grupo terapia celular (Gcel), composto pelos outros quatro equinos, foram tratados com a instilação traqueal de células mononucleares autólogas derivadas da medula óssea, que foi coletada anteriormente ao período de indução (Fig. 3).

Para indução do quadro clínico, os animais foram mantidos estabulados, alimentados com ração, aveia e feno duas vezes ao dia, com água *ad libitum*. Esses animais tinham feno sacudido próximo a narina por dois minutos (Racinne et al., 2011) e a cama de serragem revirada (Fig. 2).



Figura 2- Equino durante o período de indução, com a cama de serragem sendo revirada uma vez por dia.

Após o aparecimento dos sintomas clínicos, o diagnóstico de ORVA era confirmado com coleta do fluido do lavado broncoalveolar (LBA), quando os animais apresentavam neutrofilia superior a 25% (Leclerc et al. 2011) e escore clínico sugerido por Tesarowski (Anexo 1) superior a 10 (Tesarowski et al., 1996).

O grupo Gdex foi tratado com dexametasona oral com doses decrescentes: 0,165mg/kg até sete dias, 0,083mg/kg dos sete aos 14 dias e 0,04mg/kg dos 14 aos 21 dias (De Luca et al., 2012).

Os animais do grupo Gcel eram sedados com acepromazina 1% intravenosa (IV) (Acepran, 0.035 mg/kg, Vetnil, São Paulo, Brasil) e xilazina 10% IV (Sedomin, 0.5 mg/kg, König, São Paulo, Brasil), tendo 20 mL de células mononucleares autólogas derivadas de medula óssea, previamente coletadas e isoladas antes da indução ao quadro (Anexo 2), instiladas na região da carina com a ajuda de um fibroscópio Olympus de 170 cm de comprimento e 12 mm de diâmetro, em dose única. O volume continha no mínimo 5×10^8 células descongeladas no dia da instilação (Anexo 3), com viabilidade atestada por meio de citometria de fluxo com o uso dos reagentes Anexin V e 7-aminoactinomicina (7-AAD) (conforme item 4.2.6). Após o procedimento, mantinha-se a cabeça do animal erguida por 10 minutos, a fim de se evitar o retorno das células instiladas.

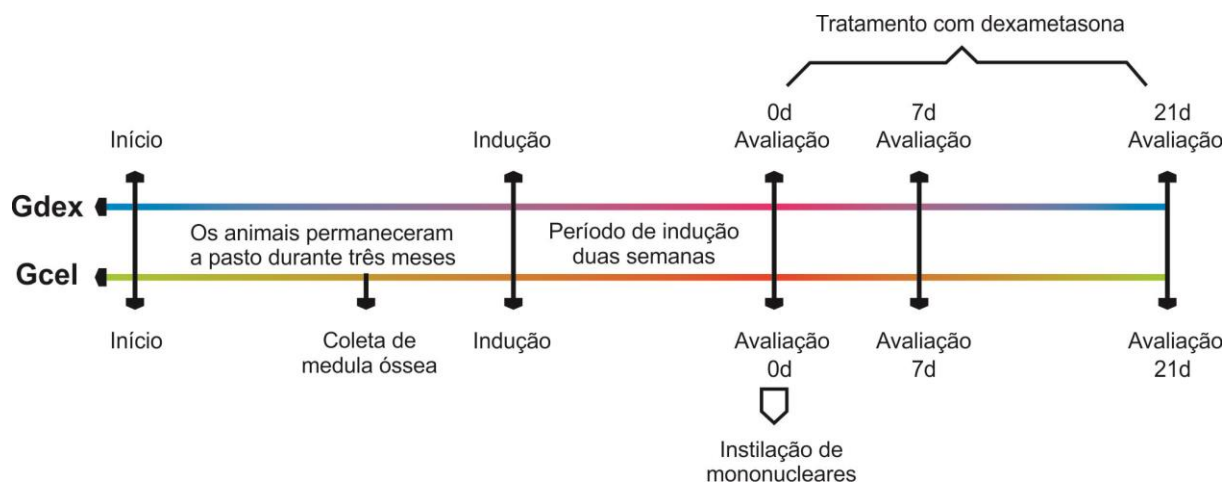


Figura 3- Esquema do delineamento experimental utilizado com os oito animais do estudo, desde o início do experimento, até a última avaliação prevista, aos 21 dias após início do tratamento dos equinos com Obstrução Recorrente das Vias Aéreas.

Após início do tratamento, medidas para controle de alérgenos foram tomadas, como a retirada da aveia da alimentação e o fornecimento de capim fresco, mas mantendo-os estabulados. As reavaliações foram realizadas aos 7 e aos 21 dias (Leclerc et al. 2011, Cruz et al. 2012).

4.2.2 Coleta e Processamento do Fluido do Lavado Broncoalveolar

Os cavalos foram mantidos em jejum por no mínimo 6 horas antecedentes à coleta para realizar a sedação por meio de detomidina intravenosa (IV) (Eqdomin, 0,02mg/kg, Ourofino, São Paulo, Brasil) e cloridato de petidina IV (Dolosal, Cristália, São Paulo, Brasil). A coleta do fluido do LBA foi realizada com uma sonda flexível de silicone marca Cook (V-PBAL-300, Cook Vet Products, Hamburg, Alemanha), de 300 cm de comprimento e 8 mm de diâmetro. Este foi introduzido via nasotraqueal (Fig. 4), até se alojar em um brônquio, quando o cuff na extremidade distal foi inflado com 10mL de ar. Utilizou-se 500 mL de solução salina de cloreto de sódio 0,9% estéril pré-aquecida a 37°C (Hoffman, 2008), infundidos em alíquotas de 125 mL e aspirados após cada alíquota. O material recolhido ficou acondicionado em gelo em tubos para centrifuga estéreis de 50 mL até a chegada ao laboratório, para o processamento em menos de quatro horas após a coleta.



Figura 4- Coleta do fluido do lavado broncoalveolar em equino, utilizando uma sonda flexível de silicone introduzida via nasotraqueal.

No laboratório, o fluido do LBA foi centrifugado a 340 *g* por seis minutos, a 4°C (Michelotto et al, 2010) e o *pellet* obtido foi ressuspendido no próprio sobrenadante do animal. A contagem do número total de células nucleadas foi realizada na câmara de Neubauer, em dois quadrantes opostos, e a viabilidade das células foi verificada por meio de citometria de fluxo com o uso dos reagentes Annexin V e 7-AAD (conforme item 4.2.6). A partir do *pellet* de células, empregou-se 10 µL para a confecção de lâminas, que foram coradas com a técnica de Romanowski (Panótico Rápido, Laborclin, Paraná, Brasil) para contagem diferencial das células em aumento de 1000X. Duas alíquotas de 2 mL do sobrenadante do fluido do LBA foram separadas na fase de centrifugação e congeladas a -20°C para análises futuras.

4.2.3 Isolamento do Macrófago Alveolar

Após a contagem do número total de células obtidas no fluido do LBA, a suspensão celular foi ajustada para a concentração de 5×10^6 células viáveis/mL. Foram plaqueados 100 µL da suspensão ajustada em poços de uma microplaca de 96

poços, em triplicata para cada ensaio a ser realizado. A placa foi incubada por 1 hora a 37° C. Após esse período, o sobrenadante foi descartado, restando apenas os macrófagos aderidos ao plástico. Esta etapa foi comum aos ensaios de atividade de macrófago alveolar (adesão e atividade fagocitária).

4.2.4 Adesão do Macrófago Alveolar

Após o descarte do sobrenadante da placa, os poços foram lavados duas vezes com solução salina fosfatada tamponada (PBS) e as células aderentes foram então fixadas com metanol 50% por 10 minutos em temperatura ambiente.

Após este período, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 100 µL de corante de Giemsa a 0,2% (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos) a cada poço por 40 minutos em temperatura ambiente. Os poços foram novamente lavados duas vezes com PBS e adicionou-se 200 µL de metanol 50%. Após 30 minutos, a solução resultante teve sua absorbância lida em espectrofotômetro com comprimento de onda correspondente a 550 nm (Sunrise, Tecan, Suíça). Esse ensaio foi adaptado da técnica de Rosen e Gordon (1987) (Anexo 4).

O resultado final da adesão foi corrigido pela percentagem de macrófagos alveolares no fluido do LBA (absorbância x %macrófagos), para cada animal e a cada avaliação.

4.2.5 Atividade Fagocitária do Macrófago Alveolar

Após as placas com macrófagos terem seus poços lavados duas vezes com PBS, como no ensaio acima, adicionou-se a cada poço 100 µL de PBS e 20 µL de zymosan (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos) corado com vermelho neutro (6,7 mg/mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos), sendo incubados a 37°C por 30 minutos.

Foi realizada uma triplicata de cada amostra utilizando zymosan não corado com vermelho neutro para se congelar o sobrenadante dos poços após a incubação (Laan et al., 2005), que foi acondicionado em microtubos para centrifuga e congelado a -20°C

para análises de interleucina (IL)-1 β e fator de necrose tumoral (TNF)- α , descritas no item 4.2.6.

Após, o sobrenadante foi descartado e as células foram fixadas com solução de Baker (4% formaldeído, 2% cloreto de sódio, 1% acetato de cálcio, solução aquosa) por 30 minutos a 37°C. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 100 μ L de PBS para então realizar a centrifugação a 400 g, por 5 minutos. Em seguida, após descarte do sobrenadante, o corante vermelho neutro foi solubilizado com 200 μ L de solução de extração (10% ácido acético glacial, 40% etanol em solução aquosa) e incubado por 30 minutos. Após este período a absorbância foi mensurada a 550 nm. Esse ensaio foi adaptado do método descrito por Dyrynda et al. (1998) (Anexo 5).

O resultado final da atividade fagocitária foi corrigido pela percentagem de macrófagos alveolares no fluido do LBA (absorbância x % de macrófagos), para cada animal e a cada avaliação.

4.2.6 Mensuração de Citocinas Inflamatórias

A secreção de TNF- α e IL-1 β pelos macrófagos alveolares foi analisada a partir dos sobrenadantes dos poços do ensaio de fagocitose, utilizando o kit DuoSet ELISA (*Enzyme linked immuno sorbant assay*) (R&D Systems, Minneapolis, Estados Unidos) de acordo com as instruções do fabricante, para ambas as citocinas.

Resumidamente, 100 μ L de cada padrão e de cada amostra, em duplicata, foram pipetados em uma placa de 96 poços já revestida com o anticorpo de captura para a citocina em análise. Após incubação, utilizou-se o anticorpo de detecção e a absorbância final foi lida a 450nm.

4.2.7 Mensuração da Apoptose Celular

O ensaio de apoptose foi realizado por meio de citometria de fluxo, em citômetro FACS Calibur (BD Biosciences, Califórnia, Estados Unidos), utilizando o reagente Annexin V e 7-AAD (BD Biosciences, Califórnia, Estados Unidos), seguindo-se o protocolo sugerido pelo fabricante.

Resumidamente, foram preparados três tubos de citometria: um controle isotópico, um controle autólogo e um com a análise de Annexin V e 7-AAD. Em cada tubo, adicionou-se 1×10^6 células da amostra analisada e 500 μ L de PBS. Centrifugou-se por 5 minutos a 400 *g* e descartou-se o sobrenadante. As células do controle autólogo foram fixadas com paraformaldeído 1% enquanto os tubos do controle isotópico e da análise foram incubados 30 minutos, em temperatura ambiente, sem incidência de luz e procedeu-se nova centrifugação. Os tubos do controle autólogo e da análise foram fixados com paraformaldeído 1% e realizou-se a leitura dos três tubos no citômetro de fluxo.

A apoptose celular foi analisada a partir do fluido do LBA das avaliações do momento inicial (0 dia) e aos 21 dias de tratamento, nos dois grupos.

4.2.8 Análise Estatística

Os dados foram enquadrados como paramétricos e utilizou-se a análise de variância (ANOVA *one-way*) seguida do teste de Tukey de múltipla comparação entre as avaliações e entre os grupos, através do programa *GraphPad Prism* versão 3.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, Estados Unidos). Os valores foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão da média (SD). Valores de $p < 0,05$ foram considerados como significativos.

4.3 RESULTADOS

4.3.1. Animais

Inicialmente estavam previstos no estudo 12 animais. Porém, nas condições do trabalho, dois animais que estavam previstos no estudo não tiveram sinais clínicos compatíveis com ORVA durante o período de indução e foram excluídos do estudo. Outros dois animais, previstos no grupo Gcel, tiveram sua medula óssea coletada, mas não se atingiu o número de células mononucleares previsto para a infusão durante o

processamento e ambos foram retirados do estudo antes da etapa de indução. Portanto, o estudo foi realizado com os oito animais citados na metodologia.

Os protocolos de sedação e de coleta do fluido do lavado broncoalveolar (LBA) permitiram coletas adequadas e rápidas, com o máximo conforto possível ao animal e com a mínima perda de material.

4.3.2. Coleta e processamento do Fluido do Lavado Broncoalveolar

Os dados obtidos por meio da análise do fluido do LBA dos grupos Gdex e Gcel estão expressos na Tabela 2.

Tabela 2- Percentagem de volume recuperado, contagem de células nucleadas e contagem percentual dos diferentes tipos celulares no fluido do lavado broncoalveolar de equinos com Obstrução Recorrente das Vias Aéreas, do grupo tratado com dexametasona (Gdex) e do grupo tratado com instilação traqueal de células mononucleares derivadas de medula óssea (Gcel). Valores expressos como média $\pm$ SD.

	Volume Recup %	CTCN (células/μL)	Neutróf %	Macróf %	Macróf Multi %	Linfóc %	Hemosid %	Basóf %
Gdex 0d	48,1 $\pm$ 8,2	76,5 $\pm$ 30	63 $\pm$ 12,8	24,2 $\pm$ 10,7	2,2 $\pm$ 1,4	10,5 $\pm$ 4,2	0	0
Gdex 7d	60,2 $\pm$ 6,5 ^a	125,7 $\pm$ 62,3	15,7 $\pm$ 6,8 ^b	61,2 $\pm$ 7,4 ^b	5,2 $\pm$ 4,2	17,2 $\pm$ 3,5	0,5 $\pm$ 0,9	0
Gdex 21d	49,3 $\pm$ 11,2	82,16 $\pm$ 18,7	15 $\pm$ 9,9 ^b	60 $\pm$ 20,2 ^e	6,7 $\pm$ 2,8 ^h	17,5 $\pm$ 11	0	0,75 $\pm$ 1,4
Gcel 0d	49,2 $\pm$ 13,4	145,5 $\pm$ 167,2	53,2 $\pm$ 19,8	24,7 $\pm$ 5,3	2 $\pm$ 2	18,5 $\pm$ 15,9	0	0
Gcel 7d	53,6 $\pm$ 14,2	76,7 $\pm$ 23	19 $\pm$ 20 ^c	52,2 $\pm$ 17,4 ^f	4 $\pm$ 2,7	25,5 $\pm$ 16,9	0,25 $\pm$ 0,5	0
Gcel 21d	51,6 $\pm$ 11,5	80,4 $\pm$ 23,2	22 $\pm$ 28,5 ^d	54,7 $\pm$ 21,5 ^g	3,75 $\pm$ 0,9 ⁱ	19,50 $\pm$ 14,3	0	0

Recup = recuperado; CTCN = contagem total de células nucleadas; Neutróf = neutrófilos; Macróf = macrófagos; Macróf Multi = macrófagos multinucleados; Linfóc = linfócitos; Hemosid = hemossiderófagos; Basóf = basófilos. ^ap=0,0054 vs. Gdex 0d; ^bp<0,0001 vs. Gdex 0; ^cp=0,004 vs. Gcel 0d; ^dp=0,023 vs. Gcel 0d; ^ep=0,0006 vs. Gdex 0d; ^fp=0,0012 vs. Gcel 0d; ^gp=0,0026 vs. Gcel 0d; ^hp=0,0011 vs Gdex 0d; ⁱp=0,011 vs. Gdex 21d.

Houve um aumento significativo no volume recuperado de fluido do LBA aos 7 dias de tratamento ($60,2 \pm 6,5\%$ vs. $48,1 \pm 8,2\%$, $p=0,0054$) em relação à avaliação inicial dos animais Gdex, já a contagem total de células nucleadas não teve alterações significativas em nenhum grupo. Tanto volume recuperado, quanto contagem total de células nucleadas não apresentaram diferença significativa entre os grupos.

Observou-se a mudança no perfil de células do fluido do LBA de ambos os grupos (Fig. 5 e 6), com diminuição significativa no número de neutrófilos (Fig. 7) na avaliação de 7 dias (Gdex: $15,7 \pm 6,8\%$ vs. $63 \pm 12,8\%$, $p<0,0001$ – Gcel: $19 \pm 20\%$ vs. $53,2 \pm 19,8\%$, $p=0,004$) e de 21 dias (Gdex: $15 \pm 9,9\%$ vs. $63 \pm 12,8\%$, $p<0,0001$ – Gcel: $22 \pm 28,5\%$ vs. $53,2 \pm 19,8\%$, $p=0,023$) em relação às avaliações iniciais. Não houve diferença entre a contagem de neutrófilos da avaliação dos 7 dias e 21 dias, em ambos os grupos, tampouco houve diferença significativa entre os grupos.

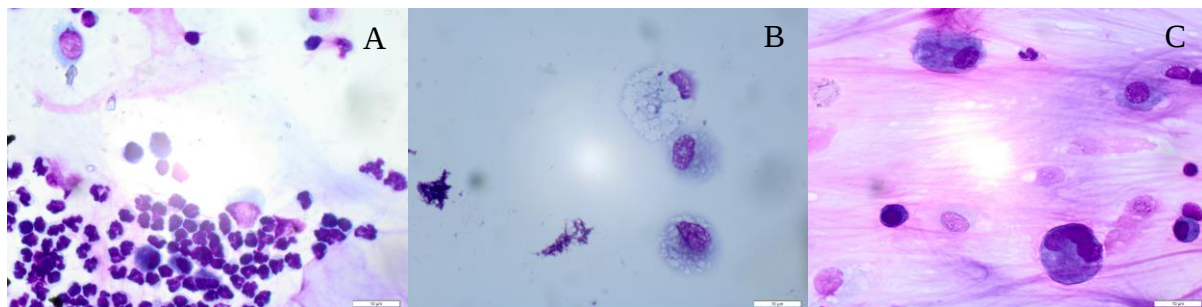


Figura 5- Lâminas confeccionadas a partir do fluido do lavado broncoalveolar de equinos com Obstrução Recorrente das Vias Aéreas, grupo tratado com dexametasona oral. Coloração: Panótico Rápido. Aumento: 1000 x. A) Avaliação inicial e confirmação do quadro clínico. B) Avaliação após sete dias de tratamento com dexametasona oral. C) Avaliação após 21 dias de tratamento com dexametasona oral.

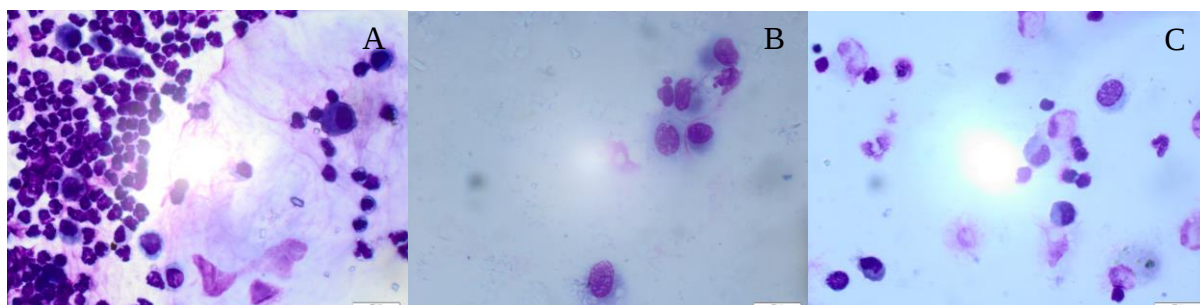


Figura 6- Lâminas confeccionadas a partir do fluido do lavado broncoalveolar de equinos com Obstrução Recorrente das Vias Aéreas, grupo tratado com instilação traqueal de células mononucleares autólogas derivadas de medula óssea. Coloração: Panótico Rápido. Aumento: 1000 x. A) Avaliação inicial e confirmação do quadro clínico. B) Avaliação após sete dias da instilação traqueal de células mononucleares. C) Avaliação após 21 dias da instilação traqueal de células mononucleares.

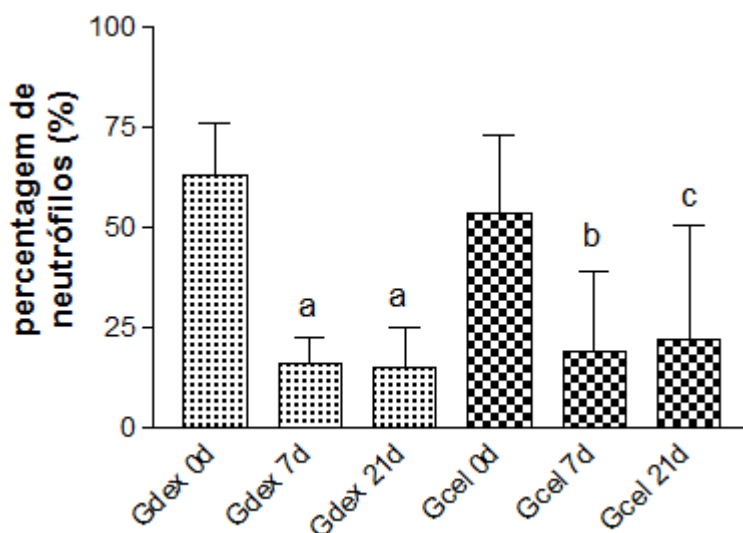


Figura7 –Percentagem de neutrófilos no fluido do lavado broncoalveolar de equinos com Obstrução Recorrente das Vias Aéreas do quadro inicial à avaliação dos 21 dias de tratamento com dexametasona oral (Gdex) e do quadro inicial aos 21 dias após instilação traqueal de células mononucleares autólogas derivadas da medula óssea (CMDMO). ^ap<0,0001 vs. Gdex 0d; ^bp=0,004 vs. Gcel 0d; ^cp=0,023 vs. Gcel 0d.

A diminuição do número de neutrófilos foi acompanhada pelo aumento significativo no número de macrófagos (Fig. 8), igualmente na avaliação dos 7 dias (Gdex: $61,2 \pm 7,4\%$ vs. $24,2 \pm 10,7\%$, $p < 0,0001$ - Gcel: $52,2 \pm 17,4\%$ vs. $24,7 \pm 5,3\%$, $p = 0,0012$) e dos 21 dias (Gdex: $60 \pm 20,2\%$ vs. $24,2 \pm 10,7\%$, $p = 0,0006$ – Gcel: $54,7 \pm 21,5\%$ vs. $24,7 \pm 5,3\%$, $p = 0,0026$) em relação às avaliações iniciais. Não houve diferença entre a contagem de macrófagos da avaliação dos 7 dias e 21 dias, em ambos os grupos, tampouco houve diferença significativa entre os grupos.

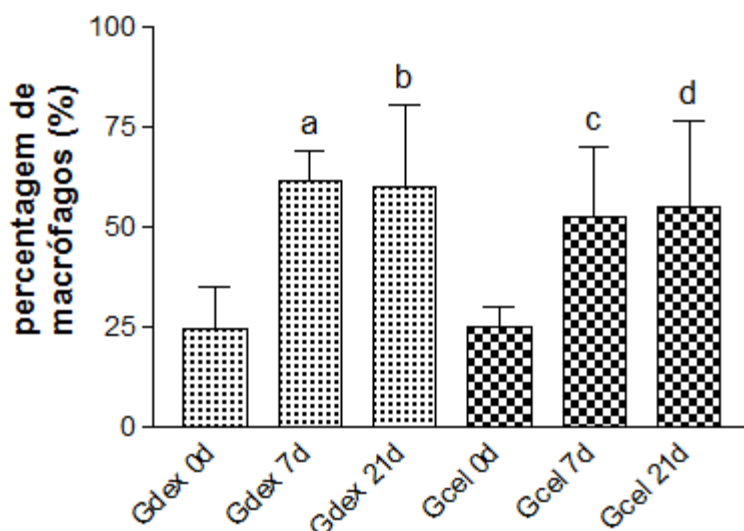


Figura8 –Percentagem de macrófagos no fluido do lavado broncoalveolar de equinos com Obstrução Recorrente das Vias Aéreas do quadro inicial à avaliação dos 21 dias de tratamento com dexametasona oral (Gdex) e do quadro inicial aos 21 dias após instilação traqueal de células mononucleares autólogas derivadas da medula óssea (CMDMO).^a $p < 0,0001$ vs. Gdex 0d; ^b $p = 0,0006$ vs. Gdex 0d; ^c $p = 0,0012$ vs. Gcel 0d; ^d $p = 0,0026$ vs. Gcel 0d.

Em relação aos demais tipos celulares, observou-se um aumento significativo no número de macrófagos multinucleados nos animais Gdex, sendo aos 21 dias de tratamento ($6,7 \pm 2,8\%$ vs. $2,2 \pm 1,4\%$, $p = 0,0011$) quando comparado a avaliação inicial, e a avaliação dos 21 dias foi estatisticamente diferente entre os dois grupos (Gcel $3,75 \pm 0,9\%$ vs. Gdex $6,7 \pm 2,8\%$, $p = 0,011$). O panorama de números de linfócitos não mostrou alteração significativa em nenhum grupo, tampouco houve diferença significativa entre os grupos. No grupo Gdex, apenas um animal apresentou hemossiderófagos, sendo aos 7 dias de tratamento, enquanto somente um deles

apresentou basófilos, sendo aos 21 dias de tratamento. No grupo Gcel, um animal apresentava hemosiderófagos, sendo na avaliação dos 7 dias.

4.3.3 Adesão do Macrófago Alveolar

Nos animais do grupo Gcel, a capacidade de adesão do macrófago alveolar não teve alterações significativas. Entretanto, nos animais do grupo Gdex, observou-se um aumento significativo da adesão na avaliação dos 7 dias ($0,13 \pm 0,02$ vs. $0,04 \pm 0,03$ absorbância 550 nm x percentagem de macrófagos, $p < 0,0001$) e dos 21 dias ($0,14 \pm 0,06$ vs. $0,04 \pm 0,03$ absorbância 550 nm x percentagem de macrófagos, $p = 0,0006$), em relação a avaliação inicial (Fig. 9). Houve uma diferença significativa entre a avaliação inicial dos dois grupos (Gcel $0,08 \pm 0,02$ vs. Gdex $0,04 \pm 0,03$ absorbância 550 nm x percentagem de macrófagos, $p = 0,0082$).

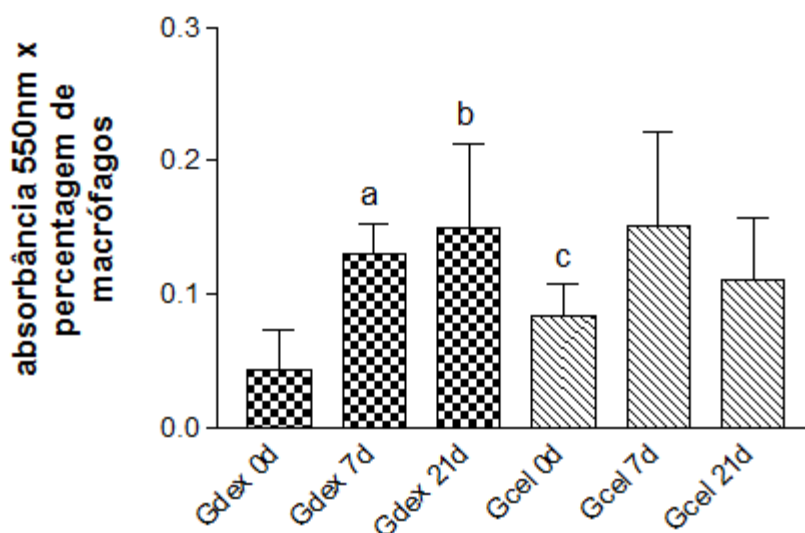


Figura9 – Capacidade de adesão de macrófagos alveolares de equinos com Obstrução Recorrente das Vias Aéreas do quadro inicial à avaliação dos 21 dias de tratamento com dexametasona oral (Gdex) e do quadro inicial aos 21 dias após instilação traqueal de células mononucleares autólogas derivadas da medula óssea (CMDMO).^a $p < 0,0001$ vs. Gdex 0d; ^b $p = 0,0006$ vs. Gdex 0d; ^c $p = 0,0082$ vs. Gdex 0d.

4.3.4 Atividade Fagocitária do Macrófago Alveolar

A atividade fagocitária do macrófago alveolar dos animais do grupo Gdex aumentou durante o tratamento, sendo significativamente maior aos 21 dias em relação ao quadro inicial ($0,30 \pm 0,2$ vs. $0,13 \pm 0,07$ absorbância 550nm x percentagem de macrófagos, $p=0,0386$). A fagocitose dos animais do grupo Gcel não apresentou diferença significativa durante as avaliações (Fig. 10), tampouco houve diferença significativa entre os grupos.

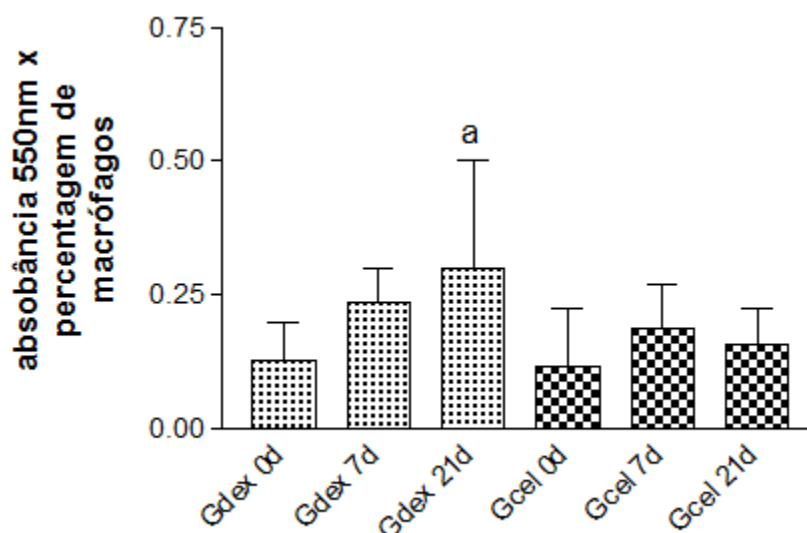


Figura10 – Atividade fagocitária de macrófagos alveolares de equinos com Obstrução Recorrente das Vias Aéreas do quadro inicial à avaliação dos 21 dias de tratamento com dexametasona oral (Gdex) e do quadro inicial aos 21 dias após instilação traqueal de células mononucleares autólogas derivadas da medula óssea (CMDMO).^a $p=0,0386$ vs. Gdex 0d.

4.3.5 Mensuração de citocinas inflamatórias

Em relação à interleucina (IL)- 1β (Fig. 11), não houve diferença estatística entre as avaliações em cada grupo, porém, foi observada uma diferença significativa entre os grupos, nas avaliações de 7 dias (Gdex: $0,97 \pm 0,03$ pg/mL vs. Gcel: $0,82 \pm 0,1$ pg/mL, $p=0,0077$) e 21 dias (Gdex: $0,99 \pm 0,1$ pg/mL vs. Gcel: $0,85 \pm 0,06$ pg/mL, $p=0,002$).

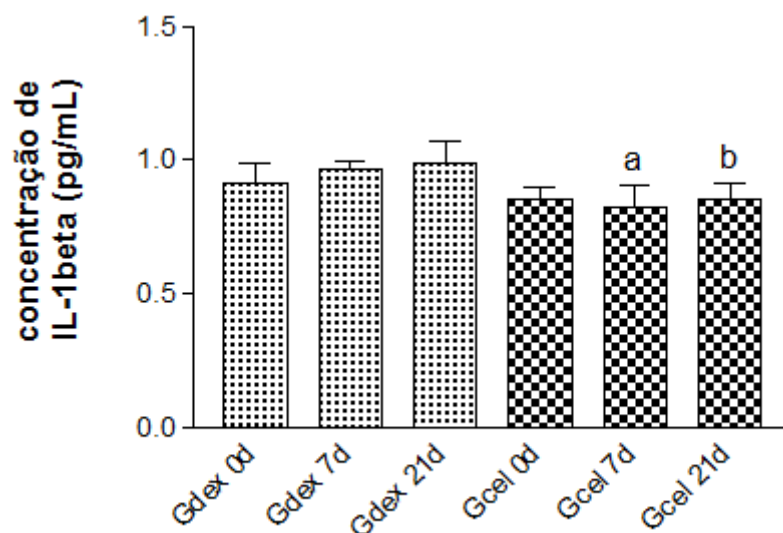


Figura 11-Secreção de interleucina 1 β (pg/mL) por macrófagos alveolares de cavalos com Obstrução Recorrente das Vias Aéreas, tratados com dexametasona oral ou com instilação traqueal de células mononucleares autólogas derivadas de medula óssea. O método utilizado para detecção foi o ELISA (*Enzyme linked immuno sorbant assay*). ^ap=0,0077 vs. Gdex 7d; ^bp=0,002 vs. Gdex 21d.

Já para a análise do fator de necrose tumoral (TNF)- α (Fig. 12), não foi observada diferença estatística entre as avaliações em cada grupo, tampouco entre os grupos.

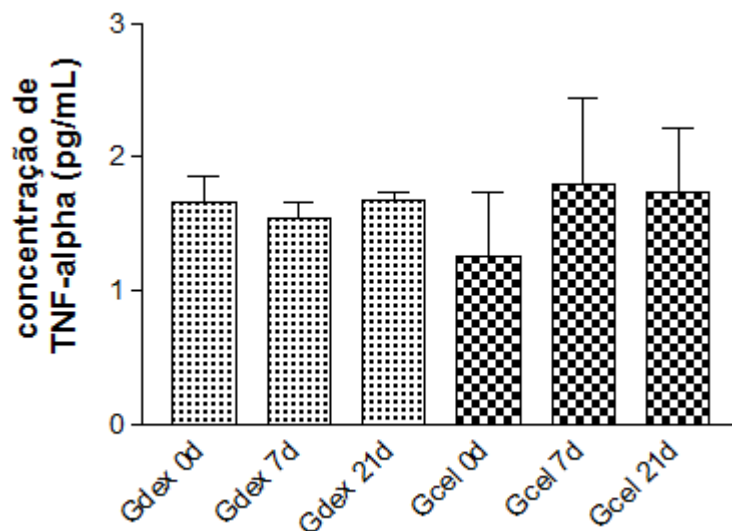


Figura 12- Secreção de fator de necrose tumoral α (pg/mL) por macrófagos alveolares de cavalos com Obstrução Recorrente das Vias Aéreas, tratados com dexametasona oral ou com instilação traqueal de células mononucleares autólogas derivadas de medula óssea. O método utilizado para detecção foi o ELISA (*Enzyme linked immuno sorbant assay*).

4.3.6 Mensuração da Apoptose Celular

A partir do ensaio de anexina, a apoptose celular dos animais do grupo Gdex e do grupo Gcel mostrou uma redução significativa (Fig. 13) aos 21 dias de tratamento em relação a avaliação inicial (Gdex: $1,2 \pm 1,4\%$ vs. $11,3 \pm 7,9\%$, $p=0,0039$ - Gcel: $1,8 \pm 0,7\%$ vs. $7,1 \pm 6\%$, $p=0,0285$). Não houve diferença significativa entre os grupos.

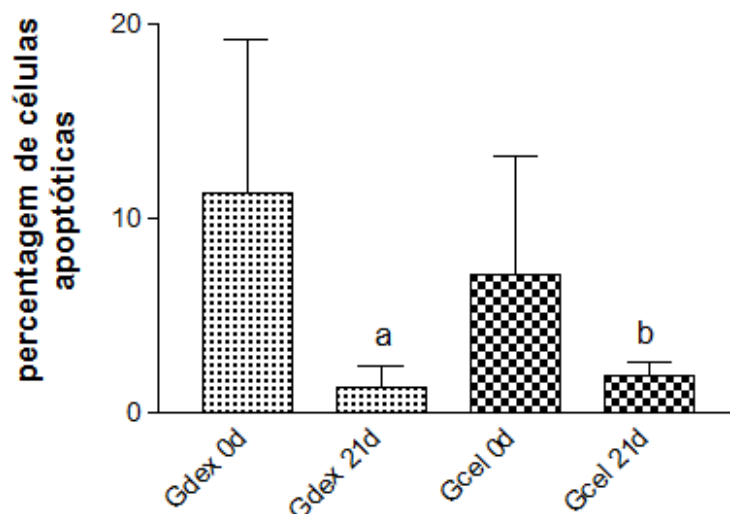


Figura 13-Apoptose das células de cavalos com Obstrução Recorrente das Vias Aéreas, tratados com dexametasona oral ou com instilação traqueal de células mononucleares autólogas derivadas de medula óssea. O resultado foi obtido por meio de citometria de fluxo das células do fluido do lavado broncoalveolar com o reagente Annexin V. ^ap=0,0039 vs. Gdex 0d, ^bp=0,0285 vs. Gcel 0d.

4.4 DISCUSSÃO

A Obstrução Recorrente das Vias Aéreas (ORVA) é bastante estudada na Medicina Veterinária, mas ainda não existem relatos do uso da terapia celular como tratamento. Sendo assim, esse trabalho buscou respostas a nível celular sobre a eficácia dessa nova opção de tratamento, visando entender o mecanismo de atuação das células mononucleares derivadas de medula óssea (CMDMO) sobre o macrófago alveolar, a célula mais prevalente no pulmão de cavalos saudáveis (Michelotto Jr et al., 2010), e considerado o orquestrador da resposta inflamatória pulmonar (Geiser, 2010). Considerou-se como controle a terapia convencional de dexametasona por ser um protocolo de rotina clínica e para que todos os animais selecionados para o estudo recebessem algum tipo de tratamento.

A análise do fluido do lavado broncoalveolar (LBA) é de grande importância para o diagnóstico e entendimento de doenças que afetam o sistema respiratório (Lavoie et al., 2001). O presente trabalho resultou em volumes recuperados de fluido do LBA

esperados, entre 40-60% do volume infundido em equinos (Hewson e Viel, 2002). Ainda assim, diferenças importantes de volume recuperado foram observadas (Porto et al., 2010), possivelmente por questões individuais como obstruções, edemas ou broncoespasmos durante a coleta (Hewson e Viel, 2002).

Esperava-se um aumento no volume recuperado de fluido do LBA no decorrer dos tratamentos, acompanhando a redução do processo inflamatório e do acúmulo de muco. Isto não ocorreu de forma constante, possivelmente porque os animais avaliados apresentavam idade avançada e histórico de vários anos de recorrência da doença, o que conduz a um remodelamento importante das vias aéreas, redução de lume, fibrose peribronquial, destruição de bronquíolos e alvéolos, e efisema pulmonar (Herszberg et al., 2006; Leclerc et al., 2011).

O protocolo com instilação de 500 mL de solução salina para a coleta do fluido do LBA (Leclerc et al., 2001; Desjardins et al., 2004; Lavoie-Lamoureux et al., 2012) é importante porque o volume de fluido infundido pode ter um impacto na contagem total e diferencial das células recuperadas, sendo que quanto maior o volume infundido menor a concentração de células (Sweeney et al., 1997). Como o volume infundido na coleta do fluido do LBA não modificou entre os grupos e avaliações, assume-se que todas as alterações observadas na contagem de células nucleadas expressam uma mudança no quadro da doença, não recebendo interferência do volume infundido da solução.

Ainda que não se tenha observado uma mudança significativa na contagem total de células nucleadas, o estudo corroborou com McGorum e Dixon (1994) que encontraram uma alta variabilidade de recuperação das células no pulmão equino. O presente estudo não apresentou média de contagem de células nucleadas abaixo de 76 células/ μ L, o que corrobora com estudos que afirmam que cavalos com ORVA apresentam um aumento na contagem total de células no fluido do LBA (Lessa et al., 2007), levando em consideração que a média para cavalos jovens e saudáveis fica em torno de 40 células/ μ L (Michelotto et al., 2011). Os animais com quadro clínico condizente com o diagnóstico para ORVA estão em contato com diversos alérgenos, o que leva a uma sinalização para diferenciação e recrutamento de células de defesa para as vias aéreas, gerando um aumento na contagem celular no fluido do LBA.

A redução no número de neutrófilos e aumento do número de macrófagos no fluido do LBA ao longo das avaliações era um resultado já observado em cavalos tratados com dexametasona oral (Robinson et al., 2002), mesmo com animais mantidos estabulados (Rush et al., 1998). Isso porque os corticoesteróides causam uma supressão da resposta inflamatória e modulam a produção de citocinas por linfócitos T (Brinkmann et al., 1995), alterando o ambiente pró-inflamatório natural da ORVA.

Os efeitos da terapia celular na redução do processo inflamatório pulmonar já haviam sido demonstrados em camundongos, após a instilação intratraqueal de células-tronco mesenquimais (Nemeth et al., 2010; Abreu et al., 2011; Cruz et al., 2012) e de CMDMO (Abreu et al., 2013), mas ainda não eram demonstrados em cavalos. No presente estudo, pode-se determinar que, também nos cavalos com ORVA, as CMDMO apresentaram efeitos benéficos na inflamação pulmonar quando os animais foram tratados com instilação traqueal das mesmas, possivelmente pela associação dos diferentes tipos celulares presentes no pool de mononucleares e por sua capacidade de ação por via parácrina com secreção de fatores solúveis que modulam a resposta imunológica (Araujo et al., 2010; Abreu et al., 2013). Essas características das CMDMO possibilitaram que os animais tratados no grupo Gcel tivessem semelhante redução no número de neutrófilos e aumento do número de macrófagos no fluido do LBA, como apresentado pelos animais do grupo tratado com dexametasona oral convencional.

Nos animais do grupo Gdex, o aumento significativo de macrófagos multinucleados aos 21 dias de tratamento, tornando-os estatisticamente diferentes do grupo Gcel nessa mesma avaliação, é condizente com uma resposta imunológica do tipo Th2, uma vez que a fusão de macrófagos é mediada pela IL-4 (Helming e Gordon, 2007), citocina de resposta Th2 que pode estar com a secreção aumentada pelo uso de corticoesteróides (Elenkov, 2004). Em equinos, são poucos os estudos envolvendo os macrófagos multinucleados, mas é relatado que uma quantidade aumentada pode estar associada à inflamação crônica (Hodgson e Hodgson, 2007), assim como em humanos, onde são considerados como um achado indicativo de reações inflamatórias crônicas nas vias aéreas, como a tuberculose, por exemplo

(Lemaire et al., 2006; Helming e Gordon, 2007). Esse aumento nos animais do grupo Gdex também pode estar associado a uma resistência das células aos corticoesteróides (Bhavsar et al., 2008), o que levou a uma caracterização de inflamação durante o tratamento, já que os animais foram mantidos em contato com certa carga de alérgenos.

É essencial que se entenda os mecanismos celulares para se esclarecer a resposta de diferentes terapias. Como orquestrador da resposta inflamatória pulmonar (Geiser, 2010) e responsável por ativar as respostas inflamatórias de forma suficiente a eliminar agentes agressores (Peters-Golden, 2004), entender o papel do macrófago alveolar na ORVA é importante, bem como a sua resposta ao tratamento com terapia celular. No presente estudo, observou-se uma resposta diferente em relação aos tratamentos quanto à adesão e fagocitose do macrófago alveolar, ambas apresentando um aumento significativo apenas no grupo Gdex. Já está comprovado que macrófagos alveolares possuem sua supressão prejudicada em humanos pelo uso crônico de corticoesteróides, devido à redução relativa na sensibilidade ao medicamento (Bhavsar et al., 2008). Isso pode justificar o quadro de ativação exacerbada no grupo Gdex, mesmo após o tratamento com dexametasona oral, levando ao aumento da adesão e da fagocitose nesses animais.

Sobre o uso de corticoesteróides, sua eficácia no tratamento de doenças obstrutivas das vias aéreas é controversa. Estudos já comprovaram que o medicamento não reduz os marcadores de inflamação nas vias aéreas, como a IL-8, e isso pode ser explicado pela insensibilidade ao tratamento da principal célula inflamatória das vias aéreas, o macrófago alveolar (Culpitt et al., 1999). Os cavalos do grupo Gdex apresentaram uma melhora no quadro inflamatório, mas a adesão e a fagocitose dos mesmos indicam uma persistente ativação de células inflamatórias e uma falta de modulação da resposta. Isso pode significar que esses pacientes são relativamente resistentes ao efeito terapêutico da medicação. A interrupção da terapia possivelmente conduziria a um agravamento do quadro, evidenciando uma resposta parcial inadequada ao tratamento com corticoesteróides (Bhavsar et al., 2008).

No presente estudo não se observou mudança significativa na fagocitose pelos macrófagos dos animais que receberam a terapia celular. Mei et al. (2010) já haviam

relatado a melhoria na depuração de alérgenos pela atividade fagocítica aumentada de macrófagos em ratos com modelo de sepse pulmonar. Além disso, Kim e Hematti (2009) demonstraram que as células-tronco humanas melhoraram a atividade fagocitária dos macrófagos em ensaios *in vitro*, pela ativação de macrófagos M2, que se caracterizam por propriedades anti-inflamatórias e uma atividade fagocitária mais potente. A atividade fagocitária dos macrófagos alveolares depende da sua capacidade de adesão. Como no grupo Gcel não houve alteração na adesão do macrófago alveolar, isto pode ter se refletido na ausência de uma melhoria da capacidade fagocítica.

A diferença significativa na adesão entre os dois grupos na avaliação inicial não deve ser relatada como um dado relevante do estudo, já que todos os animais se enquadraram nos pré-requisitos e passaram pelas mesmas análises até que se fosse confirmada a doença, podendo ser o resultado de diferenças individuais aleatórias.

A resposta imunológica pulmonar inata de cavalos pode ser estudada *ex vivo* pela medição da secreção de citocinas pelos macrófagos alveolares (Waldschmidt et al., 2013). Os cavalos com ORVA apresentam um nível elevado de TNF- α e IL-1 β mesmo quando mantidos em um ambiente com baixa carga de alérgenos e estando livres de sinais clínicos (Laan et al., 2006; Lavoie-Lamoureux et al., 2012; Padoan et al., 2013). No presente estudo observou-se especificamente os níveis de TNF- α e IL-1 β secretados pelos macrófagos alveolares. Não houve diferença estatística entre os animais de ambos os grupos no decorrer dos tratamentos, porém os animais do grupo Gcel apresentaram a secreção de IL-1 β mais baixa quando comparado aos animais do grupo Gdex na avaliação dos 7 dias e 21 dias. Isso pode demonstrar uma melhor imunomodulação por parte das células mononucleares em relação a uma citocina pró-inflamatória.

Estudos anteriores já haviam demonstrado que a adição de células-tronco mesenquimais a macrófagos estimulados reduziu o nível de TNF- α no sobrenadante celular (Gupta et al., 2007) e no fluido do LBA (Mei et al., 2010), assim como suprimiram o aumento de TNF- α e IL-1 β no soro de ratos com lesão pulmonar (Li et al., 2012). A terapia com corticoesteróides também resultou em uma inibição seletiva de TNF- α e IL-1 β (Sousa et al., 1997). Nosso grupo não observou a diminuição

significativa dos níveis de TNF- α e IL-1 β por parte dos macrófagos alveolares possivelmente por três motivos. Primeiramente, as concentrações encontradas no estudo foram bastante baixas para o método de detecção utilizado, podendo ocasionar erros na leitura. A citometria de fluxo seria um método mais indicado para este caso, sendo mais sensível.

Como segundo ponto a ser levado em conta, para o isolamento dos macrófagos alveolares, os mesmos foram deixados para aderir por uma hora, o que pode causar a ativação celular. A aderência por uma hora resulta em maiores níveis de TNF- α espontâneo do que uma incubação por 24 horas (Tomlinson et al., 2012) e também pode reduzir a sensibilidade ao corticoesteróide (Higham et al., 2014).

Por último, as duas citocinas escolhidas para análise têm uma interação na transdução de sinal bem próxima (Eder, 1997) e o TNF- α tem a capacidade de promover a liberação de IL-1 β (Padoan et al., 2013), ou seja, a não diminuição dos níveis de IL-1 β entre as avaliações pode estar relacionada a sua forte interação com o TNF- α , que também não sofreu diminuição.

A apoptose é o maior mecanismo de controle de neutrófilos no local da inflamação (Haslett, 1999), e em cavalos com ORVA, encontram-se resultados distintos, variando entre a não alteração da apoptose em relação a cavalos sadios (Breuer et al., 2011) e a diminuição da mesma em neutrófilos e macrófagos de animais com ORVA (Brazil et al., 2005; Niedzwiedz et al., 2014).

Numericamente, o resultado deste estudo se enquadra entre outros já publicados, onde levando-se em conta todas as avaliações realizadas, a media da apoptose foi menor que 12% e maior que 1,2%. Para Breuer et al. (2011), a apoptose ficou entre 10-20%, já para Brazil et al. (2005), a apoptose celular ficou entre 0,3-3,8%. Porém, com a terapia celular e com o tratamento de dexametasona oral, a apoptose dos animais em estudo sofreu uma diminuição significativa. Estes resultados, que parecem contrários aos expostos no parágrafo anterior, podem ser explicados pela não separação dos tipos celulares (macrófagos e neutrófilos) durante a análise em questão.

Assim, antes dos tratamentos, a apoptose poderia estar aumentada devido a proporção desequilibrada entre macrófagos e neutrófilos nas vias aéreas, fazendo com que muitos neutrófilos apoptóticos ficassem no local sem a devida fagocitose pelos

macrófagos (Haslett, 1999). Com os tratamentos, onde ambos atuaram sobre o perfil de células inflamatórias, a proporção de células voltou ao equilíbrio e os neutrófilos apoptóticos começaram a ser devidamente fagocitados pelos macrófagos.

4.5 CONCLUSÃO

O presente estudo foi inédito no tratamento de equinos com Obstrução Recorrente das Vias Aéreas (ORVA) com o uso de células mononucleares derivadas da medula óssea (CMDMO) e foi importante observar que o protocolo se mostrou seguro aos animais.

O estudo demonstrou que:

1. Houve melhora na citologia do fluido do lavado broncoalveolar dos animais com ORVA com o tratamento com CMDMO, assim como com dexametasona.
2. Ambos os tratamentos levaram a uma diminuição significativa na apoptose celular.
3. O tratamento com CMDMO indica uma imunoregulação da resposta inflamatória, não apresentando aumento significativo na atividade do macrófago alveolar, e uma diminuição significativa na secreção de interleucina 1 β .

CAPÍTULO 5

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de células mononucleares derivadas de medula óssea (CMDMO), como tratamento de equinos com Obstrução Recorrente das Vias Aéreas (ORVA), se mostrou um protocolo terapêutico seguro, onde os animais não apresentaram nenhum efeito adverso à coleta de medula óssea, tampouco à administração das células.

Como o tratamento da ORVA com corticoesteróides não impede novas crises, o estudo dos animais tratados com células mononucleares dentro de seis meses até um ano se torna importante, uma vez que será possível verificar se existe uma melhora prolongada no quadro da doença, evitando novos episódios de crise e exposições a medicamentos.

Visto que ainda não existem estudos no campo da terapia celular de cavalos com ORVA, novas pesquisas devem ser feitas para se observar se os resultados são condizentes com os já encontrados em humanos e camundongos. Os novos estudos podem englobar a regulação do estresse oxidativo gerado no quadro da doença, a resposta das CMDMO sobre outros marcadores inflamatórios e com detecção por outros métodos, além da resposta sistêmica da terapia.

É importante considerar o estudo de um grupo controle com animais sadios, para se registrar os parâmetros esperados nas condições do estudo.

REFERÊNCIAS

Abreu SC, Antunes MA, Pelosi P, Morales MM, Rocco PRM. Mechanisms of cellular therapy in respiratory diseases. *Critical Care Medicine*. 2011; 37: 1421-1431.

Abreu SC, Antunes MA, de Castro JC, de Oliveira MV, Bandeira E, Ornellas DS, Diaz BL, Morales MM, Xisto DG, Rocco PR. Bone marrow-derived mononuclear cells vs. mesenchymal stromal cells in experimental allergic asthma. *Respiratory Physiology and Neurobiology*. 2013;187(2):190-198.

Adams MK, Goodrich LR, Rao S, Olea-Popelka F, Phillips N, Kisiday JD, McIlwraith CW. Equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells (BMDMSCs) from the ilium and sternum: are there differences? *Equine Veterinary Journal*. 2013; 45(3): 372-375.

Aharonson-Raz K, Lohmann KL, Townsend HG, Marques F, Singh B. Pulmonary intravascular macrophages as proinflammatory cells in heaves, an asthma-like equine disease. *The American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2012; 303(3): 189-198.

Ainsworth DM, Grünig G, Matychak MB, Young J, Wagner B, Erb HN, Antczak DF. Recurrent airway obstruction (RAO) in horses is characterized by IFN- γ and IL-8 production in bronchoalveolar lavage cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2003; 96(1): 83-91.

Alcorn JF and Wright JR. Surfactant protein A inhibits alveolar macrophage cytokine production by CD-14-independent pathway. *The American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2004; 286: L129-L136.

Alves ALG, Vieira MEM, Barreira APB, Mota LSLS, Saito ME, Kohayagawa A, Hussni CA, Watanabe MJ, Oliveira PGG. Protocolo de isolamento de células mononucleares de medula óssea de equinos. *Revista Veterinária e Zootecnia*.2009; 16: 650-655.

Araújo IM, Abreu SC, Maron-Gutierrez T, Cruz F, Fujisaki L, Carreira HJr, Ornellas F, Ornellas D, Vieira-de-Abreu A, Castro-Faria-Neto HC, Muxfeldt Ab'Saber A, Teodoro WR, Diaz BL, Peres Dacosta C, Capellozzi VL, Pelosi P, Morales MM, Rocco PR. Bone marrow-derived mononuclear cell therapy in experimental pulmonar and extra pulmonar acute lung injury. *Critical Care Medicine*. 2010; 38(8): 1733-1741.

Bhavsar P, Hew M, Khorasani N, Torrego A, Barnes PJ, Adcock I, Chung KF. Relative corticosteroid insensitivity of alveolar macrophages in severe asthma compared with non-severe asthma. *Thorax*. 2008; 63(9): 784-790.

Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nature reviews: Immunology*. 2010; 11:889–896.

Bober LA, Waters TA, Pugliese-Sivo CC, Sullivan LM, Narula SK, Grace MJ. IL-4 induces neutrophilic maturation of HL-60 cells and activation of human peripheral blood neutrophils. *Clinical and Experimental Immunology*.1995; 99: 129–136.

Boey H, Rosenbaum R, Castracane J, Borish L. Interleukin-4 is a neutrophil activator. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*.1989; 83: 978–984.

Bowles KS, Beadle RE, Mouch S, Pourciau SS, Littlefield Chabaud MA, LeBlanc C, Mistic L, Fermaglich D, Horohov DW. A novel model for equine recurrent airway obstruction. *Veterinary Immunology and Immunopathology*.2002; 87: 385–389.

Boyum A. Separation of white blood cells. *Nature*.1964; 204:793-4.

Braun CM, Huang SK, Bashian GG, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM, Essayan DM. Corticosteroid modulation of human, antigen-specific Th1 and Th2 responses. *Journal of allergy and clinical immunology*. 1997; 100(3): 400-407.

Brazil TJ, Dagleish MP, McGorum BC, Dixon PM, Haslett C, Chilvers ER. Kinetics of pulmonary neutrophil recruitment and clearance in a natural and spontaneously resolving model of airway inflammation. *Clinical & Experimental Allergy*. 2005; 35(7): 854-865.

Breuer J, Müller U, Locher L, Spallek A, Recknagel S, Uhlig A, Schusser GF. Differentiation of viable, apoptotic and necrotic cells in bronchoalveolar lavage fluid of normal horses and horses with recurrent airway obstruction. *Berliner und Munchener Tierarztluche Wochenschrift*. 2011; 124(3-4):154-60.

Brinkmann V, Kristofic C. Regulation by corticosteroids of Th1 and Th2 cytokine production in human CD4 + effector T cells generated from CD45RO- and CD45RO + subsets. *Journal of Immunology*. 1995; 155: 3322-8.

Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2006; 98:1076 –1084.

Caramori G and Papi A. Oxidants and asthma. *Thorax*. 2004; 59: 170-173.

Carlton WW and McGavin MD. *Patologia veterinária especial de Thomson*. 2nd ed. Porto Alegre: Artmed; 1998.

Carter-Arnold JL, Neilsen NL, Amelse LL, Odoi A, Dhar MS. In vitro analysis of equine, bone marrow-derived mesenchymal stem cells demonstrates differences within age-and gender-matched horses. *Equine Veterinary Journal*. 2014.

Castro Jr CGD, Gregianin LJ, Brunetto AL. Bone marrow transplantation and cord blood transplantation in children. *Jornal de Pediatria*. 2001;77(5): 345-360.

Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem cells*. 2007; 25: 2739-2749.

Chen Y, Nickola TJ, DiFronzo NL, Colberg-Poley AM, Rose MC. Dexamethasone-mediated repression of MUC5AC gene expression in human lung epithelial cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2006; 34(3): 338–347.

Choi H, Lee RH, Bazhanov N, Oh JY, Prockop DJ. Anti-inflammatory protein TSG-6 secreted by activated MSCs attenuates zymosan-induced mouse peritonitis by decreasing TLR2/NF-kappaB signaling in resident macrophages. *Blood*. 2011;118:330–338.

Chung KF, Barnes PJ. Cytokines in asthma. *Thorax*. 1999; 54(9): 825-857.

Connelly L, Jacobs AT, Palacios-Callender M, Moncada S, Hobbs AJ. Macrophage endothelial nitric-oxide synthase autoregulates cellular activation and pro-inflammatory protein expression. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003; 278: 26480-26487.

Cordeau ME, Joubert P, Dewachi O, Hamid Q, Lavoie JP. IL-4, IL-5 and IFN- γ mRNA expression in pulmonary lymphocytes in equine heaves. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2004; 97(1): 87-96.

Cornelisse CJ, Robinson NE, Berney CEA, Kobe CA, Boruta DT, Derkensen FJ. Efficacy of oral and intravenous dexamethasone in horses with recurrent airway obstruction. *Equine Veterinary Journal*. 2004; 36(5):426-30.

Couëtil LL, Chilcoat CD, DeNicola DB, Clark SP, Glickman NW, Glickman LT. Randomized, controlled study of inhaled fluticasone propionate, oral administration of prednisone, and environmental management of horses with recurrent airway obstruction. *American journal of veterinary research*. 2005; 66(10): 1665-1674.

Couëtil LL, Hoffman AM, Hodgson J, Buechner-Maxwell V, Viel L, Wood JLN, Lavoie JP. Inflammatory Airway Disease of Horses. ACVIM Consensus Statement. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2007; 21: 356–361.

Cruz FF, Antunes MA, Abreu SC, Fujisaki LC, Silva JD, Xisto DG, Maron-Gutierrez T, Ornellas DS, Sá VK, Rocha NN, Capelozzi VL, Morales MM, Rocco PR. Protective effects of bone marrow mononuclear cell therapy on lung and heart in an elastase-induced emphysema model. *Respiratory Physiology and Neurobiology*. 2012; 186: 26-36.

Cuende N, Rico L, Herrera C. Concise review: bone marrow mononuclear cells for the treatment of ischemic syndromes: medicinal product or cell transplantation?. *Stem Cells Translational Medicine*. 2012; 1(5): 403-408.

Culpitt SV, Maziak W, Loukidis S, Nightingale JA, Matthews JL, Barnes PJ. Effect of high dose inhaled steroid on cells, cytokines, and proteases in induced sputum in chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical care Medicine*. 1999; 160(5): 1635-1639.

Dauvillier J, Felipe MJB, Lunn DP, Lavoie-Lamoureux A, Leclère M, Beauchamp G, Lavoie JP. Effect of Long-Term Fluticasone Treatment on Immune Function in Horses with Heaves. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2011; 25:549–557.

Deaton CM. The role of oxidative stress in an equine model of human asthma. *Redox Report*. 2006; 11(2): 46-52.

Deb A, Davis BH, Guo J, Ni A, Huang J, Zhang Z, Mu H, Dzau VJ. SFRP2 regulates cardiomyogenic differentiation by inhibiting a positive transcriptional autofeedback loop of Wnt3a. *Stem Cells*. 2008; 26:35– 44.

Debrue M, Hamilton E, Joubert P, Lajoie-Kadoch S, Lavoie JP. Chronic exacerbation of equine heaves is associated with an increased expression of interleukin-17 mRNA in bronchoalveolar lavage cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2005; 105: 25-31.

Delling U, Lindner K, Ribitsch I, Jülke H, Brehm W. Comparison of bone marrow aspiration at the sternum and the tuber coxae in middle-aged horses. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 2012; 76(1): 52.

DeLuca L, Erb HN, Young JC, Perkins GA, Ainsworth DM. The effect of adding oral dexamethasone to feed alterations on the airway cell inflammatory gene expression in stable horses affected with recurrent airway obstruction. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2008; 22: 427-435.

Derkensen FJ, Scott JS, Miller DC, Slocombe RF, Robinson NE. Bronchoalveolar lavage in ponies with recurrent airway obstruction (Heaves). *The American Review of Respiratory Disease*. 1985; 132: 1066-1070.

Desjardins I, Theoret C, Joubert P, Wagner B, Lavoie JP. Comparison of TGF-beta 1 concentrations in bronchoalveolar fluid of horses affected with heaves and of normal controls. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2004; 101(3): 133-141.

Dixon PM, Railton DI, McGorum BC. Equine pulmonary disease: a case control study of 300 referred cases. Part 2: Details of animals and of historical and clinical findings. *Equine veterinary Journal*. 1995; 27(6): 422-427.

Durando MM, Zarucco L, Schaer TP, Ross M, Reef VB. Pneumopericardium in a horse secondary to sternal bone marrow aspiration. *Equine Veterinary Education*. 2006; 18(2), 75-79.

Dyrynda EA, Pipe RK, Burt GR, Ratcliffe NA. Modulations of the immune defences of mussels (*Mytilus edulis*) from contaminated sites in the UK. *Aquatic Toxicology*. 1998; 42: 169-185.

Eder J. Tumour necrosis factor α and interleukin 1 signalling: do MAPKK kinases connect it all?. *Trends in pharmacological sciences*. 1997; 18(9): 319-322.

Elenkov IJ. Glucocorticoids and the Th1/Th2 balance. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2004; 1024(1): 138-146.

Fairbairn SM, Page CP, Lees P, Cunningham FM. Early neutrophil but not eosinophil or platelet recruitment to the lungs of allergic horses following antigen exposure. *Clinical and Experimental Allergy*. 1993; 23: 821–828.

Fernandes WR, Mori E, Sanches A. Avaliação citológica de lavados traqueobrônquico e broncoalveolar em cavalos clinicamente sadios pelo método de coloração de Rosenfeld. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2000; 52(6): 604-609.

Franchini M, Gilli U, Akens MK, Fellenberg RV, Bracher V. The role of neutrophil chemotactic cytokines in the pathogenesis of equine chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 1998; 66: 53–65.

Geiser M. Update on macrophage clearance of inhaled micro- and nanoparticles. *Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery*. 2010; 23: 207–217.

Gerber H, Robinson NE, Venta RJ, Rawson J, Jefcoat AM, Hotchkiss JA. Mucin genes in horse airways: MUC5AC, but not MUC2, may play a role in recurrent airway obstruction. *Equine Veterinary Journal*. 2003; 35: 252–257.

Girard D, Paquin R, Beaulieu AD. Responsiveness of human neutrophils to interleukin-4: induction of cytoskeletal rearrangements, de novo protein synthesis and delay of apoptosis. *The Biochemical Journal*. 1997; 325: 147–153.

Gnecchi M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine Mechanisms in Adult Stem Cell Signaling and Therapy. *Circulation Research*. 2008; 103:1204-1219.

Godwin EE, Young NJ, Dudhia J, Beamish IC, Smith RKW. Implantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells demonstrates improved outcome in horses with overstrain injury of the superficial digital flexor tendo. *Equine Veterinary Journal* 2012; 44(1): 25-32.

Gupta N, Su X, Popov B, Lee JW, Serikov V, Matthay MA. Intrapulmonary delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves survival and attenuates endotoxin-induced acute lung injury in mice. *The Journal of Immunology*. 2007; 179(3): 1855-1863.

Haslett C. Granulocyte apoptosis and its role in the resolution and control of lung inflammation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 1999; 160: 5-11.

Hellings PW, Kasran A, Liu Z, Vandekerckhove P, Wuyts A, Overbergh L, Mathieu C, Ceuppens JL. Interleukin-17 orchestrates the granulocyte influx into airways after allergen inhalation in a mouse model of allergic asthma. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2003; 28: 42-50.

Helming L e Gordon S. Macrophage fusion induced by IL-4 alternative activation is a multistage process involving multiple target molecules. *European Journal of Immunology*. 2007; 37(1): 33-42.

Herszberg B, Ramos-Barbón D, Tamaoka M, Martin JG, Lavoie JP. Heaves, an asthma-like equine disease, involves airway smooth muscle remodeling. *Journal of allergy and clinical immunology*. 2006; 118(2): 382-388.

Hewson J, Viel L. Sampling, microbiology and cytology of the respiratory tract. Lekeux P. 2002.

Higham A, Lea S, Ray D, Singh D. Corticosteroid effects on COPD alveolar macrophages: Dependency on cell culture methodology. *Journal of Immunological Methods*. 2014; 405: 144-153.

Hodgson JL e Hodgson DR. Collection and analysis of respiratory tract samples. In: McGorum BC; Dixon PM; Robinson NE; Schumacher J. *Equine Respiratory Medicine and Surgery*. Philadelphia: Saunders Elsevier. 2007, p. 119-150.

Hoffman AM. Clinical application of pulmonary function testing in horses. *Equine respiratory diseases international veterinary information service Ithaca, DocumentNo B, 3040802*. 2002.

Hoffman AM. Bronchoalveolar lavage: sampling technique and guidelines for cytologic preparation and interpretation. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*. 2008; 24(2): 423-435.

Horohov DW, Kydd JH, Hannant D. The effect of aging on T cell responses in the horse. *Developmental and comparative immunology*. 2002; 26(1): 121-128.

Horohov DW. Immunology of the equine lung. Equine Respiratory Diseases, International Veterinary Information Service. Ithaca, NY. 2004.

Hoshino H, Laan M, Sjostrand M, Lötvall J, Skoogh BE, Lindén A. Increased elastase and myeloperoxidase activity associated with neutrophil recruitment by IL-17 in airways in vivo. The Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2000; 105(1): 143-149.

Hotchkiss JW, Reid SWJ, Christley RM. A survey of horse owners in Great Britain regarding horses in their care. Part 2: Risk factors for recurrent airway obstruction. Equine Veterinary Journal. 2007; 39(4): 301-308.

Jackson CA, Berney C, Jefcoat AM, Robinson NE. Environment and prednisone interactions in the treatment of recurrent airway obstruction (heaves). Equine Veterinary Journal. 2000; 32(5): 432-438.

Joubert P, Cordeau ME, Lavoie JP. Cytokine mRNA expression of pulmonary macrophages varies with challenge but not with disease state in horses with heaves or in controls. Veterinary Immunology and Immunopathology. 2011; 142: 236-242.

Kasashima Y, Ueno T, Tomita A, Goodship AE, Smith RKW. Optimisation of bone marrow aspiration from the equine sternum for the safe recovery of mesenchymal stem cells. Equine Veterinary Journal. 2011; 43(3): 288-294.

Kim J, Hematti P. Mesenchymal stem cell-educated macrophages: A novel type of alternatively activated macrophages. Experimental Hematology. 2009; 37: 1445–1453.

Kirkham P and Rahman I. Oxidative stress in asthma and COPD: antioxidants as a therapeutic strategy. Clinical Pharmacology and Therapeutics. 2006; 111(2): 476-494.

Kirschvink N, Moffatts B, Lekeux P. The oxidant/antioxidant equilibrium in horses. The Veterinary Journal. 2008; 177: 178-191.

Klukowska-Rötzler J, Swinburne JE, Drögemüller C, Dolf G, Janda J, Leeb T, Gerber V. The interleukin 4 receptor gene and its role in recurrent airway obstruction in Swiss Warmblood horses. *Animal genetics*. 2012; 43(4): 450-453.

Kutasi O, Balogh N, Lajos Z, Nagy K, Szenci O. Diagnostic Approaches for the Assessment of Equine Chronic Pulmonary Disorders. *Journal of Equine Veterinary Sciences*. 2011; 31: 400-410.

Laan TT, Bull S, Pirie RS, Fink-Gremmels J. Evaluation of cytokine production by equine alveolar macrophages exposed to lipopolysaccharide, *Aspergillus fumigatus*, and a suspension of hay dust. *American journal of veterinary research*. 2005; 66(9): 1584-1589.

Laan TJM, Bull S, Pirie R, Fink-Gremmels J. The role of alveolar macrophages in the pathogenesis of recurrent airway obstruction in horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2006; 20: 167-174.

Lavoie JP, Maghni K, Desnoyers M, Taha R, Martin JG, Hamid QA. Neutrophilic airway inflammation in horses with heaves is characterized by a Th2-type cytokine profile. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2001; 164(8): 1410-1413.

Lavoie-Lamoureux A, Beauchamp G, Quessy S, et al. Systemic inflammation and priming of peripheral blood leukocytes persist during clinical remission in horses with heaves. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2012;146:35–45.

Lavoie-Lamoureux A, Leclerc M, Lemos K, Wagner B, Lavoie JP. Markers of systemic inflammation in horses with heaves. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2012; 26(6): 1419-1426.

Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, Lanino E, Sundberg B, Bernardo ME, Remberger M, Dini G, Egeler RM, Bacigalupo A, Fibbe W, Ringdén O. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *The Lancet*. 2008; 371(9624): 1579-1586.

Leclerc M, Lavoie-Lamoureux A, Lavoie JP. Heaves, an asthma-like disease of horses. *Respirology*. 2011; 16: 1027–1046.

Léguillette R. Recurrent Airway Obstruction – heaves. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*. 2003;19: 63-86.

Lehnert BE. Pulmonary and thoracic macrophage subpopulations and clearance of particles from the lung. *Environmental health perspectives*. 1992; 97: 17.

Lemaire I, Falzoni S, Leduc N, Zhang B, Pellegatti P, Adinolfi E, Chiozzi P, Di Virgilio F. Involvement of the purinergic P2X7 receptor in the formation of multinucleated giant cells. *Journal of Immunology*. 2006; 177(10): 7257-7265.

Lessa DAB, Mori E, Viana EB, Santos OJ, Moreira JFE, Fernandes WR. Lavado broncoalveolar em eqüinos: revisão de literatura Parte 2: Achados citológicos. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*. 2007;10(1): 31-38.

Li J, Li D, Tang S, Wei F. Human umbilical cord mesenchymal stem cells reduce systemic inflammation and attenuate LPS-induced acute lung injury in rats. *Journal of Inflammation*. 2012; 9(1): 33.

Linden A, Hoshino H, Laan M. Airway neutrophils and interleukin-17. *European Respiratory Journal*. 2000; 15: 973-977.

Lolmede K, Campana L, Vezzoli M, Bosurgi L, Tonlorenzi R, Clementi E, Bianchi ME, Cossu G, Manfredi AA, Brunelli S, Rovere-Querini P. Inflammatory and alternatively

activated human macrophages attract vessel-associated stem cells, relying on separate HMGB1-and MMP-9-dependent pathways. *Journal of Leukocyte Biology*. 2009; 85: 779-787.

MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annual Review of Immunology*. 1997; 15:323–350.

MacNee W. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2005;2(4): 258.

Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *The Journal of Pathology*. 2013; 229(2): 176-185.

Marinkovic D, Aleksic-Kovacevic S, Plamenac P. Cellular basis of chronic obstructive pulmonary disease in horses. *International Review of Cytology*. 2007; 257: 213-247.

Marr KA, Foster AP, Lees P, Cunningham FM, Page CP. Effect of antigen challenge on the activation of peripheral blood neutrophils from horses with chronic obstructive pulmonary disease. *Research in Veterinary Science*. 1997; 62: 253-260.

Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annual Review of Immunology*. 2009; 27: 451-483.

McGorum BC, Dixon PM, Halliwell REW. Responses of horses affected with chronic obstructive pulmonary disease to inhalation challenges with mould antigens. *Equine Veterinary Journal*. 1993; 25: 261-267.

McGorum BC, Dixon PM, Halliwell REW, Irvin P. The analysis and interpretation of equine bronchoalveolar lavage fluid (BALF) cytology. *Equine Veterinary Education*. 1994; 6(4):203-209.

McKane SA, Canfield PJ, Rose RJ. Equine bronchoalveolar lavage cytology: survey of Thoroughbred racehorses in training. *Australian Veterinary Journal*. 1993; 70(11): 401-404.

Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 2008; 454:428–435.

Mei SH, Haitsma JJ, Dos Santos CC, Deng Y, Lai PF, Slutsky AS, Liles WC, Stewart DJ. Mesenchymal stem cells reduce inflammation while enhancing bacterial clearance and improving survival in sepsis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2010; 182(8): 1047-1057.

Michelotto PVJr, Muehlmann LA, Zanatta AL, Bieberbach EWR, Fernandes LC, Nishiyama A. Platelet -Activating Factor and Evidence of Oxidative Stress in the Bronchoalveolar Fluid of Thoroughbred Colts during Race Training. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2010; 24:414–419.

Michelotto Jr, PV, Muehlmann LA, Zanatta AL, Bieberbach EW, Kryczyk M, Fernandes LC, Nishiyama A. Pulmonary inflammation due to exercise-induced pulmonary haemorrhage in Thoroughbred colts during race training. *The Veterinary Journal*. 2011; 190(2): 3-6.

Miyamoto Y, Suyama T, Yashita T, Akimaru H, Kurata H. Bone marrow subpopulations contain distinct types of endothelial progenitor cells and angiogenic cytokine-producing cells. *Journal of Molecular and Cell Cardiology*. 2007; 43:627– 635.

Molet S, Hamid Q, Davoine F, Nutku E, Tahaa R, Pagé N, Olivenstein R, Elias J, Chakir J. IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2011; 108(3): 430-438.

Moreira AP and Hogaboam CM. Macrophages in allergic asthma: fine-tuning their pro- and anti-inflammatory actions for disease resolution. *Journal of Interferon and Cytokine Research*. 2011; 31:485–491.

Muehlmann LA, Michelotto Jr PV, Nunes EA, Grando FCC, Silva FTD, Nishiyama A. PAF increases phagocytic capacity and superoxide anion production in equine alveolar macrophages and blood neutrophils. *Research in veterinary Science*. 2012; 93(1): 393-397.

Murphy MP, Lawson JH, Rapp BM, Dalsing MC, Klein J, Wilson MG, Hutchins GD, March KL. Autologous bone marrow mononuclear cell therapy is safe and promotes amputation-free survival in patients with critical limb ischemia. *Journal of Vascular Surgery*. 2011; 53:1565-1574.

Muschler GF, Boehm C, Easley K. (1997). Aspiration to Obtain Osteoblast Progenitor Cells from Human Bone Marrow: The Influence of Aspiration Volume. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*. 1997; 79(11): 1699-1709.

Nelson HS, Davies DE, Wicks J, Powell RM, Puddicombe SM, Holgate ST. Airway remodeling in asthma: new insights. *Journal of allergy and clinical immunology*. 2003; 111(2): 215-225.

Nemeth K, Keane-Myersc A, Brownc JM, Metcalfec DD, Gorham JD, Bundoc VG, Hodges MG, Jelinek I, Madala S, Karpatti S, Mezey E. Bone marrow stromal cells use TGF- β to suppress allergic responses in a mouse model of ragweed induced asthma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010; 107: 5652-5657.

Niedzwiedz A, Jaworski Z, Tykalowski B, Smialek M. Neutrophil and macrophage apoptosis in bronchoalveolar lavage fluid from healthy horses and horses with recurrent airway obstruction (RAO). *BMC veterinary research*. 2014; 10(1): 29.

Noel W, Raes G, Hassanzadeh Ghassabeh G, De Baetselier P, Beschin A. Alternatively activated macrophages during parasite infections. *Trends in Parasitology*. 2004; 20:126–133.

Padoan E, Ferraresso S, Pegolo S, Castagnaro M, Barnini C, Bargelloni L. Real time RT-PCR analysis of inflammatory mediator expression in recurrent airway obstruction-affected horses. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2013; 156(3): 190-199.

Pesce JT, Ramalingam TR, Mentink-Kane MM, Wilson MS, El Kasmi KC, Smith AM, Thompson RW, Cheever AW, Murray PJ, Wynn TA. Arginase-1-expressing macrophages suppress Th2 cytokine-driven inflammation and fibrosis. *PLoS Pathogens*. 2009; 5:e1000371.

Peters-Golden M. The alveolar macrophage: the forgotten cell in asthma. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2004; 31: 3-7.

Pirie RS, Collie DD, Dixon PM, McGorum BC. Inhaled endotoxin and organic dust particulates have synergistic proinflammatory effects in equine heaves (organic dust-induced asthma). *Clinical and Experimental Allergy*. 2003; 33: 676-683.

Porto ACR, Mirandola RM, Mori CS, Fernandes WR. Ureia como marcador de diluição em amostras de lavado traqueobrônquico de potros com rodococose1. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2010; 30(9).

Prockop DJ, Brenner M, Fibbe WE, Horwitz E, Le Blanc K, Phinney DG, Simmons PJ, Sensebe L, Keating A. Defining the risks of mesenchymal stromal cell therapy. *Cytotherapy*. 2010; 12(5): 576-578.

Prota LFM, Lassance RM, Maron-Gutierrez T, Castiglione RC, Garcia CSB, Santana MCE, Souza-Menezes J, Abreu SC, Samoto V, Santiago MF, Capelozzi VL, Takiya CM, Rocco PR, Morales MM. Bone marrow mononuclear cell therapy led to alveolar-

capillary membrane repair, improving lung mechanics in endotoxin-induced acute lung injury. *Cell transplantation*. 2010; 19(8): 965-971.

Racine J, Gerber V, Feutz MM, Riley CP, Adamec J, Swinburne JE, Couetil LL. Comparison of genomic and proteomic data in Recurrent Airway Obstruction affected horses using Ingenuity Pathway Analysis. *BMC Veterinary Research*. 2011; 7.

Ramalho-Santos M, Yoon S, Matsuzaki Y, Mulligan RC, Melton DA. "Stemness": transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells. *Science*. 2002; 298:597– 600.

Ramirez F, Fowell DJ, Puklavec M, Simmonds S, Mason D. Glucocorticoids promote a Th2 cytokine response by CD41 T cells in vitro. *Journal of Immunology*. 1996; 156: 2406–2412.

Ramseyer A, Gaillard C, Burger D, Straub R, Jost U, Boog C, Marti E, Gerber V. Effects of genetic and environmental factors on chronic lower airway disease in horses. *Journal of veterinary internal medicine*. 2007; 21(1): 149-156.

Riul S, Aguillar OM. Contribution to the organization of the service of bone marrow transplantation and nurse's performance. *Revista Latino-Americana de Enfermagem*. 1997; 5(1): 49-57.

Robinson NE. Recurrent airway obstruction (heaves). In: LekeuxP, ed. *Equine Respiratory Diseases*. Ithaca, New York: International Veterinary Information Service, 2001.

Robinson NE, Jackson C, Jefcoat A, Berney C, Peroni D, Derksen FJ. Efficacy of three corticosteroids for the treatment of heaves. *Equine Veterinary Journal*. 2002; 34(1): 17-22.

Rojas M, Xu J, Woods CR, Mora AL, Spears W, Roman J, Brigham KL. Bone Marrow–Derived Mesenchymal Stem Cells in Repair of the Injured Lung. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2005; 33: 145-152.

Rosen H, Gordon S. Monoclonal antibody to the murine type 3 complement receptor inhibits adhesion of myelomonocytic cells in vitro and inflammatory cell recruitment in vivo. *The Journal of Experimental Medicine*. 1987; 166: 1685-1701.

Rush BR, Flaminio MJ, Matson CJ, Hakala JE, Shuman W. Cytologic evaluation of bronchoalveolar lavage fluid from horses with recurrent airway obstruction after aerosol and parenteral administration of beclomethasone dipropionate and dexamethasone, respectively. *American Journal of Veterinary Research*. 1998; 59: 1033–1038.

Schmallenbach KH, Rahman I, Sasse HHL, Dixon PM, Halliwell REW, McGorum BC, Crameri R, Miller HRP. Studies on pulmonary and systemic *Aspergillus fumigatus*-specific IgE and IgG antibodies in horses affected with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 1998; 66(3): 245-256.

Schnabel LV, Fortier LA, Wayne McIlwraith C, Nobert KM. Therapeutic use of stem cells in horses: Which type, how, and when? *The Veterinary Journal*. 2013; 197(3): 570-577.

Sousa AR, Trigg CJ, Lane SJ, Hawksworth R, Nakhosteen JA, Poston RN, Lee TH. Effect of inhaled glucocorticoids on IL-1 beta and IL-1 receptor antagonist (IL-1 ra) expression in asthmatic bronchial epithelium. *Thorax*. 1997; 52(5): 407-410.

Souza LCG, Carvalho, KATD, Rebelatto C, Senegaglia A, Hansen P, Furuta M, Miyague N, Francisco JC, Olandos M, Woitowicz V, Simeoni R, Faria-Neto JR, Brofman P. A comparação entre o transplante de células-tronco mononucleares e mesenquimais no infarto do miocárdio. *Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular*. 2005; 20: 270-8.

Spiteri MA, Knight RA, Jeremy JY, Barnes PJ, Chung KF. Alveolar macrophage-induced suppression of peripheral blood mononuclear cell responsiveness is reversed by invitro allergen exposure in bronchial asthma. *European Respiratory Journal*.1994; 7: 1431–1438.

Sweeney CR, Rossier Y, Ziemer EL, Lindborg S. Effects of lung site and fluid volume on results of bronchoalveolar lavage fluid analysis in horses. *American Journal of Veterinary Research*. 1997; 53(8):1376-1379.

Tang YL, Zhao Q, Qin X, Shen L, Cheng L, Ge J, Phillips MI. Paracrine action enhances the effects of autologous mesenchymal stem cell transplantation on vascular regeneration in rat model of myocardial infarction. *The Annals of Thoracic Surgery*. 2005; 80: 229-236.

Tesarowski DB, Viel LL, McDonell WN. Pulmonary function measurements during repeated environmental challenge of horses with recurrent airway obstruction (heaves). *American Journal of Veterinary Research*. 1996; 57(8): 1214-9.

Tetley TD. Macrophages and the pathogenesis of COPD. *Chest*. 2002;121: 156-159.

Tomlinson GS, Booth H, Petit SJ, Potton E, Towers GJ, Miller RF, Chain BM, Noursadeghi M. Adherent human alveolar macrophages exhibit a transient pro-inflammatory profile that confounds responses to innate immune stimulation. *PLoS One*. 2012; 7: e40348.

Toupadakis CA, Wong A, Genetos DC, Cheung WK, Borjesson DL, Ferraro GL, Galuppo LD, Leach JK, Owens SD, Yellowley CE. Comparison of the osteogenic potential of equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, umbilical cord blood, and umbilical cord tissue. *American Journal of Veterinary Research*. 2010; 71:1237-1245.

Verreck FA, de Boer T, Langenberg DM, van der Zanden L, Ottenhoff TH. Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN- γ -and CD40L-mediated costimulation. *Journal of Leukocyte Biology*. 2006; 79: 285-293.

Viel L. Significance of bronchoalveolar cytology in inflammatory airway disease of horses. In: HOFFMAN et al. *Proceedings of a Workshop on Inflammatory Airway Disease: Defining the Syndrome*, Havemeyer Foundation Monograph Series n. 9, R&W Publications. 2003; 52-54.

Waldschmidt I, Pirottin D, Art T, Audigié F, Bureau F, Tosi I, Abbas SE, Farnir F, Richard E, Dupuis MC. Experimental model of equine alveolar macrophage stimulation with TLR ligands. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2013; 155(1): 30-37.

Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *The New England Journal of Medicine*. 1989; 320: 365-376.

Wills-Karp M, Luyimbazi J, Xu X, Schofield B, Neben TY, Karp CL, Donaldson DD. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science*. 1998; 282(5397): 2258-2261.

Wilsher S, Allen WR, Wood JLN. Factors associated with failure of Thoroughbred horses to train and race. *Equine Veterinary Journal*. 2006; 38(2): 113-118.

Woods PS, Robinson NE, Swanson MC, Reed CE, Broadstone RV, Derksen FJ. Airborne dust and aeroallergen concentration in a horse stable under two different management systems. *Equine Veterinary Journal*. 1993; 25(3): 208-213.

Wu HM, Jin M, Marsh CB. Toward functional proteomics of alveolar macrophages. *American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2005; 288: 585-595.

Wynn TA. IL-13 effector functions. *Annual Review of Immunology*. 2003; 21: 425–456.

Wynn TA. Fibrotic disease and the Th1/Th2 paradigm. *Nature reviews: Immunology*. 2004; 4:583–594.

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

Xu S and Cao X. Interleukin-17 and its expanding biological functions. *Cellular & molecular immunology*. 2010; 7(3): 164-174.

YamadaM, Kubo H, Kobayashi S, Ishizawa K, Numasaki M, Ueda S, Suzuki T, Sasaki H. Bone marrow-derived progenitor cells are important for lung repair after lipopolysaccharide-induced lung injury. *Journal of Immunology*. 2004; 172(2): 1266-1272.

Zhu Z, Homer RJ, Wang Z, Chen Q, Geba GP, Wang J, Zhang Y, Elias JA. Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *The Journal of Clinical Investigation*. 1999;103(6): 779-788.

ANEXOS

Anexo 1

Escore clínico sugerido por Tesarowski

VARIABLE	DESCRIPTOR	SCORE
Respiratory rate (breaths/min)	< 15	0
	16-20	1
	21-25	2
	25-29	3
	> 30	4
Nasal discharge	None	0
	Serous	1
	Mucopurulent	3
Abdominal lift	None	0
	mild (perceptible heave line)	1
	pronounced abdomen, thorax and anal movement)	3
Nasal flaring	None	0
	Presente	1
Tracheal sounds	normal (tubular sound)	0
	increase in intensity	1
	mucus movement	3
Bronchial tones	normal (tubular sound)	0
	audible ventral and dorsal sounds	2
Crackles	None	0
	Presente	2
Wheezes	None	0
	Presente	2
Cough	None	0
	Intermittente	1
	Paroxysmal	3
Thoracic resonance	normal lung field	0
	expanded dorsal and ventral lung fields	2
TOTAL		25

Anexo 2

Coleta da Medula Óssea e Isolamento das Células Mononucleares

1. Manter o animal em jejum de no mínimo 6h antes da coleta de medula.
2. Proceder sedação com acepromazina 1% IV (Acepran, 0.035 mg/kg, Vetnil, São Paulo, Brasil).
3. Fazer a tricotomia dolocal entre a quarta e a sexta esternébras.
4. Proceder anestesia subcutânea local com 8 mL de cloridrato de lidocaína a 2% (Bravet, Rio de Janeiro, Brasil), seguida de antissepsia com iodopovidona degermante e álcool.
5. Proceder sedação com xilazina 10% IV (Sedomin, 0.5 mg/kg, König, São Paulo, Brasil) e cloridrato de petidina 5% IV (Dolosal, Cristália, São Paulo, Brasil).
6. Realizar a punção com agulha Jamshidi 11G (Angiotech, Gainesville, Florida, USA).
7. Utilizar 30 seringas de 20 mL previamente preenchidas com 7 mL de meio IMDM (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos) e 0,35 mL de heparina sódica 5000 UI/mL (Hemofol, Cristália, São Paulo, Brasil) para coleta de 200 mL de medula óssea.
8. Agitar as seringas ao final para homogeneização.
9. Ao término do procedimento, instituir cuidados ao animal com pomada antisséptica nos locais de coleta.
10. Levar as seringas ao laboratório em isopor refrigerado.
11. Colocar o conteúdo das seringas coletadas em tubos para centrifugação de 50 mL e centrifugar por 30 minutos a 650 g, sem freio e sem aceleração.
12. Descartar o plasma e coletar o anel formado entre as camadas de plasma e o pellet de células vermelhas.
13. Diluir o anel em meio IMDM na proporção 1:2 de meio e então colocar sobre o Ficoll (Ficoll-Histopaque-1077, Sigma. Missouri, Estados Unidos). Este método é adaptado de Boyum (1964).
14. Centrifugar por 30 minutos a 650g, sem freio e sem aceleração.

15. Recuperar o anel de células mononucleares em novos tubos e adicionar meio IMDM na proporção 1:1.
16. Centrifugar por 10 minutos a 400 g, com freio e com aceleração máximos.
17. Ressuspender o pellet em meio IMDM.
18. Contar o número total de células em contador hematológico (Mindray BC-2800, Nansham, China).

Anexo 3

Congelamento e descongelamento das Células Mononucleares

1. Deixar um isopor preparado com gelo
2. Adicionar as células mononucleares isoladas em 100 mL de meio IMDM
3. Preparar o meio de congelamento dentro do gelo (60% IMDM – 20% SBF- 20% DMSO)
4. Adicionar o meio de congelamento nas células lentamente, sempre homogeneizando com o auxílio de uma pipeta
5. Colocar as células em meio na bolsa
6. Manter a bolsa 24h a -80°C
7. Passar a bolsa para o nitrogênio líquido

No dia da instilação das células mononucleares

1. Manter o banho-maria ligado a 37°C
2. Preparar 16 tubos com 20mL de meio IMDM
3. Preparar 3 seringas com 60mL de meio IMDM
4. Tirar a bolsa do nitrogênio (cuidar se a mesma não está rachada)
5. Colocar a bolsa no banho-maria
6. Quando restar apenas uma pedra de gelo, levar ao fluxo
7. Injetar o meio das 3 seringas na bolsa
8. Com uma pipeta, transferir as células para os tubos contendo IMDM
9. Centrifugar os tubos por 10 minutos a 400g, com freio e aceleração

10. Inverter os tubos e ressuspender o pellet em soro fisiológico, juntando todos em um tubo
11. Centrifugar o tubo por 10 minutos a 400 g, com freio e aceleração
12. Inverter o sobrenadante
13. Ressuspender as células em 15 mL de soro fisiológico
14. Passar a solução em um cell strainer de 50 µm para tirar grumos
15. Retirar 300 µL para contagem
16. Separar células para anexina
17. Preparar a seringa de infusão com 15 mL da solução com as células e 4 a 5 mL de soro do próprio animal

Anexo 4

Adesão de Macrófago Alveolar (adaptado de Rosen e Gordon, 1987)

1. Plaquear 100 µL da solução de 5×10^6 células e no branco adicionar 100 µL de PBS.
2. Incubar por 1 hora a 37°C.
3. Descartar o sobrenadante.
4. Lavar os poços com 200 µL de PBS duas vezes, procurando tirar os grumos com cuidado.
5. Adicionar 100 µL de Metanol 50%, inclusive no branco.
6. Incubar por 10 minutos em temperatura ambiente.
7. Descartar o sobrenadante.
8. Adicionar 100 µL de solução de Giemsa 0,2%, inclusive no branco.
9. Incubar por 40 minutos em temperatura ambiente.
10. Lavar os poços com 200 µL de PBS duas vezes, procurando tirar os grumos com cuidado.
11. Adicionar 200 µL de Metanol 50%, inclusive no branco.
12. Incubar por 30 minutos em temperatura ambiente.
13. A leitura é realizada a 550 nm.

Anexo 5

Atividade Fagocitária de Macrófago Alveolar (adaptado de Dyrynda et al., 1998)

1. Plaquear 100 µL de solução de 5×10^6 células e no branco adicionar 100 µL de PBS.
2. Incubar por 1 hora a 37°C.
3. Descartar o sobrenadante e lavar duas vezes com 200 µL de PBS.
4. Adicionar 100 µL de PBS em cada poço.
5. Adicionar 20 µL de zimosan corado com vermelho neutro, inclusive no branco.
6. Adicionar 20 µL de zimosan sem vermelho neutro em uma triplicada para cada amostra.
7. Incubar por 30 minutos a 37°C.
8. Retirar o sobrenadante da triplicata sem vermelho neutro e congelar a -20°C em eppendorf.
9. Descartar o restante do sobrenadante.
10. Adicionar 200 µL de Fixador de Baker, inclusive no branco.
11. Incubar por 30 minutos a 37°C.
12. Descartar o sobrenadante.
13. Adicionar 100 µL de PBS.
14. Centrifugar por 5 minutos a 400 g.
15. Descartar o sobrenadante.
16. Adicionar 200 µL de solução de extração, inclusive no branco.
17. Incubar por 30 minutos a 37°C.
18. A leitura é realizada a 550 nm.