

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**“ESTUDO DO NANOCRISTAL QTRACKER 655 COMO MARCADOR
DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS PRÉ E PÓS IMPLANTE EM
TENDINITES EXPERIMENTAIS EM EQUINOS”**

PATRICIA GALVÃO GOMES DE OLIVEIRA

Botucatu - SP

Dezembro 2011

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**“ESTUDO DO NANOCRISTAL QTRACKER 655 COMO MARCADOR
DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS PRÉ E PÓS IMPLANTE EM
TENDINITES EXPERIMENTAIS EM EQUINOS”**

PATRICIA GALVÃO GOMES DE OLIVEIRA

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação
em Medicina Veterinária para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Liz Garcia Alves
Co-orientadora: Profa. Dra. Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga

Botucatu – SP

Dezembro 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Oliveira, Patrícia Galvão Gomes de.

Estudo do nanocristal Qtracker 655 como marcador de células tronco mesenquimais pré e pós implante em tendinites experimentais em equinos / Patrícia Galvão Gomes de Oliveira. – Botucatu : [s.n.], 2011

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Ana Liz Garcia Alves

Coorientador: Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga

Capes: 50500007

1. Equino - Doenças - Estudos experimentais. 2. Tendinite. 3. Células-Tronco.

Palavras-chave: Célula tronco mesenquimal; Equino; Nanocristal Qtracker 655; Tendinite.

Composição da Banca Examinadora

Profa. Ana Liz Garcia Alves

Profa. Anna Paula Balesdent Barreira

Profa. Brunna Patricia Almeida da Fonseca

Prof. Rogério Martins Amorim

Prof. Carlos Alberto Hussni

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, Paulo Gomes de Oliveira Filho e Maria Elisa E. L. Galvão por todo o apoio durante esses anos, o exemplo de vida que sempre vou seguir.

Às minhas irmãs Juliana e Priscila, eternas amigas e conselheiras. Descobrimo a vida aos poucos, juntas, mesmo se um pouco longe. Sem esquecer minhas lindas sobrinhas, de quem o sorriso ilumina os dias.

Ao “namorado”, Ilan, com quem compartilho sonhos e planos para o futuro.

À minha família avareense, tia e primos, pelos excelentes momentos vividos.

Aos meus amigos feitos pela vida, que são a família que a gente escolhe e compartilha fases juntos.

E não me esquecendo dos animais, daqueles que fazem parte do meu dia-a-dia e daqueles que participaram, mesmo que involuntariamente, desta pesquisa da qual colho os frutos.

Agradecimentos

À minha orientadora, Profa. Dra. Ana Liz Garcia Alves, profissional admirável e pessoa gentil. Peço desculpa aos momentos que quase a enlouqueci, mas antes de tudo agradeço a oportunidade do trabalho. Sua capacidade e dedicação serão sempre um exemplo para mim.

Aos pós graduandos Armando de Mattos Carvalho, Ana Lúcia M. Yamada, Leandro Maia e Natália P. P. Freitas, pela ajuda em todos os momentos, pelo companheirismo, e por compartilhar dúvidas, trabalhos e conversas.

Aos funcionários do Setor de Cirurgia de Grandes Animais, muito gentis e colaboradores. Obrigada pela paciência na rotina.

A Profa. Fernanda C. Landim Alvarenga, por ser minha co-orientadora e ceder seus conhecimentos e o laboratório, de vital importância ao desenvolvimento desta pesquisa.

À Profa. Dra. Renée Laufer Amorim, pela importante cooperação, juntamente com a sua equipe, para a realização da leitura do material.

À CNPq, pela concessão de bolsa de Doutorado.

Não me esquecendo a Deus, a quem agradeço todos os dias por tudo o que me tem conferido.

Enfim, agradeço muito a todos que colaboraram de diferentes formas e, especialmente, ao me acompanharam e torceram sempre por mim.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
RESUMO	
ABSTRACT	
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 AS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS.....	4
2.2 TRATAMENTOS DE LESÕES TENDÍNEAS EM EQUINOS.....	5
2.3 MECANISMO DE AÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO.....	6
2.4 IDENTIFICAÇÃO CELULAR NO TECIDO.....	9
3. OBJETIVO.....	13
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
4.1 EXPERIMENTAÇÃO.....	14
4.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	14
4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	15
4.4 COLETA DE MEDULA ÓSSEA E CULTIVO DE CTM.....	16
4.5 INDUÇÃO DE LESÃO.....	18
4.6 MARCAÇÃO CELULAR COM NANOCRISTAIS.....	19
4.7 IMPLANTE CELULAR.....	20
4.8 BIÓPSIA.....	21
4.9 HISTOPATOLOGIA E MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.....	22
4.10 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR PRÉ E PÓS MARCAÇÃO COM NANOCRISTAIS QTRACKER 655.....	22
4.11 CONTROLES POSITIVO E NEGATIVO DAS CÉLULAS MARCADAS NO TECIDO TENDÍNEO.....	23
5. RESULTADOS.....	24
5.1 COLETA DE MEDULA ÓSSEA E CULTIVO DE CTM.....	24
5.2 INDUÇÃO DE LESÃO.....	25
5.3 MARCAÇÃO CELULAR COM NANOCRISTAIS.....	26
5.4 IMPLANTE CELULAR.....	27
5.5 BIÓPSIA.....	28

5.6 HISTOPATOLÓGICO e MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.....	28
5.7 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR PRÉ E PÓS MARCAÇÃO COM NANOCRISTAIS QTRACKER 655.....	33
5.8 CONTROLES POSITIVO E NEGATIVO DAS CÉLULAS MARCADAS NO TECIDO TENDÍNEO.....	33
6. DISCUSSÃO.....	37
7. CONCLUSÕES.....	49
8. REFERÊNCIAS.....	50
TRABALHO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO.....	58

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Esquema organizacional do delineamento experimental.....	16
FIGURA 2: Coleta de MO em região de quinta esternebra.....	17
FIGURA 3: Kit para marcação celular Qtracker 655 e seus reagentes A (tampa azul) e B (tampa vermelha) (Invitrogen).....	19
FIGURA 4: Botão celular (seta) obtido após cultivo e centrifugação das CTM.	20
FIGURA 5: Lesão visualizada no interior do TFDS no momento da biópsia.....	21
FIGURA 6: Cultivo celular de CTM, com cerca de 20 dias, apresentando confluência de 90% (Aumento 200X).....	24
FIGURA 7: Células tronco mesenquimais ao microscópio óptico e de fluorescência: A) Células tronco mesenquimais observadas sem fluorescência (400X); B) a mesma célula observada com microscópio de fluorescência, mostrando a marcação no interior de seu citoplasma (400X); C) uma maior concentração de CTM sem fluorescência (200X); D) o mesmo campo observado ao microscópio de fluorescência (200X).....	26
FIGURA 8: Ultrassonografia da lesão do TFDS (7 dias) anterior ao implante de células tronco mesenquimais (A) e imediatamente após o implante (B). As seta indica o local da lesão e seu aumento da ecogenicidade após o implante.....	28
FIGURA 9: Histopatológico da lesão aos 14 dias. Observa-se aumento da celularidade, como também perda da organização tecidual (aumentos de 100X e 200X).....	29
FIGURA 10: Membro do grupo controle (GB), em microscopia simples, fluorescência com filtro azul e vermelho (aumento 200X).....	31
FIGURA 11: Membro do grupo tratado apresentando células marcadas com nanocristal Qtracker 655 (pontos vermelhos). Imagens de cima para baixo: coloração HE, microscopia simples, fluorescência filtro azul e fluorescência filtro vermelho. Aumentos de 200X e 400X.....	32
FIGURA 12: Contagem de viabilidade celular em câmara de Neubauer. A célula corada em azul está morta, enquanto as células claras estão viáveis.....	33
FIGURA 13: Tendão sadio observado ao microscópio comum, na fluorescência filtro azul e fluorescência filtro vermelho (200X).....	35

FIGURA 14: Controle positivo. Tendão sadio injetado com CTM marcadas com nanocristal e imediatamente visualizadas em microscopia comum, fluorescência filtro azul e filtro vermelho. As células marcadas são visualizadas como emissões fluorescentes na cor vermelha.....36

LISTA DE TABELAS

TABELA1: Valores do grau de ecogenicidade 1 dia após a indução da lesão, grupos GA e GB.....25

TABELA 2: Número de células tronco mesenquimais (CTM) implantadas por animal.....27

OLIVEIRA, P.G.G. Estudo do nanocristal Qtracker 655 como marcador de células tronco mesenquimais pré e pós implante em tendinites experimentais em equinos. Botucatu, 2011, 90p., tese de doutorado, UNESP, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, São Paulo.

RESUMO

Lesões tendíneas, especialmente do tendão flexor digital superficial dos membros torácicos, são importantes enfermidades que acometem a espécie equina, e apresentam alto índice de recidivas e afastamento da atividade atlética. Os avanços médicos e pesquisas relacionadas têm mostrado crescente interesse na utilização da terapia celular em tratamentos dessas lesões que apresentam uma cicatrização lenta ou ineficaz. Existem dúvidas quanto à persistência e comportamento das células tronco mesenquimais (CTM) implantadas no local da lesão e de sua migração a outros locais inflamados. Sendo assim, este estudo teve como objetivo identificar CTM marcadas com nanocristais antes e após o implante em lesões experimentais do tendão flexor digital superficial (TFDS) de eqüinos, observando a possibilidade de migração das CTM para outro foco de lesão realizado no membro contralateral do animal. Para isso, foram utilizados cinco equinos, submetidos à indução de lesões no TFDS em ambos os membros torácicos e, após sete dias, foram implantadas as CTM autólogas marcadas com nanocristais Qtracker 655 em um dos membros do animal. Sete dias após o implante, foram realizadas biópsias dos tendões, congelados em nitrogênio, sendo posteriormente realizados cortes histológicos para visualização em microscópio de fluorescência. Paralelamente, células marcadas com nanocristal foram mantidas em cultivo por 24 horas e, após este período, avaliou-se a sua viabilidade. Nas lesões que receberam células marcadas, foram visualizados sinais fluorescentes nas amostras, enquanto estes eram ausentes nas lesões dos membros contralaterais. As CTM marcadas e injetadas no tecido tendíneo mantiveram sua fluorescência sete dias após o implante *in vivo*, não sendo observado migração para o membro contralateral. As células mantiveram sua viabilidade após 24 horas de incubação com o marcador Qtracker.

Palavras-chave: célula tronco mesenquimal, Quantum Dots Qtracker 655, tendinite, equino.

OLIVEIRA, P.G.G. Study of nanoparticles Qtracker 655 as an option of labeling mesenchymal stem cells before and after implant in equine induced tendinitis. Botucatu, 2011, 90p., tese de doutorado, UNESP, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, São Paulo.

ABSTRACT

Tendon lesions, especially of the superficial digital flexor tendon (SDFT) on forelimb, are important injuries in equine, because have high reinjury incidence and can cause retirement of athletic activities. Medical researches have shown growing interest on using stem cell therapy in the treatment of lesion with slow or ineffective repair. There are doubts regarding the persistency of the mesenchymal stem cells (MSC) implanted on the lesion site and of its migration to other injury sites. This study aims to identify marked MSC with nanoparticles quantum dots (QD) before and after the implant in equine induced tendinitis and to verify if there is a migration to another injury site on the contralateral. Five equines have a SDFT tendinitis induced on both forelimb and, after seven days, have seeded autologous MSC, marked with quantum dots Qtracker 655 in one of the limbs. Seven days after the implant, biopsies of the tendons were conducted, in which histological cuts were made for visualization in fluorescence microscope. The viability of the cells marked with nanoparticles and kept in cultivation was evaluated after 24 hours of incubation. Fluorescent signs were visualized on samples of the lesions that received marked cells, while they were absent on the lesions of the contralaterals. The marked MSCs kept their fluorescent emission, making it possible to identify them after seven days of *in vivo* implant, not occurring migration to the opposite limb. The cells maintained their viability in cultivation after 24 hours of incubation with the Qtracker marker.

Key words: mesenchymal stem cell, Quantum Dots Qtracker 655, tendinitis, equine.

1. INTRODUÇÃO

Lesões tendíneas e ligamentares são importantes causas de claudicação em equinos atletas, devido à alta frequência e intensidade dos treinamentos e grande esforço físico exercido durante as provas. Dentre as estruturas envolvidas, o tendão flexor digital superficial é a que apresenta a maior incidência de lesões. Estas enfermidades podem provocar o afastamento temporário ou permanente dos animais das pistas, gerando perdas econômicas no setor da equideocultura. As lesões são predominantemente degenerativas, de baixa velocidade de cicatrização e raramente retornam à sua elasticidade e força originais. Devido a esta inferior capacidade de cicatrização, um longo período de reabilitação se faz necessário, além de alto índice de recidivas (WATTS et al., 2011).

Os tratamentos propostos atualmente são de baixa eficácia, e independentemente da diversidade de terapias empregadas, a queda de desempenho dos animais e o risco de recidivas ainda é uma realidade. Desta forma, o principal objetivo das novas terapias envolvendo células tronco e medicina regenerativa tem sido recuperar a funcionalidade do tecido, o que, conseqüentemente, tem encorajado o desenvolvimento de estratégias para melhorar a qualidade de reparação tecidual (GODWIN et al., 2011).

Apesar da melhoria no diagnóstico das lesões, avanços nas técnicas de reabilitação e desenvolvimento de novas terapias com células e materiais biológicos, um tratamento efetivo ainda não teve seus resultados comprovados. Devido à baixa celularidade e à atividade mitótica lenta dos tenócitos, a reparação tendínea intrínseca é principalmente realizada pelas células do endotendão e epitendão, com pequena proliferação dos tenócitos no perímetro da lesão. A reparação extrínseca parece ser influenciada pelos pericitos microvasculares e células associadas aos vasos sanguíneos. A escassez de células apropriadas para a reparação tendínea explicam o longo período de recuperação, formação de um tecido de cicatrização desorganizado e propriedades mecânicas inferiores à original. Estes fatores têm resultado em um grande interesse na terapia celular como tratamento de lesões tendíneas,

visando recuperar a qualidade tendínea e sua regeneração (WATTS et al., 2011)

Experimentos vêm recentemente se concentrando no potencial terapêutico das células tronco (CT), verificando sua possibilidade de aplicação em enfermidades complexas, ou lesões de difícil cicatrização. A célula tronco é um tipo indiferenciado de célula que tem capacidade de se auto-renovar e de se diferenciar, dando origem à células especializadas. Estas células são pluripotentes e possuem capacidade de colonizar todo o organismo ou regenerar segmentos de um tecido lesado (SOUZA et al., 2005). As células tronco são fonte de todos os novos tecidos formados pelos sistemas de reparo e remodelação do organismo, sendo reguladas por sinais químicos e físicos que controlam sua ativação, proliferação, migração, diferenciação e período de sobrevivência (BIANCO et al., 2001). Possuem importante papel no reparo e reconstrução de tecidos lesados, atuando na substituição de células mortas e no restabelecimento da função de tecidos ou órgãos (FILIP et al., 2004).

As células tronco podem ter uma contribuição direta na reparação celular, no caso do tendão lesado, através de sua diferenciação tecido-específica e na produção de matriz extracelular, ou indiretamente, por meio de efeitos tróficos, com a produção de proteínas bioativas, como fatores de crescimento, fatores antiapoptóticos e agentes quimiotáticos (REHMAN et al., 2004). Além destas características, alguns estudos sugerem que as CT possuem efeito antiinflamatório e também imunomoduladores, inibindo a ativação de linfócitos T e B e das células *natural killer* (HERRERO e PÉREZ-SIMON, 2010). Adicionalmente, recrutam CT locais, estimulam crescimento de novos vasos e liberam fatores de crescimento (CARVALHO et al., 2011). No entanto, não se sabe qual destes fatores exercem influência após o implante das CTMs (ALVES et al., 2011).

A habilidade de atração das CT a locais de lesão se deve à inflamação existente no local lesado. A inflamação envolve a produção de um grande número de moléculas, incluindo proteínas que tem como ação a adesão entre as células (exemplo as integrinas). Estas proteínas atuam como sinalizadores, atraindo umas às outras, e as ativa de diversas formas (citocinas), assim como seus receptores. As proteínas envolvidas com o tropismo das CTM ao local

inflamado aparentam ser as mesmas que atraem os linfócitos às regiões lesadas e inflamadas (SATAKE et al., 2003).

Estudos sobre nanotecnologia e tratamentos na biomedicina utilizando células tronco se combinam para promover um melhor entendimento desta nova opção terapêutica *in vivo*. A manutenção celular e sua diferenciação no tecido ao qual as células são implantadas necessitam ser detectadas, e, para isso, desenvolvem-se sistemas de identificação para permitir a compreensão dos mecanismos de atuação e apoptose nos diferentes modelos de lesão tecidual (KAUR e SINGHAL, 2011).

Diversas marcações celulares têm sido estudadas, dentre estas estão disponíveis os pontos quânticos (WU e BRUCHEZ, 2004). Existem dificuldades em se marcar as células a serem transplantadas, assim como avaliar o seu destino *in vivo*, obtendo resultados controversos e de limitações técnicas (OLIVEIRA et al., 2009). Pontos quânticos são formados por nanocristais semicondutores, excitáveis e fotoestáveis, podendo ser estimulados por um único comprimento de onda (HASSAN et al., 2006). Os pontos quânticos são atóxicos às células e sua fluorescência continua ativa por um tempo 100 vezes maior se comparado a corantes orgânicos (MARSH et al., 2007). Os nanocristais provêm luminosidade e fluorescência que podem ser observados por horas em tecidos marcados, ainda podem ser arquivados permanentemente e são capazes de marcar quase todos os tipos de material de interesse biológico (PARAK et al., 2005). A fluorescência do nanocristal pode ser detectada por pelo menos quatro gerações celulares, sendo que algumas células podem permanecer marcadas por até duas semanas (DONALDSON et al., 2004).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 AS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS (CTM)

A engenharia tecidual se baseia na utilização de células, fatores biológicos e biomateriais, individualmente ou associados, com o objetivo de recuperar a estrutura tecidual normal e a sua função (KOCH et al., 2009). A terapia celular se baseia na aplicação de células tronco em um tecido lesado, envolvido por um arcabouço de células íntegras, as quais serão responsáveis por suprimento sanguíneo e mediadores celulares, promovendo um microambiente adequado para a diferenciação e proliferação celular, bem como de sua função.

Células tronco são definidas como células com capacidade de auto-renovação, de proliferação extensiva, e também podem se diferenciar em um ou mais tipos/tecidos celulares, entre elas osteoblastos, adipócitos, condroblastos, tenócitos, mioblastos, e outros (KOCH et al., 2008).

Células fetais, adultas e neonatais são isoladas através da separação da fração mononuclear do tecido de interesse. Utilizando-se meios de cultura apropriados, podem ser identificadas colônias de células aderentes em poucos dias, exibindo morfologia fibroblastóide (MONTEIRO et al., 2010). À medida que os frascos atingem determinada confluência, as células podem ser ressuspensas e divididas em diversos frascos para a expansão do número de células indiferenciadas ou para promover sua diferenciação *in vitro* em uma linhagem específica para o uso terapêutico (KOCH et al., 2008).

Os novos tratamentos alternativos utilizando as células tronco têm como objetivos melhorar a qualidade e função do tecido neoformado, minimizar o tempo de tratamento e os custos, e garantir o retorno mais rápido às atividades normais (OLIVEIRA et al., 2010).

Tanto em humanos como em animais (incluindo a espécie equina) foram desenvolvidas pesquisas envolvendo a utilização de células da fração mononuclear e expandidas em laboratório. O cultivo em laboratório aumenta o número de células mesenquimais, como também permite o seu maior controle; no entanto, existe um aumento nos custos, no tempo para obtenção das

células e um período limitado em seu potencial de indiferenciação, se mantido em cultura por um tempo muito prolongado (KOCH et al., 2009). As CT podem ser injetadas como suspensão celular ou acrescidas de um biomaterial de suporte. Sua aplicação é interessante devido ao procedimento micro-invasivo, de fácil realização, baixo custo, morbidade e tempo de recuperação (KOCH et al., 2009).

A resposta regenerativa considerada ótima *in vivo* pode ser atingida através da combinação de 3 fatores: um tipo de célula capaz de formar uma ótima matriz; um suporte capaz de promover a sobrevivência das células implantadas por meio de proteção mecânica e/ou suporte nutricional; e estímulos anabólicos, geralmente combinando fatores de crescimento e estímulos mecânicos apropriados para que seja promovido uma adequada síntese de matriz extracelular e organização tecidual (BUTLER et al., 2008).

2.2 TRATAMENTOS DE LESÕES TENDÍNEAS EM EQUINOS

Os recentes tratamentos tendo-ligamentares desenvolvidos em equinos com o uso de células tronco mesenquimais (CTM) não tem o objetivo maior de reduzir o tempo de recuperação e cicatrização da lesão, mas sim em melhorar a qualidade do tecido formado. As fontes mais conhecidas e utilizadas para a obtenção das células são medula óssea (MO) e tecido adiposo (TA). O esterno é o local mais comumente utilizado para se realizar a punção de medula óssea, conforme descrito por Smith e colaboradores (2003), no entanto, o número de CTM é baixo (0,01% a 0.001%); o tecido adiposo tem como principal fonte de obtenção a região lateral à base da cauda. Ambos os procedimentos são realizados com o animal em estação, sob leve sedação e anestesia local (TAYLOR e CLEGG, 2011). Vidal e colaboradores (2008) descreveram a ocorrência de certas diferenças quanto ao potencial de diferenciação das CTM provenientes de MO e TA como, por exemplo, a reduzida capacidade de diferenciação osteogênica das células proveniente de TA se comparada com as de MO,

Células tronco mesenquimais têm sido implantadas em lesões tendíneas em animais de laboratório em diversas pesquisas *in vivo*, apresentando

resultados positivos, com melhora em sua estrutura e resistência (BUTLER et al. 2008). A melhora na qualidade do tecido neoformado, com aumento na relação de fibras colágenas I/III também foi descrita por Hankemeier e colaboradores (2005). Em equinos, diversos trabalhos foram desenvolvidos utilizando-se modelo experimental de tendinites induzidas através do uso de colagenase (SCHNABEL et al., 2009; CROVACE et al., 2010) sugerindo que as CTM provenientes de medula óssea promovem uma resposta favorável do tecido de reparação. Existem ainda estudos clínicos que relatam o uso de CTM provenientes de MO no tratamento de tendinites do TFDS de ocorrência natural, e acompanhados durante 2 anos, avaliando as taxas de recidiva, sendo observada um índice significativamente menor deste parâmetro se comparado a tratamentos convencionais (GODWIN et al., 2011).

O implante tem sido realizado no local da lesão, em um número mínimo de 1×10^6 células (PACINI et al., 2007). Outros estudos preconizam números maiores como Smith e colaboradores (2003) que utilizaram 10×10^6 células, até 5×10^7 células por lesão (GODWIN et al., 2011), geralmente após a sua visualização e localização através de exame ultra-sonográfico (BARREIRA et al., 2008).

2.3 MECANISMO DE AÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO

As células tronco mesenquimais residem em muitos, se não todos, tecidos e órgãos. Um sistema de regulação complexo é necessário para que estas mantenham um estado indiferenciado, se proliferem em um grau adequado às necessidades do organismo e mantenham um estado intrínseco de auto-renovação. Este sistema regulatório é espacialmente organizado que é denominado de “nicho”. Os nichos promovem localização física, mediado pelo contato entre células, e fatores de crescimento para que se mantenha a população de CT e controle de sua atividade proliferativa (STEWART e STEWART, 2011).

Alguns termos são importantes para compreensão da dinâmica das células tronco nos tecidos ao qual irão se integrar. O primeiro deles é *homing*, o qual descreve migração das células ou a observação de que as células têm

preferência, ou são atraídas, por um determinado tecido após injeção intravenosa ou aplicação local (*in situ*). A fixação, ou *engraftment*, que descreve a habilidade da célula em se incorporar ao tecido ou órgão sem necessariamente ter uma função. O termo “nicho” se refere ao local ou ambiente que está ao redor da célula, regulador de suas funções, definido por diversos fatores reguladores ainda não completamente conhecidos, como efeitos parácrinos e autócrinos que determinam a sua proliferação ou diferenciação (KOCH et al., 2008).

O processo de *homing*, ou aporte, dos leucócitos a locais específicos de inflamação em resposta a um estímulo inflamatório é um processo que envolve citocinas, integrinas e outras moléculas de adesão. Células tronco hematopoiéticas também são recrutadas dos vasos sanguíneos para os tecidos em um processo semelhante aos leucócitos. As CTM são recrutadas seletivamente aos tecidos lesados supostamente utilizando-se de um mecanismo semelhante, embora utilizando um conjunto diferente de moléculas de adesão (FOX et al., 2007).

Inicialmente, o uso de CTM no tratamento de lesões músculo-esqueléticas se baseava unicamente na sua habilidade de diferenciação em um tipo celular apropriado e, desta forma, promover diretamente a regeneração do tecido danificado (CAPLAN, 2005). Esta expectativa está sendo desacreditada pois, se *in vitro*, as células podem se diferenciar em linhagens osteogênicas, condrogênicas e outras, elas não possuem a mesma complexidade tecidual necessária para reproduzir o ambiente adequado para a diferenciação celular. Claramente, a evidência da diferenciação *in vitro* não é uma garantia da boa performance *in vivo* (STEWART e STEWART, 2011). Acreditando que as CTMs não tem responsabilidade direta sobre a reparação/regeneração do tecido musculoesquelético, os efeitos parácrinos destas células vêm sendo reconhecidos. As CTMs secretam um conjunto de citocinas, fatores de crescimento e proteínas de ação imunomodulatória. Por exemplo, quando administradas em músculo de áreas infartadas, promovem neovascularização através de estímulos à secreção de VEGF pelos músculos estriados do local de injeção (SHABBI et al., 2009). A redução dos efeitos inflamatórios é realizado por CTM ativadas que secretam citocinas, reduzindo a proliferação de linfócitos T, como também a ativação da expressão de

antígenos e secreção de citocinas inflamatórias (ZHENG et al., 2008). Em resumo, atualmente existem evidências de que as CTMs secretam fatores que promovem a angiogênese, protegem de sofrer apoptose células locais comprometidas e recrutam e estimulam células tronco residentes, ao mesmo tempo em que inibem a inflamação e reduzem formação de fibrose (STEWART e STEWART, 2011).

O tempo ideal para o tratamento, a dose de células a ser administrada e a via de administração permanecem ainda em discussão, seja para a espécie animal ou tipo de lesão (KOCH et al., 2009). As CTM podem ser aplicadas *in situ* (no local da lesão), ou através de infusão intravenosa. Um inconveniente para a aplicação venosa é a necessidade de grande quantidade de células por aplicação, visto que muitas se distribuem para locais distantes do foco da lesão (MONTEIRO et al., 2010). Já a aplicação local aumenta o número de células no local de lesão, e é esta via de aplicação que vem sendo utilizada na clínica de equinos.

As CTM expressam um grande número de moléculas bioativas como as moléculas de adesão, as proteínas de matriz extracelular, as citocinas e os receptores de crescimento, permitindo interações com as demais células. Essas moléculas atuam modulando a resposta inflamatória, angiogênese e mitose das células envolvidas no processo de reparação tecidual. Assim, as CTM secretam uma grande variedade de citocinas, além de expressar receptores para citocinas e fatores de crescimento. Desta forma, as CTM interagem com as células residentes (nicho) e podem induzi-las, por mecanismo parácrino, a se diferenciar em linhagens celulares distintas, de acordo com a sinalização. Quanto mais agudo o processo patológico, ou quanto mais vascularizada a região afetada, mais intensa é a sinalização do nicho e mais efetiva será a resposta das CTM (MONTEIRO et al., 2010).

De maneira geral, as moléculas bioativas secretadas pelas CTM exercem efeitos tróficos no tecido adjacente, acarretando: (a) efeito antiapoptóticos nas células tecido-específico, (b) efeitos imunomodulatórios sobre as células do sistema imune, (c) aumento da angiogênese, e (d) quimiotaxia para outras células jovens comprometidas com o processo de reparação. Assim, pode ocorrer redução da resposta inflamatória inicial, restabelecimento do suprimento vascular e reparação adequada do tecido,

dependendo da extensão e gravidade dos danos tissulares (MONTEIRO et al., 2010).

2.4 IDENTIFICAÇÃO CELULAR NO TECIDO

Para investigar as células e os processos celulares, é muito importante visibilizar as estruturas envolvidas. As células são quase transparentes à luz microscópica individual e, geralmente, não há possibilidade de observação direta dos compartimentos moleculares (MICHALET et al., 2005). A busca por métodos fluorescentes capazes de detectar cada vez menores quantidades de biomoléculas sofreu avanços nos últimos anos (GWINN & VALLYATHAN, 2006). No entanto, foi com o advento da nanotecnologia que as perspectivas para a utilização de nanopartículas em estudos que envolvem novas terapias, marcação molecular e métodos de detecção óptica, desencadearam uma revolução molecular (BORM, 2006). A utilização de marcadores fluorescentes só ocorre porque há envolvimento e interação do marcador com a membrana celular devido a sua permeabilidade, ocorrendo endocitose e quimiotaxia, e não provoca efeitos deletérios na fisiologia normal endocítica (AZZAZY et al., 2006), não sendo tóxicos às células (MARSH et al., 2007).

Os nanocristais podem ser observados utilizando qualquer microscopia fluorescente, de epifluorescência, confocal e multifocal. Quando colocados sob uma fonte de luz, os pontos quânticos brilham como sinais de neón e seu brilho dura até 48 horas (BORM, 2006). A fluorescência do nanocristal pode ser detectada por pelo menos quatro gerações celulares, sendo que algumas células podem permanecer marcadas por até duas semanas (DONALDSON et al., 2007). A cor emitida pelos pontos quânticos pode ser alterada controlando-se o seu tamanho. Os pontos pequenos emitem luz azul, verde ou amarela e pontos maiores brilham nas cores laranja, vermelha ou cinza (SIMBERG et al., 2007).

Recentemente, pesquisadores estudaram a possibilidade de acompanhar a migração celular embrionária ou adulta a partir da fluorescência refletida pelos nanocristais de suas células descendentes, depois de implantado em um organismo adulto (HARISINGHANI et al., 2007). Uma das maiores dificuldades nessa área é a marcação das células previamente ao

transplante, e, estudos anteriores após o transplante sobre o destino *in vivo* das células são controversos e difíceis de aplicar.

O potencial regenerativo das células tronco será realmente eficaz a partir do momento em que houver um aporte definitivo das células no local desejado (FOX et al., 2007). Formas de identificar *in vivo* e *postmortem* (ou em biópsias) as células administradas são ferramentas cruciais para responder a diversas questões (KOCH et al., 2008). Muitos pesquisadores utilizam-se de técnicas de imunofluorescência ou imunohistoquímica para identificar os nichos das CTM (JONES e MCGONAGLE, 2007).

O rastreamento das células pode ser feito com a marcação do núcleo com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). No entanto, o DAPI fica livre no micro-ambiente hospedeiro após a morte de células transplantadas, e é ativamente captada pelas células residentes neste local. Este evento, que ocorre *in vivo*, demonstra uma importante limitação de experimentos que utilizam tais corantes como marcadores, já que células normalmente residentes no tecido podem se tornar marcadas e sendo assim, confundidas com células transplantadas, o que caracterizaria um falso positivo (COSTA, 2009).

Uma das possíveis técnicas é a de marcação das células através da infusão de um plasmídeo pCAG-EGFP-1 através de eletroporação (GUEST et al., 2008), injetados em lesões do tendão flexor digital superficial e avaliados após 10 e 34 dias de implante, via imunohistoquímica anti-GFP. Nos resultados preliminares, um grande número de células marcadas foram identificadas no interior da lesão, como também no tecido adjacente. O GFP é uma proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein*), proveniente de um adenovírus, que infecta as células mesenquimais (incubadas por 24 horas), e pode ser visualizado não só pela técnica descrita acima como também através de microscopia de fluorescência (SATAKE et al., 2003). Outro trabalho descreve o GFP como uma proteína 27-kD, originalmente descoberta na água-viva *Aequorea Victoria*. O GFP é, teoricamente, uma proteína que não provoca rejeição. Segundo Oshima e colaboradores (2005), a sua fluorescência pode ser mensurada diretamente por microscopia de fluorescência e/ou citometria de fluxo, sem necessitar de uma marcação por anticorpo ou outra manipulação celular. A presença deste marcador também pode ser identificado no tecido através de PCR (DEVINE et al., 2003).

Em modelos experimentais com ratos, existe a possibilidade de utilização de quimeras, animais transgênicos nos quais todas as suas células transmitem sinais fluorescentes GFP+, e células destes animais são implantadas de forma alogênica após a coleta de MO (TOMIYAMA et al., 2008). Mas, apesar de diversos trabalhos fazerem uso da marcação celular com esta proteína verde fluorescente, trabalhos desenvolvidos para reparação de lesões em miocárdio não se utilizam desta tecnologia devido à intensa imunofluorescência típica dos cardiomiócitos (OLIVEIRA et al., 2009).

Ferramentas novas de diagnóstico celular incluem pontos quânticos (QDs), que são nanocristais semicondutores caracterizados por alta fosfoestabilidade e excitação de um único comprimento de onda. Os QDs vem sendo utilizados com sucesso em marcações *in vitro* e identificação *in vivo* das CT. A interiorização da fluorescência é feita passivamente mediada por endocitose no citoplasma das células. Nanocristais fluorescentes podem ser localizados por pelo menos quatro gerações celulares, e algumas células permanecem marcadas por até duas semanas. Células tronco marcadas com nanocristais fluorescentes Q-tracker foram úteis na identificação de células implantadas em defeitos ósseos sete dias após o tratamento (OLIVEIRA et al., 2010). *Quantum trackers* são microcápsulas que liberam nanocristais fluorescentes chamados *quantum dots* (Qdots) no citoplasma de células vivas usando um peptídeo ligante específico e deve ser incubado tempo suficiente para que ocorra a sua entrada na célula (40 a 60 minutos) (OLIVEIRA et al., 2009).

Uma vez dentro das células vivas, estes nanocristais emitem uma fluorescência intensa e estável que pode ser rastreada durante várias gerações, mas não são transferidas para populações de células adjacentes (COSTA, 2009). O QD só pode ser incluído dentro das células através de um peptídeo, e não pode ser transferido de uma célula para outra. A marcação não interfere na viabilidade, capacidade proliferativa e diferenciação celular. As lesões oculares tratadas com CTM por Costa (2009) sugeriram que as células transplantadas possuem capacidade de migração em direção ao tecido lesado (trofismo), e são capazes de se incorporar neste tecido, podendo ser visualizadas após um período de 24 horas a 8 semanas (HOFRNANN et al, 2005). A identificação das células marcadas é simples, e realizada através do

corte de lâminas do tecido alvo congelado e leitura em microscópio de fluorescência.

3. OBJETIVO E JUSTIFICATIVA

Os efeitos dos nanocristais sobre a viabilidade celular vem ganhando interesse devido aos avanços obtidos nos campos da farmacologia e biomedicina. Desta forma, o potencial uso destes nanocristais como marcadores celulares tem levantado questões sobre seu possível potencial citotóxico.

Dentro deste contexto, em que se estuda a dinâmica celular dentro do tecido alvo, a possibilidade de marcação das células e sua visualização após o implante celular, a presente pesquisa tem como objetivos:

- Avaliar a ocorrência de marcação das CTMs utilizando o nanocristal Qtracker 655, bem como sua viabilidade celular após a marcação imediata e 24 horas depois;

- Verificar a possibilidade de observação das células tronco marcadas no interior da lesão tendínea do TFDS sete dias após o implante e a ocorrência ou não de migração celular para o TFDS do membro contralateral do animal, também lesado.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 EXPERIMENTAÇÃO

O experimento foi desenvolvido no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), UNESP, Campus de Botucatu (Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária), no Laboratório LANÇA (Laboratório de Reprodução e Terapia Celular Avançada, FMVZ, Unesp Campus de Botucatu) e no Centro Equestre Equivila. Aprovada pela Câmara de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Botucatu, sob protocolo número 213/2008.

4.2 ANIMAIS

Foram utilizados cinco equinos com idade entre dois e cinco anos, de ambos os sexos, da raça Mangalarga, clinicamente hígidos, sem alterações no sistema locomotor. A confirmação do estado de higidez para a inclusão no grupo experimental foi realizada por meio dos exames físicos (mensuração de parâmetros vitais e exame do sistema locomotor), laboratoriais (hematimetria, leucometria, perfil bioquímico das funções hepática e renal) e ultrassonográficos (avaliação das estruturas tendíneas e ligamentares flexoras). Durante todo o experimento os cavalos foram alimentados com feno de capim “*coast-cross*”, com água “*ad libitum*” e suplementados com ração comercial para equinos¹ e composto vitamínico mineral². Receberam vermífugo com composto comercial a base de Ivermectina³ a cada três meses.

¹ Ração Triumph Passeio – Socil, Brasil

² Sal para equinos Manafós – Connan, Brasil

³ Ivermectina - Eqvalan, pasta - Merial, Brasil

4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

A indução da lesão experimental foi estabelecida como tempo zero do experimento (D0). Todos os membros torácicos dos cinco animais foram submetidos à da injeção intratendínea de 1 mL de colagenase tipo 1 (2,5mg/mL)⁴ no tendão flexor digital superficial (TFDS) para a indução da tendinite

Os membros torácicos dos animais foram distribuídos em dois grupos de cinco membros cada (GA e GB) escolhidos aleatoriamente, e os tendões lesados foram tratados conforme os grupos: GA - membros tratados e GB - membros controle. No 7º dia do experimento (D7), o GA recebeu o implante das células tronco mesenquimais marcadas com nanocristal Qtracker 655⁵. Todos os membros (GA e GB) foram submetidos à biópsia no 14º dia do experimento (D14), retirando-se um fragmento de 1 cm² da área lesada do TFDS, para observação do fragmento em microscopia de fluorescência.

Grupo A (GA) – Membro Tratado: Constituído por cinco membros torácicos que receberam injeção de colagenase nos tendões flexores digitais superficiais em D0. Sete dias após a indução da lesão (D7), receberam o implante intralesional de células tronco mesenquimais provenientes da medula óssea, previamente cultivadas e marcadas com o nanocristal Qtracker 655. Os animais do GA foram submetidos à biópsia ao final do experimento (D14) para coleta de amostras tendíneas.

Grupo B (GB) – Membro Controle: Constituído por cinco membros torácicos, sendo estes contralaterais ao grupo tratado, que receberam injeção de colagenase nos tendões flexores digitais superficiais em D0. Este grupo não recebeu qualquer tipo de tratamento intralesional em D7. Os animais do GB foram submetidos à biópsia ao final do experimento (D14) para coleta de amostras tendíneas.

⁴ Sigma-Aldrich C-0130

⁵ Qtracker® 655 Cell Labeling Kit - Invitrogen

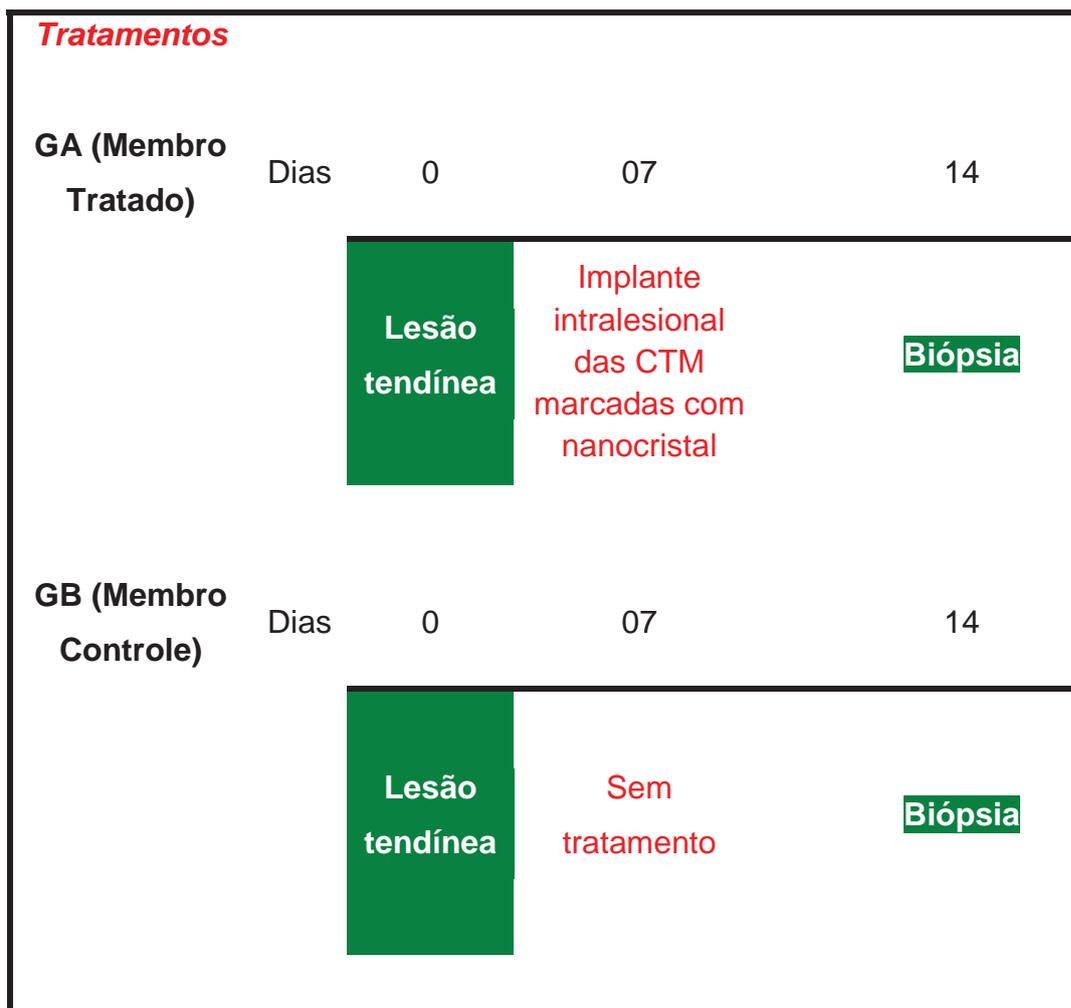


FIGURA 1: Esquema organizacional do delineamento experimental.

4.4 COLETA DE MEDULA ÓSSEA E CULTIVO DE CTM

Em um período de quatro semanas antes da indução de lesão, os animais foram submetidos à punção da medula óssea na região da quinta esternebra para coleta do sangue medular e posterior cultivo das células tronco mesenquimais em laboratório. Esse período anterior a D0 foi necessário para que o tempo de cultivo fosse sincronizado com o tempo de tratamento em D7. Para tal, no local situado na região da quinta esternebra, foi realizada a tricotomia e antissepsia para a punção medula óssea (Figura 2). Realizou-se a anestesia local infiltrativa com lidocaína sem vasoconstritor⁶ a 2% e sedação

⁶ Xylestesin 2%, Cloridrato de lidocaína Cristália Prod. Químicos e Farmacêuticos Ltda, SP - Brasil

dos animais com xilazina⁷ a 10%, 0,5 mg/kg. Com a agulha do tipo Komiyashiki posicionada no interior da medula, foram utilizadas duas seringas de 20 mL, cada uma contendo 1 mL de heparina 5% e 2 mL de solução salina tamponada (PBS), para a punção medular. Foi estabelecido um volume final total de 35 a 40 mL na coleta do sangue medular por animal. Este material foi levado ao laboratório para separação da fração mononuclear e posterior cultivo de células tronco mesenquimais.

Após filtragem do material obtido na coleta em equipo de transfusão, se obteve a fração mononuclear através da separação por gradiente de densidade, com o uso de Histopaque® 1077⁸. A fração mononuclear separada com o auxílio de pipetas e transferida para placas de cultura de 25cm², permanecendo a 37⁰ C em estufa a 5% de CO₂, em ambiente estéril, sendo manipulada apenas em capela de fluxo laminar. O meio (DMEM-Knockout 10% de soro fetal bovino) foi substituído a cada 48 horas e, havendo confluência de 80% da placa era realizada a tripsinização (passagem), obtenção e lavagem do “*pellet*” celular com PBS para posterior utilização. O cultivo foi mantido até a primeira passagem, de maneira a atingir o dia e ser realizado o tratamento do GA.



FIGURA 2: Coleta de MO em região de quinta esternbra.

⁷ Xilamax, Xylazine HCl Vetoquinol N-A. Inc. George Lavaltrie, Canadá.

⁸ Histopaque® 1077 Sigma-Aldrich.

4.5 INDUÇÃO DE LESÃO

A administração de colagenase foi considerada como o dia 0 do experimento (D0). Todos os cinco animais foram submetidos à indução de lesão nos tendões flexores digitais superficiais em ambos os membros torácicos, na região de terço médio do metacarpo. A lesão foi induzida através da administração de 1 mL de colagenase⁹ na concentração de 2,5mg/mL. Para tal procedimento os animais foram contidos em tronco e sedados com xilazina 10% (1,1mg/kg) via intravenosa. Foi igualmente realizada a tricotomia, antissepsia da região média metacarpiana e anestesia local infiltrativa com lidocaína sem vasoconstritor a 2%. Para a administração da colagenase foi utilizada uma agulha hipodérmica 30 X 0,80mm, posicionada no local desejado, no interior do TFDS, guiado por ultrassom¹⁰. Uma seringa de 3 mL, contendo 1 mL da solução de colagenase, foi então acoplada à agulha e o líquido foi injetado. Após a indução, os animais foram tratados com fenilbutazona¹¹, 2,2mg/kg, IV, uma vez ao dia durante sete dias. O desenvolvimento da lesão foi acompanhada através de exames físicos diários realizados nos primeiros sete dias e exames ultrassonográfico em D7 e D14. Os exames físicos (de D0 a D7) foram constituídos de inspeção local, palpação das estruturas tendíneas, verificação de sinais de inflamação e exame de claudicação de todos os animais. O exame ultrassonográfico em D7 foi realizado no momento do implante das CTM no GA, e no mesmo momento no GB. Avaliou-se a ecogenicidade da lesão, graduada de 0 a 4, da seguinte forma (GENOVESE et al.,1986):

0 - padrão normal (ecóico)

1 - queda de 25% do padrão ecóico (predominantemente ecóico)

2 - queda de 50% do padrão ecóico

3 - queda de 75% do padrão ecóico (predominantemente anecóico)

⁹ Colagenase Tipo 1- Sigma-Aldrich C-0130

¹⁰ ALOKA 900

¹¹ Equipalazone Injetável, Fenilbutazona MARCOLAB, Indústria Farmacêutica Vitalfarma Ltda, Minas Gerais, Brasil.

4 – queda de 100% do padrão ecóico (totalmente anecóico)

O exame ultrassonográfico em D14 foi realizado momentos antes à realização das biópsias para GA e GB, definindo-se melhor porção do tendão a ser biopsiada.

4.6 MARCAÇÃO CELULAR COM NANOCRISTAIS

Transcorridos sete dias após a indução da lesão, as células previamente cultivadas foram incubadas com nanomarcadores cristais Qtracker 655 (Figura 3). Para isto foi seguido o protocolo do fabricante para células em suspensão. Desta forma, para obtermos uma dosagem de 10 nM de Qdots, acrescentou-se 1 microlitro da solução A a 1 microlitro da solução B para cada um milhão de células a serem marcadas. A solução resultante, após 5 minutos a temperatura ambiente (25°C), foi acrescida de 200 microlitros de meio DMEM e então colocada 30 segundos no vórtex, para agitação e homogeneização dos componentes. Esta solução foi depositada sobre o *pellet* celular previamente obtido após o cultivo celular descrito no item 4.4; e levado para a estufa a 37°C por um período de 45 a 60 minutos, sempre protegido da luminosidade.

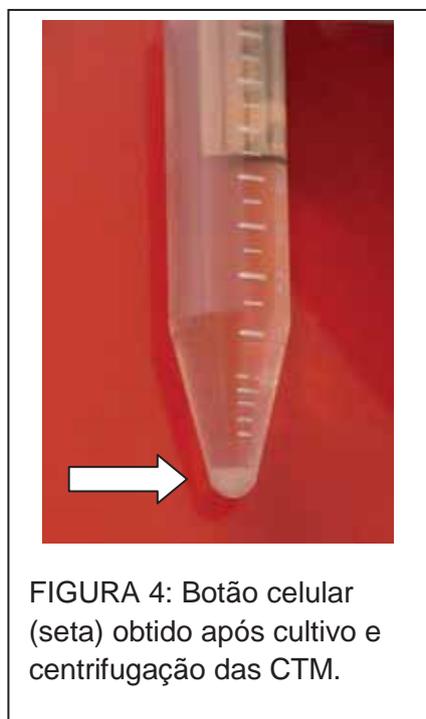
As células foram lavadas por duas vezes em meio DMEM, e parte destas células foram depositadas em câmara de Neubauer, sendo levadas ao microscópio de fluorescência, confirmando a sua adequada marcação.



FIGURA 3: Kit para marcação celular Qtracker 655 e seus reagentes A (tampa azul) e B (tampa vermelha) (Invitrogen).

4.7 IMPLANTE CELULAR AUTÓLOGO

O implante das células marcadas no GA foi realizado sete dias após a indução da lesão (D7). Para tal procedimento os animais foram contidos em tronco e sedados com xilazina 10% (1,1mg/kg) via intravenosa. Foi realizada a tricotomia, antissepsia da região média metacarpiana e anestesia local infiltrativa com lidocaína sem vasoconstritor a 2%. As células marcadas foram implantadas em um dos membros de cada animal, acrescidas de 0,5 mL de PBS, constituindo o GA (Figura 4). O membro contralateral permaneceu como controle, sem receber nenhum tipo de tratamento, constituindo o GB. Para a administração das células foi utilizada uma agulha hipodérmica 30 X 0,80mm, posicionada no local desejado, no centro da lesão no TFDS, guiado pelo ultrassom. Uma seringa de 3 mL, contendo a associação das células marcadas e PBS, foi então acoplada à agulha e o material foi injetado. Os membros que foram definidos com tratado (GA) ou controle (GB) foram escolhidos aleatoriamente no momento do tratamento.



4.8 BIÓPSIA

Transcorridos 14 dias após a indução da lesão (D14), foram realizadas as biópsias dos TFDS de ambos os membros torácicos de todos os animais (GA e GB). Para isso os animais foram submetidos à anestesia geral intravenosa através da administração do triplo gotejamento (*triple drip*), que consiste na infusão contínua de uma solução contendo éter-gliceril-guaiacol, xilazina 10% e ketamina. Igualmente foi realizado o bloqueio anestésico dos nervos palmares medial e lateral e nervos metacárpicos palmares para complementação da analgesia. Para a coleta das amostras uma incisão de aproximadamente três centímetros de extensão foi realizada no eixo longitudinal da região palmar do terço médio metacarpiano. O subcutâneo foi divulsionado até a observação da região da lesão no TFDS (Figura 5). O TFDS foi isolado e por seguinte, uma amostra de aproximadamente 1 cm² foi retirada exatamente no local onde foi padronizada a lesão por meio do ultrassom e da observação visual no TFDS. Essa amostra foi imediatamente congelada em nitrogênio líquido para posterior processamento.



Figura 5: Lesão visualizada no TFDS no momento da biópsia.

4.9 HISTOPATOLÓGICO E MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Os fragmentos obtidos nas biópsias em D14 foram congelados em nitrogênio líquido, onde permaneceram por um período de 1 mês. O processamento das amostras foi realizado no Laboratório de Patologia Clínica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Campus de Botucatu. Para a realização das análises histopatológicas, cortes de sete micrômetros de espessura foram obtidos em criostato das amostras congeladas e distendidos em lâminas histológicas, em um total de 5 cortes por lâmina, três lâminas de cada animal. Esses cortes foram corados pelos métodos de Hematoxilina-Eosina (H&E) e analisados por microscopia óptica, composto por uma lâmina com cinco cortes por animal. Foi também realizada a avaliação direta, sem nenhum tipo de coloração, em microscópio de fluorescência¹², nos filtros vermelho e azul. As lâminas após o corte foram mantidas em temperatura de -20°C e reavaliadas após 24 horas.

4.10 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR PRÉ E PÓS MARCAÇÃO COM NANOCRISTAIS QTRACKER 655

Foram extraídos 100µL do cultivo celular e colocados em frascos de hemólise para a contagem celular em microscópio comum em Câmara de Neubauer. Foi avaliada a viabilidade celular por exclusão do Azul de Trypan. Para isso, um volume igual de Azul de Trypan foi adicionado à amostra a ser contada (100 µL da amostra : 100 µL de Azul de Trypan). As células viáveis permaneciam incolores, e as células coradas em azul foram quantificadas como inviáveis, devido ao rompimento da sua membrana celular e penetração do corante em seu interior. O número total de células coradas em azul e as não coradas foram contadas em cada um dos quadrantes, e feita, desta forma, o percentual de células viáveis. A média dos dois quadrantes foi estabelecida como a viabilidade das células da amostra.

¹² Leica LMD 7000

Após contagem das células viáveis em cultivo, foi realizada a marcação das CTM com o nanocristal Qtracker 655, conforme protocolo apresentado no item 4.6, e realizada nova avaliação da viabilidade celular após a marcação.

Parte das células que foram cultivadas e marcadas com nanocristal foi mantida em cultivo, sendo realizada contagem da viabilidade celular não apenas imediatamente após a marcação, como também 24 horas após este novo período de cultivo. Estes passos foram feitos de maneira a avaliar a toxicidade do marcador nanocristal Qtracker às células tronco mesenquimais quando marcadas e também quando mantidas em cultivo por um período.

4.11 CONTROLES POSITIVO E NEGATIVO DAS CÉLULAS MARCADAS NO TECIDO TENDÍNEO

Paralelamente ao implante dos animais, duas amostras de tendão sadio, provenientes de um animal que veio a óbito por outras causas, foram utilizadas como controle negativo e positivo. Este controle foi necessário para que se compreendesse a emissão de luz típica do tendão sadio (já que este é um tecido que possui auto-fluorescência), como também da luz emitida pelas células marcadas com nanocristal quando injetadas neste tecido, de forma que não houvesse um falso positivo nas amostras do tendão lesado avaliadas.

Desta forma, o controle negativo foi simplesmente uma amostra do tendão normal, congelado em nitrogênio, e cortado em criostato para visualização em microscopia de fluorescência; Na outra amostra de tendão sadio, foi feita uma aplicação de células tronco mesenquimais marcadas com nanocristal Qtracker 655 e, de forma semelhante, a amostra foi congelada, seguida da realização de cortes histológicos para a visualização em microscópio de fluorescência.

5. RESULTADOS

5.1 COLETA DE MEDULA ÓSSEA E CULTIVO DAS CTM

A coleta de medula óssea não apresentou nenhum tipo de dificuldade, seguindo o protocolo anteriormente descrito, resultando em 35 a 40 ml de volume total coletado em cada animal. Após centrifugação e separação por gradiente de densidade com uso de histopaque® 1077¹³, a fração mononuclear obtida foi colocada em duas placas de cultura (garrafas) de 25 cm². Em duas a três semanas, optou-se por fazer tripsinização e primeira passagem dos cultivos de todos os animais para aumentar o número de células tronco mesenquimais para o implante (Figura 6). Desta forma, foram cultivadas quatro placas de 25 cm² por animal, cada uma contendo cerca de 700 a 800 mil células, exceto pelo animal número 4, quando foram utilizadas apenas duas placas, devido à contaminação apresentada nas outras duas, que foram descartadas, e no animal de número 5, que mesmo em quatro garrafas de cultivo, estas apresentaram densidade mais baixa, ao redor de 400 mil células por garrafa. Após mais uma semana, todos os cultivos foram utilizados para marcação celular e implante, totalizando um tempo máximo de cultivo celular de quatro semanas.



¹³ Histopaque 1077 (densidade 1,077g/dL) - Sigma-Aldrich

5.2 INDUÇÃO DE LESÃO

As lesões foram induzidas no mesmo momento em que se realizou a primeira passagem do cultivo celular, a fim de se padronizar a lesão para o momento de injeção das CTMs. Estas foram realizadas com auxílio da ultrassonografia (US), de forma a se localizarem na região centro-palmar do TFDS, já que os animais seriam submetidos ao procedimento cirúrgico para a coleta de material da biópsia, e não seriam submetidos à eutanásia, reduzindo a chance de ruptura tendínea no período pós-cirúrgico, resultante da fragilidade tecidual ocasionada pela retirada do fragmento da biópsia.

Os cinco animais apresentaram aumento de volume e sensibilidade local todos os dias até D7. A claudicação e aumento de temperatura local permaneceram até o D3 ou D4, não sendo observados após este período.

Aos sete dias após a indução da lesão, estas foram visíveis à avaliação ultrassonográfica, sendo que todos os animais apresentaram perda de ecogenicidade (grau 2) (Tabela 1). No entanto, não houve uma definição de seus bordos, sendo estes irregulares, e todas possuíram formato circular ou elípticas.

ANIMAL	ECOGENICIDADE	
	GA	GB
1	3	3
2	3	2
3	2	3
4	1	2
5	2	1
Média	2,2	2,2

TABELA 1: Valores do grau de ecogenicidade 1 dia após a indução da lesão, grupos GA e GB.

5.3 MARCAÇÃO DAS CTM COM NANOCRISTAIS

A marcação das CTMs com nanocristais foi realizada imediatamente antes à aplicação das células nas lesões tendíneas. O protocolo se mostrou adequado, e após o período de 45 a 60 minutos necessário à entrada do marcador no citoplasma das células, estas, já em suspensão, foram levadas ao microscópio de fluorescência, confirmando a sua marcação (Figura 7). Os nanocristais adentram as células de forma passiva, e após o período estabilizado, grande parte das células estava marcada.

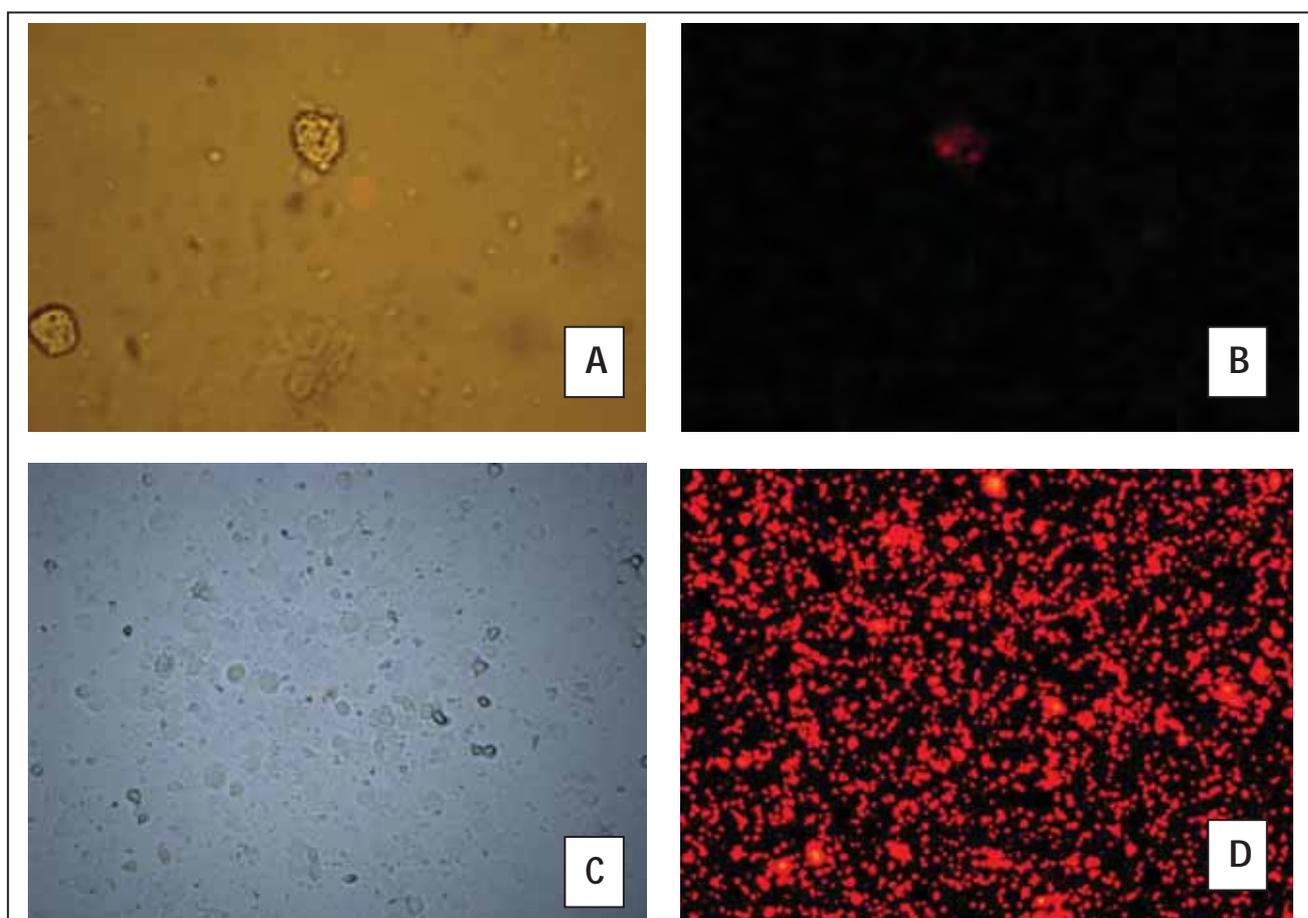


FIGURA 7: Células tronco mesenquimais ao microscópio óptico e de fluorescência: A) Células tronco mesenquimais observadas sem fluorescência (400X); B) a mesma célula observada com microscópio de fluorescência, mostrando a marcação no interior de seu citoplasma (400X); C) uma maior concentração de CTM sem fluorescência (200X); D) o mesmo campo observado ao microscópio de fluorescência (200X).

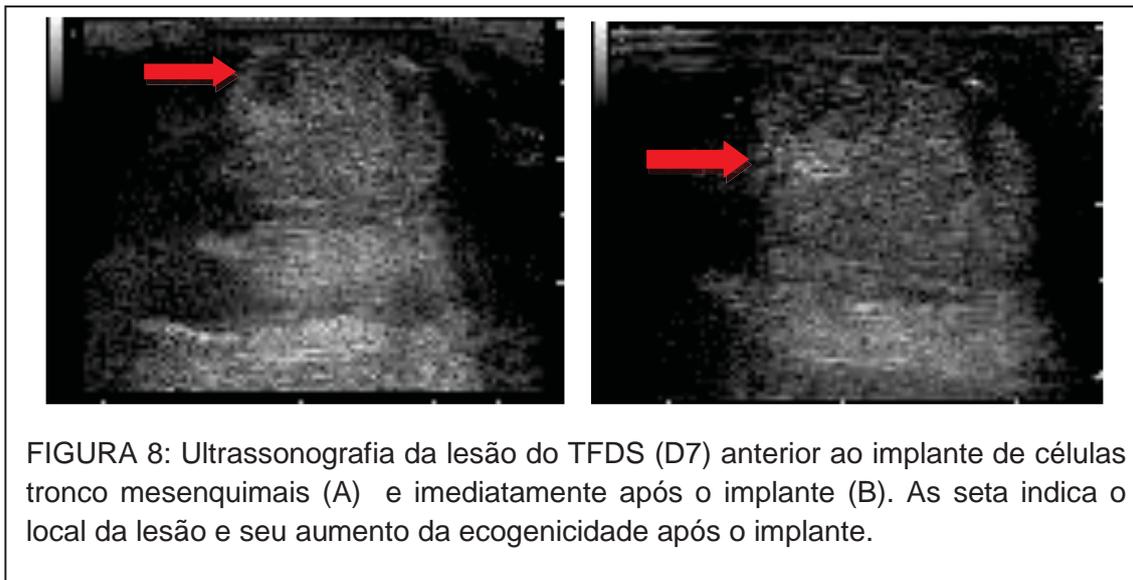
5.4 IMPLANTE CELULAR AUTÓLOGO

O implante celular foi realizado sete dias após a indução de lesão (D7), guiado por US. As células foram injetadas exatamente no centro da lesão tendínea. Durante a aplicação do tratamento, acompanhado pelo exame ultrassonográfico, foi possível a visualização das células, quando injetadas, pelo aumento da ecogenicidade local, devido à alta concentração celular (Figura 8). O volume total injetado variou entre $1,5 \times 10^6$ a $2,5 \times 10^6$ células por animal (Tabela 2), sendo acrescidos 0,5 mL de PBS. Não foram observados sinais de inflamação após o implante celular.

ANIMAL	NÚMERO DE CTM IMPLANTADAS
1	$2,5 \times 10^6$
2	$2,4 \times 10^6$
3	$2,4 \times 10^6$
4	$2,0 \times 10^6$
5	$1,5 \times 10^6$

TABELA 2: Número de células tronco mesenquimais (CTM) implantadas por animal.

O número de célula variou entre os animais devido à diferença de crescimento nas diferentes culturas, especialmente por contaminação ocorrida no animal de número 4, com menor número de células injetadas, o que dificultou a identificação celular no tecido proveniente da biópsia. Desta forma, mesmo não tendo o objetivo de tratar a lesão, quanto maior for o número de células marcadas injetadas, maiores são as chances de sua identificação na microscopia de fluorescência.



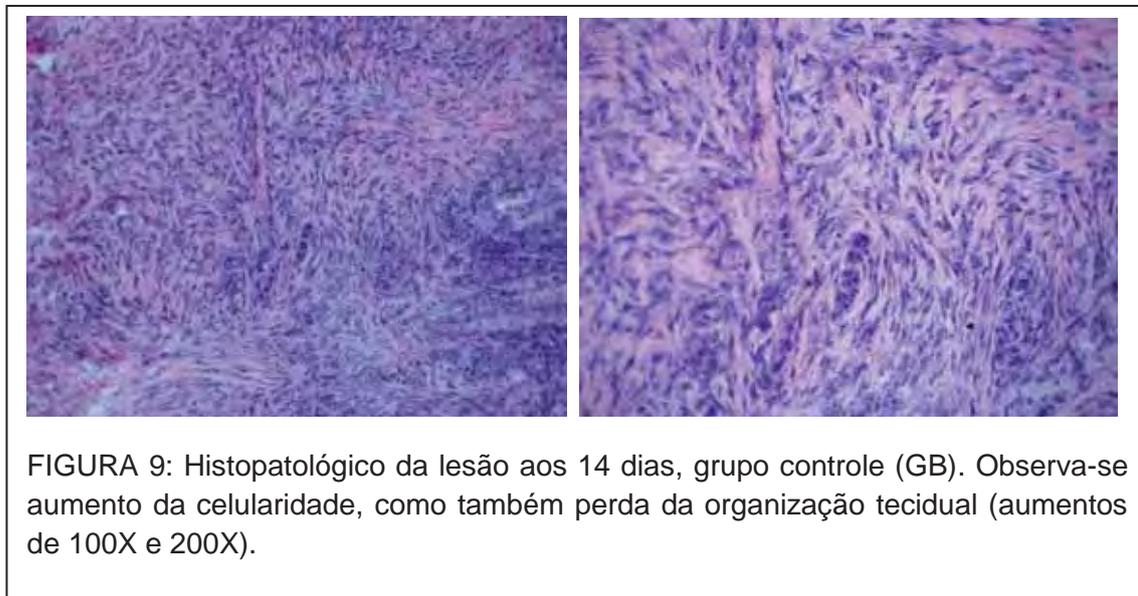
5.5 BIÓPSIA

No momento da biópsia, em D14, havia um discreto aumento de volume em ambos os membros de todos os animais, porém inferior ao aumento apresentado até o terceiro dia após a indução de lesão. O local da lesão, assim como o ponto de aplicação das células foi facilmente visualizado no tecido, devido à reação local, aumento de volume dos tecidos subcutâneo e peritendíneo, e pela inflamação provocada pela entrada da agulha. Não houve nenhuma intercorrência no momento da cirurgia, assim como no pós-operatório, sendo que todos os animais se recuperaram sem complicações, sendo utilizado como antiinflamatório a fenilbutazona (1,1mg/kg), durante sete dias. O tamanho do material coletado seguiu o tamanho da lesão avaliada pelo US, ampliando um pouco além dos seus limites, para que tecido sadio também pudesse ser avaliado posteriormente. O material coletado foi imediatamente colocado em cassetes, identificado e mergulhado em nitrogênio líquido, e só então armazenado em botijão de congelamento.

5.6 HISTOPATOLÓGICO E MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Nos cortes histopatológicos, a presença de lesão em todos os fragmentos foi confirmada, principalmente, pela ocorrência de alteração da

organização tecidual, perda do alinhamento das fibras e aumento da celularidade (Figura 9). Ainda foram observadas células arredondadas, presença de pequenos e poucos vasos, áreas de necrose e edema intratendíneo, identificados como perda da continuidade tecidual.



Na visualização dos cortes no microscópio de imunofluorescência, com o uso do filtro vermelho, foi possível identificar, nos membros tratados, diversos pontos luminosos em vermelho com um fundo negro, sendo estas definidas como células marcadas com nanocristal Qtracker 655 (Figura 11). Foram em média visualizados três pontos por corte, porém, em alguns cortes, um grande número de pontos foi observado, com até 20 focos de fluorescência. No entanto, o animal 4 apresentou raros pontos de emissão de luminosidade. Nos membros utilizados como controle, os cortes, na visualização com filtro vermelho, não apresentaram nenhum ponto fluorescente em nenhum dos cortes de todos os animais. Apenas dois dos animais, em um dos cortes histológicos de cada, apresentaram raros pontos fluorescentes à avaliação em filtro vermelho (Figura 10), o que não foi considerado migração celular das CTMs marcadas com nanocristal ao local lesado no membro contralateral, não ocorrendo esta migração celular para o local avaliado do TFDS no membro contralateral ao tratado.

As lâminas contendo os cortes, foram reavaliadas após 24 horas. As amostras continuaram a apresentar sinais fluorescentes, o que mostra que a

emissão de sinais permanece presente sob estas condições por um período de até 24 horas após o corte.

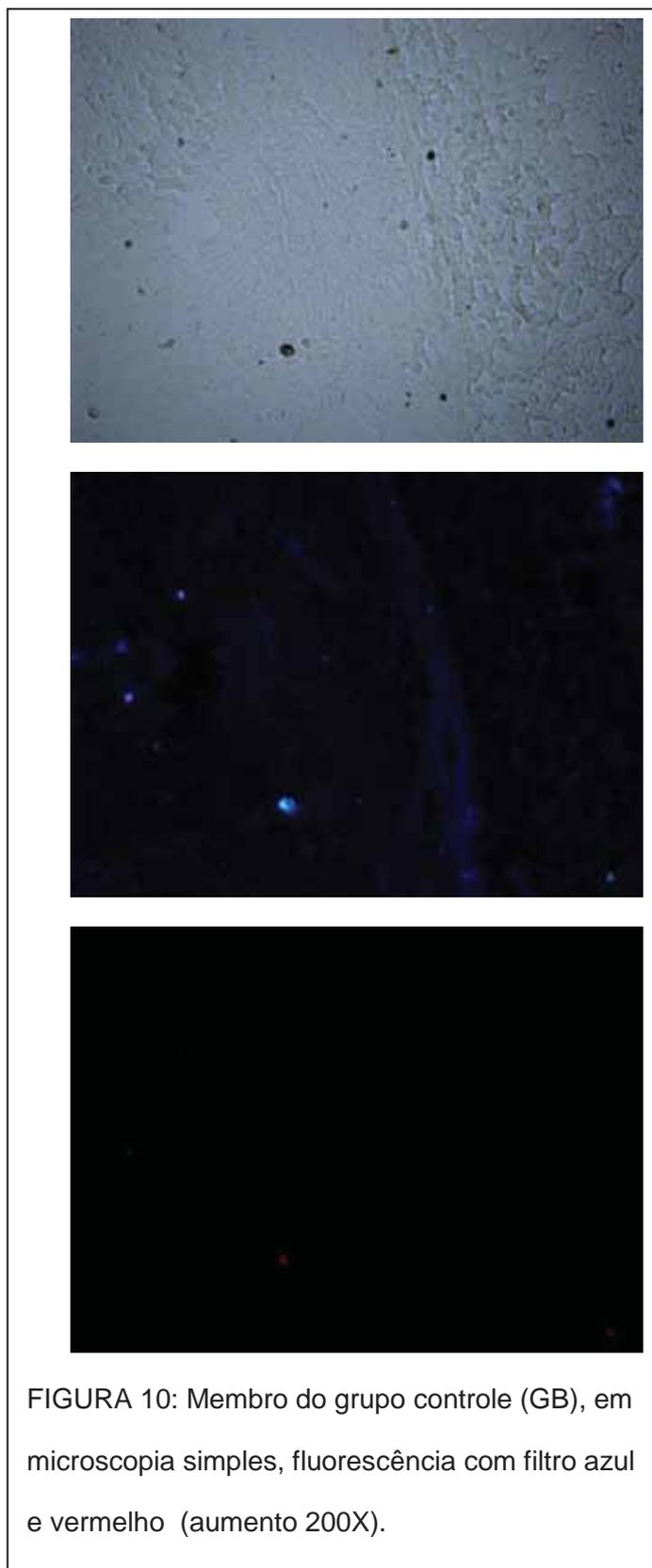


FIGURA 10: Membro do grupo controle (GB), em microscopia simples, fluorescência com filtro azul e vermelho (aumento 200X).

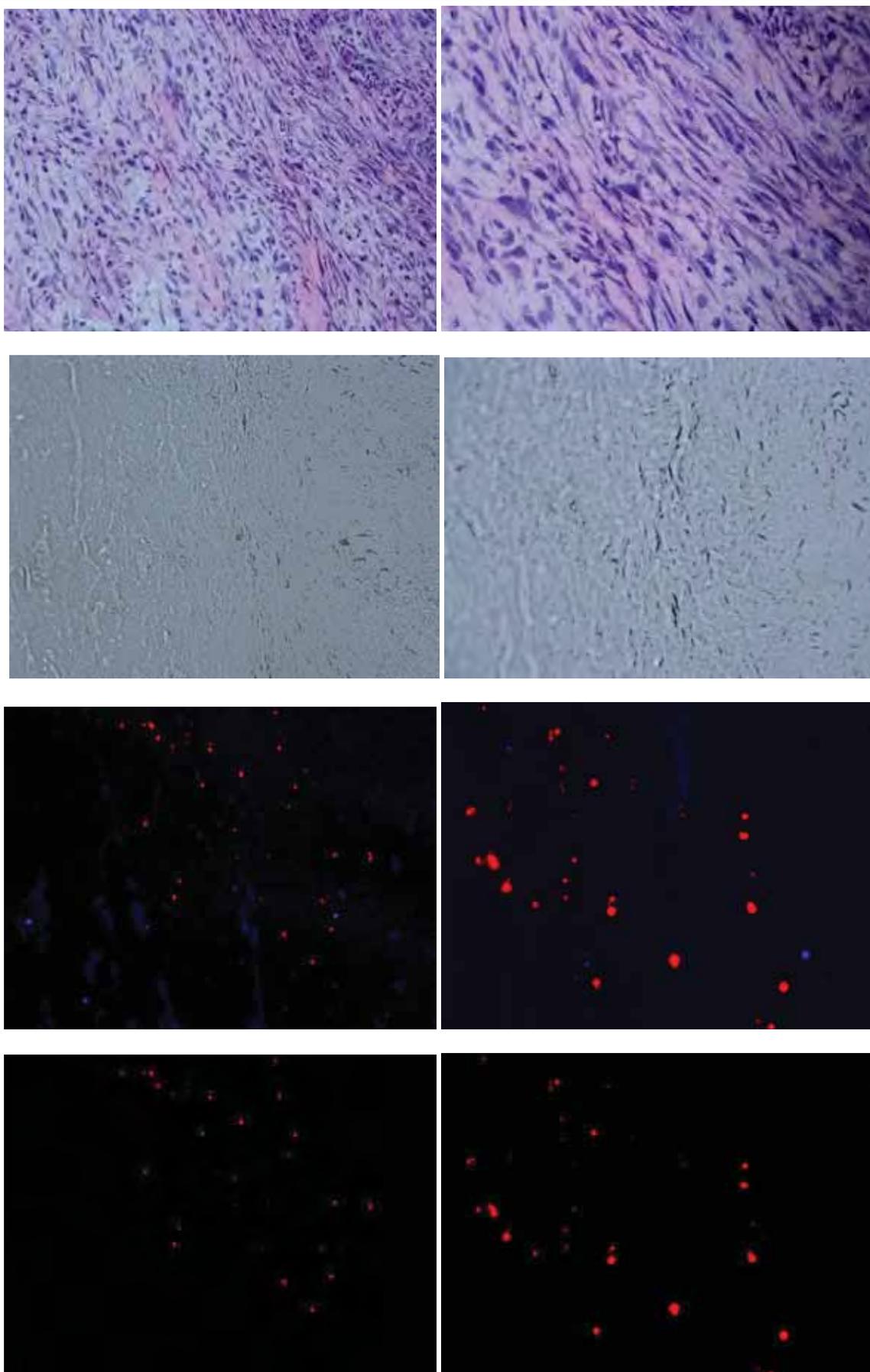
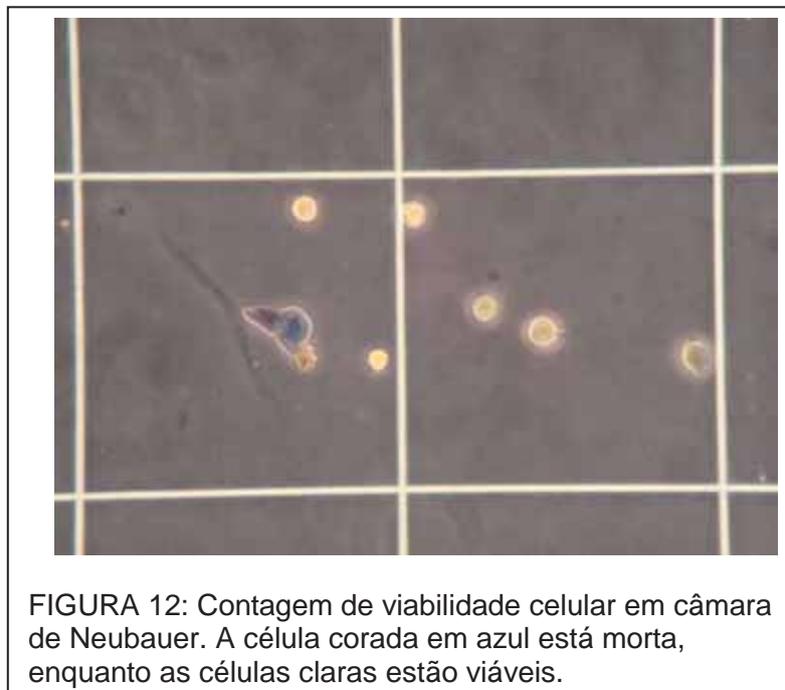


FIGURA 11: Membro do grupo tratado apresentando células marcadas com nanocristal Qtracker 655 (pontos vermelhos). Imagens de cima para baixo: coloração HE, microscopia simples, fluorescência filtro azul e fluorescência filtro vermelho. Aumentos de 200X e 400X.

5.7 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR PRÉ E PÓS MARCAÇÃO COM NANOCRISTAIS QTRACKER 655

A avaliação da viabilidade celular foi realizada pela exclusão do Azul de Trypan (Figura 12). A viabilidade inicial, das células em cultivo previamente à sua incubação com o nanocristal, foi de 87%. A contagem realizada no momento imediatamente após a incubação das células com o nanomarcador Qtracker 655, apresentou como viabilidade celular o valor de 80% de células viáveis.

Após o período de 24 horas da marcação inicial, com as células mantidas em cultivo, a viabilidade celular foi de 83%.



5.8 CONTROLES POSITIVO E NEGATIVO DAS CÉLULAS MARCADAS NO TECIDO TENDÍNEO

O tecido tendíneo normal é auto-fluorescente, facilmente visualizado no filtro azul, inclusive o alinhamento das fibras e organização tecidual. Já no filtro vermelho, alguns dos tenócitos também emitem uma fluorescência própria (Figura 13), sendo observados na mesma cor dos filtros ao qual estão sendo avaliados, mas sem um brilho tão intenso como o apresentado pelas células

marcadas com nanocristais. São visualizadas células alongadas, finas e alinhadas longitudinalmente. Este foi considerado controle negativo para as células com fluorescência, já que a intensidade do brilho e a forma de visualização da emissão do tecido normal e das células quando marcadas podem ser comparados e diferenciados.

Como controle positivo, foi utilizado o tecido sadio acrescido de células marcadas. Após ser congelado, o tecido apresentou um grande número de pontos com alta intensidade de fluorescência (Figura 14), avaliados no filtro vermelho. A região em que foi introduzida a agulha dilacerou parte do tecido, o que fez com que se perdesse o padrão de alinhamento e organização tecidual, mas as células marcadas foram facilmente identificadas na região ao redor do ponto de injeção. Estas fluorescências continuaram a ser observadas no material após serem mantidos a uma temperatura de -20°C durante 24 horas.

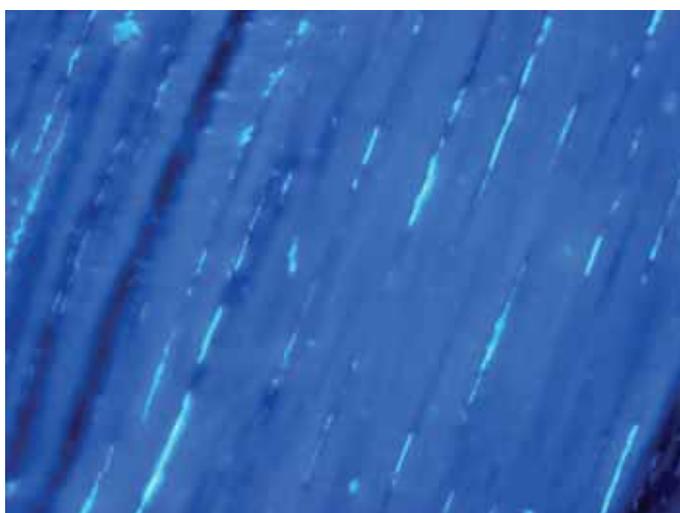


FIGURA 13: Tendão sadio observado ao microscópio comum, na fluorescência filtro azul e fluorescência filtro vermelho (200X).

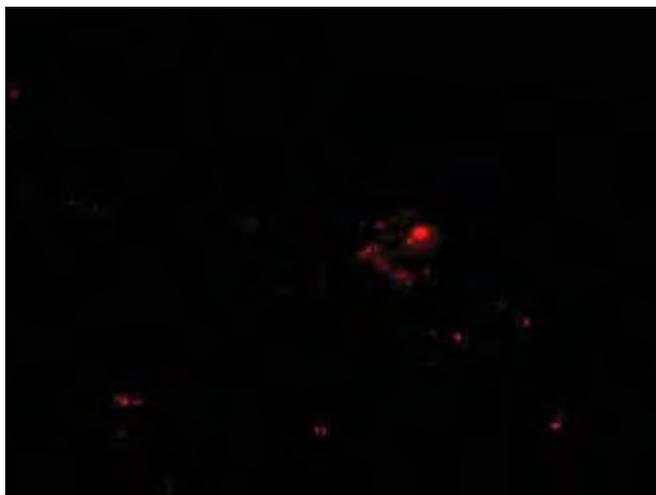
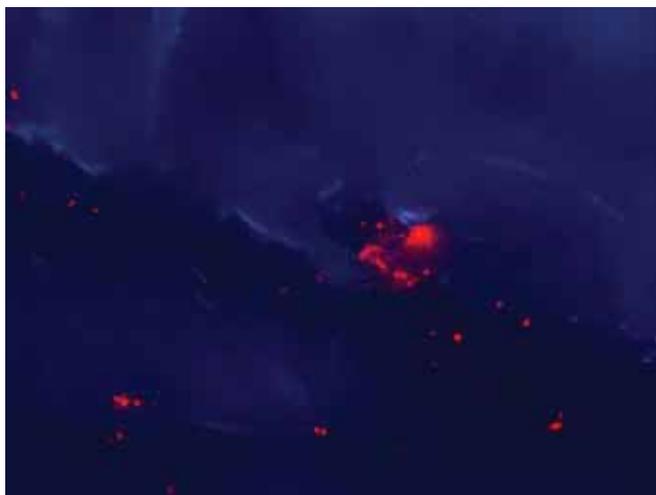


FIGURA 14: Controle positivo. Tendão sadio injetado com CTM marcadas com nanocristal e imediatamente visualizadas em microscopia comum, fluorescência filtro azul e filtro vermelho. As células marcadas são visualizadas como emissões fluorescentes na cor vermelha (200X).

6. DISCUSSÃO

A introdução das terapias com células tronco permite aos Médicos Veterinários uma oportunidade de melhorar os tratamentos aos animais. A terapia celular oferece soluções em potencial para uma variedade de doenças crônicas para as quais tratamentos farmacológicos convencionais e abordagens cirúrgicas não são eficazes (CLEGG E PINCHBECK, 2011). As lesões do tendão flexor digital superficial são um exemplo onde o desenvolvimento e o estudo de novas opções terapêuticas são essenciais, já que os tratamentos até então pesquisados devem ser complementados, pois ainda temos que melhorar a eficácia destes, a fim de minimizarmos as recidivas e proporcionarmos o restabelecimento morfo-funcional incompleto (VAUGHAN et al., 1985). A compreensão da dinâmica das CTMs após o implante intratendíneo permanece pouco claro, e a visualização destas células no tecido-alvo, conforme descrito pelo presente trabalho, irá auxiliar no melhor entendimento da real eficácia deste tipo de tratamento.

A técnica de punção de medula óssea em esterno de equinos em estação, como descrita por Smith (2003) e utilizada por Barreira et al. (2008) se mostrou viável, apesar do desconforto e risco para a pessoa que coleta a amostra, sendo necessária certa força para correta colocação da agulha no local exato de sua penetração. Barreira (2005), assim como Taylor e Clegg (2011) localizaram a posição das esternebras com auxílio de US anteriormente à colocação da agulha. Porém, após adequado treinamento da pessoa responsável pela punção, esta localização se torna mais fácil, com palpação da crista do esterno, e identificação das esternebras. A quinta esternebra se localiza caudal à articulação do cotovelo, com o animal em posição quadrupedal. Conforme descrito por Taylor e Clegg (2011), foi realizada pequena incisão de pele com bisturi antes do posicionamento da agulha, modelo Jamshidi, para então atingir a cortical do osso. A agulha utilizada no presente estudo, modelo Komiyashiki, atravessou facilmente a pele, não necessitando de incisão na pele, já que possui a ponta trifacetada. O volume de heparina também variou se comparado ao utilizado pelos citados autores. Estes se utilizaram de um volume total de 5000 UI de heparina, valor

significativamente maior, pois a coleta por nós realizada se utilizou de apenas 1 mL de heparina, na concentração de 1000 UI/mL, e não obtivemos nenhuma coagulação das amostras. O acréscimo de 2 mL de PBS na seringa de coleta não foi descrita anteriormente por nenhum destes autores, mas tem seu uso justificado por sua função de proteção das células do momento após a coleta até o seu processamento (ALVES et al., 2009). A coleta de MO pode também ser realizada na tuberosidade coxal dos equinos, conforme técnica descrita por Taylor e Clegg (2011), no entanto, apesar de uma localização mais confortável para a pessoa que realiza a coleta, apresenta desvantagens quanto a espessura cortical e dificuldade de penetração da agulha no osso.

A separação mononuclear por gradiente de densidade permite sua separação destas células das células vermelhas, granulócitos, plaquetas e das células precursoras imaturas. As células mononucleares tem densidade de 1,073g/dL, desta forma são comumente isoladas em um anel de gradiente de densidade com uso de Ficoll 1,077g/dL, após a centrifugação (Taylor e Clegg, 2011). Muitos laboratórios utilizam ficoll com densidade 1,073 g/dL, no entanto, observamos que o uso do histopaque® 1077 (densidade 1,077 g/dL) forma um halo esbranquiçado, semelhante a uma “névoa”, que contém as células mononucleares. A formação deste halo facilita visualização da porção a ser retirada e lavada para plaqueamento e cultura das CTMs. A mesma densidade do ficoll foi utilizado por Barreira (2005) e Oliveira (2008). Segundo Bourzac e colaboradores (2010), um maior número de células foi obtida após 14 dias de cultivo de células provenientes de MO com o uso de Percoll na fase de separação da fração mononuclear por gradiente de densidade.

O tempo para aderência e crescimento inicial do cultivo da células tronco mesenquimais até atingirem confluência ao redor de 80% foi de 14 a 20 dias, semelhante ao obtido por Schnabel et al. (2009), porém mais tardio que o apresentado por Kisiday et al. (2008). A dinâmica de crescimento das células em cultura nos diferentes animais pode ser alterada nos animais de idade avançada ou quando o material contém um pequeno número de células tronco, retardando a formação de colônias (COLLEONI et al., 2009). A correta manipulação das amostras e materiais e meios utilizados evita as indesejáveis contaminações.

A lesão de ocorrência natural se manifesta na região central do tendão, definido como *core lesion*, formando um arcabouço natural para implantação das células e, no momento deste implante celular, está preenchido com tecido de granulação altamente vascularizado, providenciando aporte nutricional a estas células, o ambiente mecânico e as citocinas locais, fatores importantes para a diferenciação celular, são fornecidos pelo tecido tendíneo associado às células tronco implantadas, o que tem mostrado ter um efeito anabólico significativo nas culturas de células tendíneas e ligamentares de equinos (SCHNABEL et al., 2009). As lesões produzidas foram localizadas não exatamente no centro da lesão, mas ligeiramente superficial, facilitando no momento da biópsia. Aos sete dias após a indução da lesão, momento em que se realizou o implante celular, as lesões foram observadas através de avaliação ultrassonográfica, similar ao resultado obtido por Guest e colaboradores (2008), no entanto ainda possuiu bordas ligeiramente indefinidas e com contorno irregular.

Um número ideal de células não foi estipulado, porém Alves e colaboradores (2011) sugerem que seja injetado um número mínimo de 10^7 células no local de lesão tendínea. No presente estudo, foram implantadas o número máximo de células conseguidas nos cultivos, de forma a facilitar sua visualização no tecido tendíneo, porém sem ultrapassar o período inicial da formação da lesão. Assim, o número de CTM injetadas no local da lesão sofreu variação entre os animais utilizados. De maneira semelhante ocorreu na pesquisa desenvolvida por Godwin e colaboradores (2011) entre os diversos animais tratados devido a uma série de fatores, principalmente ao que se refere às técnicas laboratoriais e problemas encontrados em alguns cultivos. Neste experimento, foi observado que um maior número de CTM foi necessário quando as lesões encontradas eram grandes. Porém, não houve diferença estatística no índice de recidivas quando relacionado ao número de células injetadas nas lesões tendíneas de ocorrência natural.

O número de, em média, 2 milhões de células implantadas foi inferior ao número utilizado por Godwin e colaboradores (2011), que foi de 5×10^6 , acrescido de 1 mL de sobrenadante de medula óssea; no entanto, maior que o que foi injetado por Guest e colaboradores, que foi de 1×10^6 células em 0,5 mL de sobrenadante de MO. O uso de sobrenadante teve como objetivo,

nestes casos, de manter a viabilidade celular e de acrescentar à terapia fatores de crescimento presentes no soro do sangue medular. No caso desta pesquisa, as células foram ressuspensas em 0,5 ml de PBS apenas para manter a viabilidade das células para transporte, e em pequeno volume para não alterar o tamanho da lesão. Esta quantidade de células para o tratamento de lesões clínicas pode variar de 10×10^6 a 50×10^6 , caso a lesão seja muito extensa (ALVES et al., 2011).

Os nanocristais, ou Quantun Dots (QD), são considerados adequados para a visualização das células tronco devido a sua fotoestabilidade e longevidade. São considerados atóxicos, e de fácil visualização em microscopia de fluorescência, devido ao seu comprimento de onda ser maior (655 nanômetros), sendo esta a razão pela qual se optou por utilizar o nanocristal Qtracker 655. Também permitem que sejam realizados estudos da dinâmica celular durante a diferenciação das CTM (KAUR e SONGHAL, 2011). A marcação celular através da fluorescência é crucial para que se realize sua visualização em tempo real das CTM *in vivo* (CHANG et al., 2008). Os atrativos dessa tecnologia são a simplicidade da marcação e a fácil e indiscutível detecção do sinal fluorescente emitido, que não se confunde com a autofluorescência característica do tecido cardíaco (OLIVEIRA et al, 2009), como também do tecido tendíneo, foco do presente estudo.

Outros tipos de marcadores celulares estudados têm apresentado efeitos indesejados, sendo exemplo os nanotubos de carbono, que apresentaram aumento da apoptose celular (ZHU et al., 2007), e o *Cell Tracker Dil*, que reduziu o número de células viáveis assim como a velocidade de divisão celular (WEIR et al., 2008).

Um baixo número de células injetadas dificulta a identificação celular no tecido proveniente da biópsia. Desta forma, mesmo não sendo o objetivo do trabalho tratar a lesão tendínea, observamos que quanto maior for o número de células marcadas injetadas, maiores são as chances de sua identificação na microscopia de fluorescência. Outro ponto a ser considerado em culturas celulares é que quando ocorre baixa densidade na cultura inicial de CTMs, as células não proliferam imediatamente, e exigem muito tempo para se desenvolver em colônias (LUCCARDINI et al., 2007). Desta forma, algumas

culturas podem levar mais de 3-4 semanas para atingir um número adequado de tratamento, período maior do que o realizado pela presente pesquisa.

As células, quando marcadas em cultivo, apresentaram forte marcação, com milhares de sinais fluorescentes por toda a placa. A fração total de células mononucleares pesquisada por Olsson (2009), provenientes a medula óssea também foi observada com um pronunciado efeito imunofluorescente no botão celular, permitindo a confirmação da presença de CTM antes da aplicação no tecido desejado. Esta confirmação foi possível ao se observar pontos quânticos coloidais nanocristais nas células mononucleares de medula óssea na avaliação pré-implante intratendíneo. Neste caso, entretanto, nas análises das biópsias dos tendões, conseguiu-se obter fluorescência em um número pequeno de amostras nos sétimo, quatorze e trinta dias de análise, apresentando ao redor de 30% de análises positivas (OLSSON, 2009).

Sem serem encontradas complicações para realização das biópsias, a técnica anestésica se mostrou adequada e os animais não apresentaram intercorrência no pós-cirúrgico, sendo o tratamento instituído com anti-inflamatórios adequado para conforto dos animais. Os achados histopatológicos confirmam a fase inicial de reparação da tendinite. Durante esta fase, a congestão e acúmulo de fluidos no local promovem isquemia e necrose de tenócitos. A extensão da necrose está relacionada ao grau de comprometimento vascular (SHAMA e MAFFULLI, 2006). Em resposta à lesão tecidual, tem início uma resposta inflamatória intensa, com hemorragia e edema intratendíneo, e a infiltração de macrófagos e polimorfonucleares, para remoção de tecido necrótico e deposição de fibrinas (STASHAK, 2002), de acordo com o encontrado no presente estudo.

Não houve diferença na aparência histológica entre os membros tratados com CTM e os membros controle. Ambos apresentaram alteração no alinhamento das fibras, áreas de edema e ausência de fibras colágenas, e, principalmente, aumento na celularidade. Este resultado pode ser reflexo do curto período para avaliação (BARREIRA et al., 2008), e um intervalo de tempo maior se faz necessário para que se possa realizar uma adequada comparação e avaliação do tecido neoformado e para se confirmar qual é o real efeito do implante de CTM na reparação tendínea (OLIVEIRA, 2008).

Warfvinge e colaboradores (2005) e Klassen e colaboradores (2007), em trabalho utilizando porcos, observaram que as células podem sobreviver por até cinco semanas após o transplante. Dentro de um período mais curto, a presente pesquisa confirma a possibilidade de visualização das CTM marcadas com nanomarcadores quando se avalia o tecido alvo sete dias após implante.

Stewart e Stewart (2011) citam que a marcação de CTM implantadas em cartilagem e tendão lesados não permanecem no local da lesão. Quintavella e colaboradores (2009) documentaram extensa saída de CTM implantadas no defeito da cartilagem articular entre sete e quatorze dias após a injeção, e o rastreamento de células marcadas e implantadas em modelos experimentais de tendinites em equinos não é mais possível após 4 a 6 semanas (GUEST et al., 2010; STEWART e STEWART, 2011). A presente pesquisa comprovou que as células podem permanecer no tendão lesado por um período de até sete dias, comprovado através da visualização de sua fluorescência após marcação com QDs. Demonstrou-se, *in vivo*, que as células implantadas sobrevivem no interior do tendão em um número relativamente pequeno, por mais de 4 semanas (GUEST et al., 2008; ALVES et al., 2011), concordando com o período aqui apresentado. Murphy e colaboradores (2003) descreveram uma regeneração expressiva de menisco em caprinos, quando as células marcadas eram evidentes no interior da superfície do tecido meniscal regenerado, porém a maior parte do tecido neoformado era constituído por células locais. Desta forma, acreditou-se que o maior efeito terapêutico das CTMs pode ser atingido mesmo sem um grande número de células implantadas, e que as células não tenham sua principal função se diferenciar no tecido alvo, mas sim se diferenciar em células endoteliais ou aumentar a sobrevivência da população intrínseca de células, por exemplo (STEWART e STEWART, 2011). Não foi possível pelo presente estudo afirmar se as células se diferenciam ou tem apenas efeito parácrino, devido ao curto período de avaliação. Rosen e colaboradores (2007) observaram que, após 8 semanas de implante em infarto do miocárdio, as células marcadas com QD foram claramente e fortemente visualizadas no local da lesão, ainda que algumas destas células tivessem desenvolvido fenótipo endotelial, e outras células se diferenciasssem em cardiomiócitos.

Apesar de terem sido implantadas cerca de 2 milhões de CTMs marcadas, um número reduzido de sinais fluorescentes foi visualizado por corte histológico. Um fator que pode ter afetado esta visualização foi a manutenção das amostras dos tendões biopsiados em nitrogênio líquido por um período de 1 mês. Rosen e colaboradores (2007), de forma semelhante, congelaram o material após a sua coleta, porém em temperatura a -20°C ; Realizados os cortes histológicos, o material foi novamente armazenado à mesma temperatura, e estes procedimentos não impediram a visualização fluorescente das amostras. Procedimento de congelação do tecido tendíneo em nitrogênio foi realizado por Guest e colaboradores (2008), após implante celular, mas se utilizando como marcador o GFP.

A metodologia de avaliação do material tendíneo e ósseo proveniente de biópsias realizado por Olsson (2009) e Salbego (2010), utilizando-se nanocristais como marcadores, descreveram que a observação do material obtido foi feita imediatamente após a sua coleta. Nestas pesquisas, foram realizados *imprint* das amostras coletadas. Mesmo realizadas em um curto período após a obtenção do material, não houve melhora na observação de fluorescência emitida pelas células marcadas se comparadas ao presente estudo, no qual mesmo após o período de um mês de congelamento em nitrogênio, um pequeno número de sinais fluorescentes foi observado. A fluorescência emitida é fotoestável, possibilitando a sua observação por horas em tecidos marcados e podendo ser arquivados permanentemente (PARAK et al., 2005). Segundo Donaldson e colaboradores (2007), nanocristais fluorescentes podem ser localizados por pelo menos quatro gerações celulares, e algumas permanecem marcadas por até duas semanas.

A redução na visualização do número de células marcadas com nanocristais após o implante pode ter ocorrido, primeiramente, à morte celular após a injeção intratendínea, seja por encontrar um local ainda inflamado e com áreas de necrose; migração celular à região peritendínea; ou ainda migração destas células a locais distantes e não estudados na presente pesquisa, como exemplo o tecido pulmonar.

As amostras, 24 horas após o corte, continuaram a apresentar sinais fluorescentes, semelhante ao descrito por Guest e colaboradores (2008), porém estes se utilizaram do marcador GFP, diferente do nanocristal utilizado.

Dado semelhante foi citado por Oliveira e colaboradores (2009), que descreveram que a marcação intracelular com Qdots pode ser observada ao microscópio de fluorescência por mais de 50 dias.

A maioria das CTM marcadas foi visualizada no local da lesão, o que indica que permaneceram próximo à região ao qual foram implantadas. No entanto, algumas células puderam ser identificadas no tecido íntegro ao redor, o que mostra que alguma migração pode ocorrer. O tamanho da biópsia permitiu que se avaliasse a ocorrência de migração das CTM da área lesada para o tecido sadio dentro do período de sete dias.

Em estudo desenvolvido por Burns e colaboradores (2006), os autores relataram que no momento do transplante, muitas células transplantadas morreram (por diferenças no microambiente ou por agressões físicas), e liberaram a substância química que estava sendo usada na sua marcação (no caso, o DAPI, que possui sua captação ativa pela célula em cultivo). Essa substância, livre no micro-ambiente hospedeiro, é ativamente captada pelas células residentes neste local. Este evento, que ocorre *in vivo*, demonstra uma importante limitação de experimentos que utilizam tais corantes como marcadores, já que células normalmente residentes no tecido podem se tornar marcadas e sendo assim, confundidas com células transplantadas, o que caracterizaria um falso positivo (BURNS et al., 2006). Comprovando este fato, Costa (2009) realizou uma dupla marcação das CTM: o núcleo foi marcado com DAPI e o citoplasma foi marcado com Qdot, que não pode ser transferido de uma célula para outra. Após um período de duas semanas, se observou que as células coradas pelo QuantumDot (no caso, de coloração rosa) haviam migrado em direção à lesão, mas um número muito maior de células estava corado em azul (DAPI), o que confirma a difusão do DAPI para células adjacentes. O presente estudo confirmou a presença de células no local da lesão, e aquelas encontradas no tecido íntegro próximo ao local da lesão foram consideradas CTM que migraram, já que o nanocristal não se difunde às células adjacentes.

Com os atrativos da técnica por nanomarcadores, Oliveira e colaboradores (2009) obtiveram sucesso na identificação de CT mesenquimais *in vivo*, utilizando este mesmo marcador, sendo estas células transplantadas em infartos de miocárdio experimental em suínos. A técnica desenvolvida

permitiu o rastreamento das células e o estudo da migração com fotodegradação reduzida em longo prazo, confirmando que uma pequena parcela das CTMs injetadas migra para o tecido adjacente.

Seguindo as recomendações de Oliveira et al. (2010), Salbego (2010) detectou fluorescência em 100% das análises que fez em enxerto ou implante homólogo, na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães, associado à inoculação da fração total de células mononucleares da medula óssea, porém com diferentes graus de intensidade. Os resultados obtidos neste experimento foram similares àqueles concluídos por Oliveira et al. (2010) e Olsson (2009), na marcação da fração de células com o mesmo marcador. Estes pesquisadores concluíram que é possível o uso de marcadores fluorescentes nanocristais quantum dots para rastrear o destino das células implantadas em tecidos com diversos graus de vascularização sem comprometer a viabilidade celular e o potencial de diferenciação. Em outros tecidos que também tem fluorescência própria, como o tecido cardíaco, as CTM foram claramente visualizadas em locais de infarto, conforme descrito por Oliveira e colaboradores (2009). De maneira semelhante, a presente pesquisa observou um pequeno número de células no local da lesão, contadas como pontos fluorescentes na avaliação com filtro vermelho na microscopia de fluorescência. No entanto, as CTMs marcadas com nanocristais não foram visualizadas na região de lesão tendínea do membro contralateral, nos mostrando que não houve migração celular para esta localidade, seja pela longa distância que estas células deveriam percorrer até atingirem o foco da lesão, e assim serem fixadas em outros locais do organismo, como o pulmão, que apresenta uma importante região para a qual as CTMs apresentam migração (BARBASH et al., 2003), ou devido à baixa vascularização do tecido tendíneo, dificultando o aporte destas células ao TFDS contralateral.

Em geral, nas pesquisas desenvolvidas em tendinites experimentais ou de ocorrência natural, apenas um dos membros é tratado. No entanto, sabe-se que muitas das alterações ocorridas nos tendões, que culminam no desenvolvimento da tendinite, estão presentes bilateralmente, predispondo o tendão contralateral ao tratado a desenvolver tendinite subsequente quando o animal retorna ao trabalho (SMITH et al., 2002). Alguns experimentos com tendinites induzidas com o uso de colagenase utilizaram um membro tratado e

o contralateral como controle (OLIVEIRA, 2008; CARVALHO, 2009). Nestes casos, havia a dúvida de que as células implantadas intralesionalmente migrassem para o outro membro, devido ao potencial de atração que as regiões inflamadas exibem sobre as células tronco. Esta migração não foi observada pelo presente experimento, já que as lesões dos TFDS dos membros torácicos não tratados não apresentaram nenhuma emissão de sinais fluorescentes, ao contrário das lesões com implante celular. Células tronco provenientes do tecido tendíneo foram utilizadas no tratamento de tendinites induzidas em equinos por Alves e colaboradores (2011), e o membro contralateral, também apresentando lesão, permaneceu como controle recebendo apenas solução salina. Na avaliação histológica, o tendão tratado apresentou matriz extracelular mais organizada, assemelhando-se ao tendão normal do que o contralateral.

Estes mesmos autores identificaram as CTMs provenientes do tendão, e marcadas com Dil (1,1'-diocetadecil-3,3,3'-testramethylindocarbocyanine perchlorate), localizadas próximo ao local de injeção, no período de uma semana, e que em duas semanas ocorreu sua migração para o interior da lesão. A migração celular do local da lesão para tecidos adjacentes foi mínima.

Olsson (2009) descreve não ocorrer alteração da viabilidade das células no botão celular antes do implante tecidual quando marcadas com o mesmo nanocristal, dado semelhante ao apresentado pelas células em cultivo na presente pesquisa. A viabilidade obtida previamente à marcação celular foi de 87%, valor numericamente superior àquele encontrado após a sua incubação com o nanocristal Qtracker 655, que foi de 80%. Este valor se manteve ao final de um período de 24 horas de marcação (83%). A diferença de viabilidade inicial e após a marcação pode ocorrer devido à manipulação celular durante a marcação, tripsinização das células, número de lavados, velocidade e tempo de centrifugação, e agitação sofridos durante o processo.

A viabilidade celular após a sua marcação com nanocristais apresentou valor semelhante as descritas em estudos *in vitro* (INVITROGEN, 2008). O período de 24 horas pós marcação das células tronco mesenquimais, e mantidas em cultivo, mostrou que sua viabilidade se mantém ao redor de 80%, concordando com Oliveira e colaboradores (2009), que pesquisaram *in vitro* o mesmo marcador durante 12 dias, e observaram que as células se

comportavam em cultivo da mesma forma que as não marcadas, porém, obtendo resultado de viabilidade mais alto (98,1% células não marcadas e 97,9% nas marcadas). Dado semelhante foi encontrado por Xiao e colaboradores (2010), que não observaram queda da viabilidade celular após 72 horas de marcação com nanocristal, e por Ranjbarvaziri e colaboradores (2011), que se utilizaram da mesma concentração de 10 nM, semelhante ao realizado nesta pesquisa, e não detectaram alteração na viabilidade celular, concluindo que os nanocristais não possuem efeito deletério no funcionamento das CTM. Segundo Chang e colaboradores (2008), não existe relação com a viabilidade celular e a dose de nanocristais Qdots utilizada para a marcação. Porém, os QDs pesquisados por Muller-Borer e colaboradores (2007) apresentaram efeito tóxico, com aumento da apoptose celular, quando utilizado em altas doses (o dobro do recomendado pelo fabricante), e sugeriram ainda que as células quando marcadas devem ser utilizadas dentro de um prazo de 24 horas.

A fluorescência do tecido tendíneo, apesar de ter sido citada anteriormente por alguns autores (GUEST et al., 2008; YAO et al., 2011), não foi avaliada quanto a sua fluorescência em diferentes filtros, nem observada após imediata injeção de CTMs quando marcadas. Neste estudo, se conseguiu caracterizar e diferenciar a fluorescência normal do tecido, nos filtros azul e vermelho, daquela fluorescência apresentada pelas células incubadas com nanocristais, reduzindo futuros problemas na interpretação de resultados durante a avaliação tecidual tendínea.

Na presente pesquisa também pôde ser observado que o tendão lesado perde sua autofluorescência. Este tecido sadio, observado no filtro azul, é facilmente identificado, sendo visualizados tanto o alinhamento das fibras colágenas como também os tenócitos. No filtro vermelho, observa-se a fluorescência de diversos tenócitos, como imagens delgadas e alongadas longitudinalmente. Assim, definindo-se como controle negativo de lesão e ausência de CTM marcadas. O tendão que possui lesão perde esta regularidade e alinhamento das fibras, sendo assim a fluorescência fracamente visualizada, com baixa intensidade de coloração e brilho mais fracos. A presença de edema intratendíneo, que não possui fluorescência, colabora com este achado. O comprimento de onda emitido pelo Qtracker 655 é de

exatamente 655nm, sendo que o intervalo de comprimento entre 640-660 nm emite luz na faixa vermelha (ROSEN et al., 2007). Isso faz com que o sinal captado seja QD-específico naqueles tendões sadios recém implatados com células marcadas, facilmente visualizadas e consideradas controle positivo pela pesquisa, apesar da perda da fluorescência tendínea causada pela destruição do tecido provocada pela agulha. Esta fácil visualização dos sinais emitidos pelas células marcadas é uma garantia de que a auto-fluorescência do corte histológico seja reduzida e não influencie na visualização da célula marcada (ROSEN et al., 2007).

7. CONCLUSÕES

- As CTM marcadas com o nanocristal Qtracker 655 não apresentaram queda em sua viabilidade, mesmo após um período de 24 horas, *in vitro*, demonstrando que este nanocristal não possui efeito tóxico às células, segundo avaliação realizada com corante Azul de Trypan.

- As CTM marcadas com nanocristal foram observadas ao microscópio de fluorescência sete dias após o implante em lesões tendíneas de equinos.

- Não ocorreu migração das células marcadas com Qtracker 655 para a área lesada avaliada no TFDS do membro contralateral.

8. REFERÊNCIAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula** 4^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2004 cap. 22.

ALVES, A.L.G.; STEWART, A.A.; DUDHIA, J. et al. Cell-based therapies for tendon and ligament injuries. **Vet Clin Equine**, v.27, p.315–333, 2011.

ALVES, A.L.G.; et al. Protocolo de isolamento de células mononucleares de medula óssea de eqüinos. **Vet. e Zootec.**, v.16, n.4, p.650-655, 2009.

ALVES, A.L.G.; NICOLETTI, J.L.M.; THOMASSIAN, A.; HUSSNI, C.A.; WATANABE, M.J. Tendon splitting surgical treatment on experimental equine acute tendinitis. **Archives of Veterinary Science**, v.7, n.2, p.45-51, 2002.

BARBASH, I.M.; CHOURAQUI, P.; BARON, J. et al. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium. **Circulation**, v.108, p. 863-868, 2003.

BARREIRA, A.P.D.; ALVES, A.L.G.; SAITO, M.E.; AMORIM, R.L.; KOAYGAWA, A.; MENARIM, B.C.; et al. Autologous implant of bone marrow cells as treatment of induced tendinitis. **Int. J. Appl. Res. Vet. Med.**, n.6, p.46-54, 2008.

BIANCO, P. et al. Bone marrow stem cells: nature, biology, and potential applications. **Stem Cells**, v. 19, p. 180-192, 2001.

BIRCH, H.L.; WILSON, A.M.; GOODSHIP, A.E. Physical activity: does long-term, high-intensity exercise in horses result in tendon degeneration? **J.appl. Physiol.**, v.105, p.1927-1933, 2008.

BUTLER, D.L.; JUNCOSA-MELVIN, N.; BOIVIN, G.P.; GALLOWAY, M.T.; SHEARN, J.T.; GOOCH, C.; AWAD, H. Functional tissue engineering for tendon repair: a multidisciplinary strategy using mesenchymal stem cells, bioscaffolds, and mechanical stimulation. **J. orthop. Res.**, v.26, p.1-9, 2008.

BUE, M.D.; RICCÒ, S.; RAMONI, R.; CONTI, V.; GNUDI, G.; GROLLI, S. Equine adipose-tissue derived mesenchymal stem cells and platelet concentrates: their association *in vitro* and *in vivo*. **Vet. Res. Commun.**, v.32, suppl.1, p.51-55, 2008.

BURNS, T.C.; ORTIZ-GONZÁLEZ, X.R.; GUTIÉRREZ-PÉREZ, M. et al. Thymidine analogs are transferred from prelabeled donor to host cells in the central nervous system after transplantation: a word of caution. **Stem Cells**. v.24, p.1121-1127, 2006.

CAPLAN, A.I. Mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics. **Tissue Eng.**, v.11, p.1198–1211, 2005.

CARVALHO, A.; ALVES, A.; DE OLIVEIRA, P. et al. Use of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for experimental tendinitis therapy in equines. **J Equine Vet Sci.** v.31, p.26–34, 2011.

CHEN, Y.; KUYKENDALL, T.D.; CAPORALI, E. et al. Cells in equine synovial fluid exhibit chondrogenic capacity without evidence of an endochondral phenotype. **Trans. Orthop. Res. Soc.**, v.34, p.937, 2009.

CLEGG, P.D.; PINCHBECK, G.L. Evidence-based medicine and stem cell therapy: How do we know such technologies are safe and efficacious?. **Vet. Clin Equine**, v.27, p.373-382, 2011.

COLLEONI, S., BOTTANI, E.; TESSARO, I. et al. Isolation, growth and differentiation of equine mesenchymal stem cells: Effect of donor, sources, amount of tissue and supplementation with basic fibroblast growth factor. **Vet Res Commun**, v.33, p.811-821, 2009.

COSTA, L.T. 2009. **Avaliação da migração e integração de células-tronco mesenquimais ao tecido retiniano lesado. Estudo experimental em ratos wistar.** Tese (Doutorado), 111p. Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

CROVACE, A.; LACTIGNOLA, L.; ROSSI, G.; FRANCIOSO, E. Histopathological and immunohistochemical evaluation of autologous cultured bone marrow mononucleated cells in collagenase-induced tendinitis of equine superficial digital flexor tendon. **Vet. Med. Int.**, 2010, 250978.

DAHLGREN, L.A.; MOHAMMED, H.O.; NIXON, A.J. Temporal expression of growth factors and matrix molecules in healing tendon lesions. **J. orthop. Res.**, v.23, p.84-92, 2005.

DEVINE, S.M.; COBBS, C.; JENNINGS, M.; BARTHOLOMEU, A.; HOFFMAN, R. Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. **Blood**, v.101, n.8, p.2999-3001, 2003.

DONALDSON, K., et al. Nanotoxicology. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**, v. 61, n. 9, p. 727–728, 2004.

FERREIRA, L.; KARP, J.M.; NOBRE, L. et al. New opportunities: the use of nanotechnologies to manipulate and track stem cells. **Cell Stem Cell**, v.3, p.136-146, 2008.

FILIP, S. et al. Issues in stem cell plasticity. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 8, n. 4, p. 572-577, 2004.

FORTIER, L.A.; SMITH, R.K. Regenerative medicine for tendinous and ligamentous injuries of sport horses. **Vet. Clin. North Am. Equine Pract.**, v.24, n.1, p.191-201, 2008.

FOX, J.M.; CHAMBERLAIN, G.; ASHTON, B.A.; MIDDLETON, J. Recent advances into the understanding of mesenchymal stem cell trafficking. **British Journal of Haematology**, v.137, p.491-502, 2007.

FRISBIE, D.D.; SMITH, R.K.W. Clinical update on the use of mesenchymal stem cells in equine orthopaedics. **Equine Vet J**, v.42, n.1, p.86-89, 2010.

GODWIN, E.E.; YOUNG, N.J.; DUDHIA, J.; BEAMISH, I.C.; SMITH, R.K.W. Implantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells demonstrates improved outcome in horses with overstrain injury of the superficial digital flexor tendon. **Equine Vet J.**, 2011.

GUEST, D.J.; SMITH, M.R.W.; ALLEN, W.R. Monitoring the fate of autologous and allogeneic mesenchymal progenitor cells injected into the superficial digital flexor tendon of horses: Preliminary study. **Equine Vet J**, v.40, n.2, p.178-181, 2008.

GUEST, D.J.; SMITH, M.R.; ALLEN, W.R. Equine embryonic stem-like cells and mesenchymal stromal cells have different survival rates and migration patterns following their injection into damaged superficial digital flexor tendon. **Equine Vet. J.**, v.42, p.636–642, 2010.

HANKEMEIER, S.; KEUS, M.; ZEICHEN, J.; JAGODZINSKI, M.; BARKHAUSEN, T.; BOSH, U.; KRETTEK, C.; VAN GRIESVEN, M. Modulation of proliferation and differentiation of human bone marrow stromal cells by fibroblast growth factor 2: potential implications for tissue engineering of tendons and ligaments. **Tissue Eng.**, v.11, p.41-49, 2005.

HASSAN, M. E. et al. Nanodiagnosics: a new frontier for clinical laboratory medicine. **Clinical Chemistry**, v. 52, p. 1238-1246, 2006.

HERRERO, C.; PERÉZ-SIMÓN, J.A. Immunomodulatory effect of mesenchymal stem cells. **Braz J Med Biol Res.** v.43, p.425–430, 2010.

HOFRNANN, M.; WOLLERT, K.C.; MEYER, G.P.; et al., Monitoring of bone marrow cell homing into the infarcted human myocardium. **Circulation**, v.111, n.17, p.2198- 202, 2005.

HSIEH, S.C.; WANG, F.F.; LIN, C.S.; CHEN, Y.J.; HUNG, S.C.; WANG, Y.J. The inhibition of osteogenesis with human bone marrow mesenchymal stem cells by CdSe/ZnS quantum dot labels. **Biomaterials**, v.27, p.1656–1564, 2006.

INVITROGEN. Molecular probes. Qdot® nanocrystals technology. Catálogo de produto. Disponível em: probesinvitrogen.com. Acesso em 12 de janeiro de 2011.

IZADPANAH, R.; TRYGG, C.; PATEL, B.; KRIEDT, C.; DUFOUR, J.; GIMBLE, J.M.; BUNNELL, B.A. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.99, p.1285-1297, 2006.

JONES, E.; MCGONAGLE, D. Human bone marrow mesenchymal stem cells *in vivo*. **Rheumatology**, v.6, p.1-6, 2007.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**, 10 Ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, 487 pág.

KAUR, S.; SINGHAL, B. When nano meets stem: The impact of nanotechnology in stem cell biology, **J. Biosci. Bioeng.** (2011), doi:10.1016/j.jbiosc.2011.08.024

KISIDAT, J.D.; KOPESKY, P.W.; EVAN, C.H. et al. Evaluation of adult equine bone marrow and adipose-derived progenitor cell chondrogenesis in hydrogel cultures. **J Orthop Res**, v.26, p.322-331, 2008.

KLASSEN, H.; KILGAARD, J.F.; ZAHIR, T.; WARFVRINGE, K. Progenitor cells from the porcine neural retina express photoreceptor markers after transplantation to the subretinal space of allorecipients. **Stem Cells**. v.25, p.1222-1230, 2007.

KLASSEN, H.; WARFVRINGE, K.; SCHWARTZ, P.H. et al. Isolation of progenitor cells from GFP-transgenic pigs and transplantation to the retina of allorecipients. **Cloning and Stem Cells**. v.10, p.391-402, 2008.

KOCH, T.G.; BERG, L.C.; BETTS, D.H. Concepts for the clinical use of stem cells in equine medicine. **Com Vet J**, v.49, p.1009-1017, 2008.

KOCH, T.G.; BERG, L.C.; BETTS, D.H. Current and future regenerative medicine - Principles, concepts, and therapeutic use of stem cell therapy and tissue engineering in equine medicine. **Com Vet J**, v.50, p.155-165, 2009.

KURAITIS, D.; RUEL, M.; SUURONEN, E.J. Mesenchymal stem cells for cardiovascular regeneration. **Cardiovasc. Drugs Ther.**, v.25, p.349-62, 2011.

LUCCARDINI, C. et al. Getting across the plasma membrane and beyond: intracellular uses of colloidal semiconductor nanocrystals. **Journal of Biomedicine and biotechnology**, v.1, p.1-9, 2007.

MARSH, J. N. et al. Molecular imaging with targeted perfluorocarbon nanoparticles: quantification of the concentration dependence of contrast

enhancement for binding to sparse cellular epitopes. **Ultrasound Medicine Biological**, v. 33, n. 6, p. 950–958, 2007.

MICHALET, X. et al. Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. **Science**, v.307, n.5709, p.538-544, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/content/307/5709/538.full.pdf>>. Acesso em: 19 ago.2010. doi: 10.1126/science.1104274.

MONTEIRO, B.S.; Argolo-Neto, N.M.; Del Carlo, R.J. células-tronco mesenquimais. **Ciência Rural**, v.40, n.1, 2010.

MULLER-BORER, B.J.; COLLINS, M.C.; GUNST, P.R. et al. Quantum dot labeling of mesenchymal stem cells. **Journal of Nanobiotechnology**, v.5, p.1-9, 2007. Disponível em: <<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>>. Acesso em: 20ago.2011.

MURPHY, J.M.; FINK, D.J.; HUNZIKER, E.B.; et al. Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. **Arthritis Rheum.**, v.48, p.3464–3474, 2003.

OLIVEIRA, D.M.; ALMEIDA, B.O.; MARTI, L.C.; SIBOV, T.T.; PAVON, L.F.; MALHEIROS, D.M.A.C.; CAMPOS, A.H. Labeling of human mesenchymal stem cells with *quantum dots* allows tracking of transplanted cells engrafted in infarcted pig hearts. **Einstein**, v.7, p.284-289, 2009.

OLIVEIRA, P.G.G. 2008. **Implante autólogo de células mononucleares provenientes de medula óssea no tratamento de tendinites induzidas em eqüinos: avaliação a longo prazo – 120 dias**. 164p. Dissertação (mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Botucatu.

OLIVEIRA, G.K.; RAISER, A.G.; OLSSON, D.; SALBEGO, F.Z.; MARTINS, D.B.; DEZENGRINE, R.; SANTOS JÚNIOR, E.B.; RAPPETI, J.; TRAINDADE, L.B.; TOGNOLI, G.K.; PIPPI, N.L.; SAUSEN, L. Células-tronco mononucleares autólogas e proteínas óssea morfogenética na cicatrização de defeitos tibiais experimentalmente induzidos em cães. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.62, n.1, p.72-79, 2010.

OSHIMA, Y.; WATANABE, N.; MATSUDA, K.; TAKAI, S.; KAWATA, M.; KUBO, T. Behavior of transplanted bone marrow-derived GFP mesenchymal cells in osteochondral defect as a simulation of autologous transplantation. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v.53, n.2, p.207-216, 2005.

OLSSON, D.C. **Transplante de células-tronco com a fração total de células mononucleares autógenas da medula óssea na reparação aguda primária de tendão calcâneo de cães**. 2009. 175f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

PACINI, S.; SPINABELLA, S.; TROMBI, L.; FAZZI, R.; GALIMBERT, S.; DINI, F.; CARLUCCI, F.; PETRINI, M. Suspension of Bone Marrow-Derived Undifferentiated Mesenchymal Stromal Cells for Repair of Superficial Digital Flexor Tendon in Race Horses. **Tissue Eng**, v.13, n.12, p.2949-2955, 2007.

PARAK, W. J. et al. Labelling of cells with quantum dots. **Nanotechnology**, v. 16, p. 9-25, 2005.

POUNTOS, I.; GIANNOUDIS, P.V. Biology of mesenchymal stem cells. **Int. J. Care Injured**, v.36, p.8-12, 2005.

QUINTAVELA, J.; UZIEL-FUSIA, S.; YIN, J. et al. Fluorescently labeled mesenchymal stem cells (MSCs) maintain multilineage potential and can be detected following implantation into articular cartilage defects. **Biomaterials**, v.23, p.109–19, 2009.

RANJBARVAZIRI, S.; KIANI, S.; AKHIAGHI, A. et al. Quantum dot labeling using positive charged peptides in human hematopoietic and mesenchymal stem cells. **Biomaterials**, v. 32, p.5195-5205, 2011.

REHMAN, J.; TRAKTUEV, D.; LI, J. et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. **Circulation**. v.109, p.1292–1308, 2004.

ROSEN, A.B.; KELLY, D.J.; SCHULDT, A.J.T. et al. Finding Fluorescent Needles in the Cardiac Haystack: Tracking Human Mesenchymal Stem Cells Labeled with Quantum Dots for Quantitative In Vivo Three-Dimensional Fluorescence Analysis. **Stem Cell**, v. 25, p. 2128-2138, 2007.

SATAKE, K.; LOU, J.; LENKE, L.G. Migration of mesenchymal stem cells through cerebrospinal fluid into injured spinal cord tissue. In: **49th Annual Meeting of the Orthopaedic Society**, Luisiânia, p.78, 2003.

SCHNABEL, L.V.; LYNCH, M.E.; VAN DER MEULEN, M.C.; YEAGER, A.E.; KORNATOWSKI, M.A.; NIXON, A.J. Mesenchymal stem cells and insulin-like growth factor-I gene-enhanced mesenchymal stem cells structural aspects of healing in equine flexor *digitorum superficialis* tendons. **J. orthop. Res.**, v.27, p.1392-1398, 2009.

SHABBIR, A.; ZISA, D.; SUZUKI, G. et al. Heart failure therapy mediated by the trophic activities of bone marrow mesenchymal stem cells: a noninvasive therapeutic regimen. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.296, p.1888–1897, 2009.

SHARMA, P.; MAFFULLI, N. Biology of tendon injury: healing, modeling and remodeling. **J Musculoskelet Neuronal Interact**, v.6, n.2, p.181-190, 2006.

SMITH, R.K.W.; KORDA, M.; BLUNN, G.W. et al. Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. **Equine Vet. J.**, v.35, n.1, p.99-102, 2003.

SOUZA, L. C. G. et al. A comparação entre o transplante de células tronco mononucleares e mesenquimais no infarto do miocárdio. **Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery**, v. 20, n. 3, p. 270-278, 2005.

STASHAK, T.S. Disease and problems of tendons, ligaments and tendon sheaths. In: **Adams Lameness in the Horse**. 5th Ed. Lippincot, Williams and Wilkins. Pp 594-640. 2002.

STEWART, M.C.; STEWART, A.A. Mesenchymal stem cells: Characteristics, sources, and mechanisms of action. **Vet. Clin. Equine**, v.27, p.243-262, 2011

TAYLOR, S.E.; CLEGG, P.D. Collection and propagation methods for mesenchymal stromal cells. **Vet. Clin. Equine**, v.27, p.263-275, 2011.

TOMIYAMA, K.; MURASE, N.; STOLZ, D.B.; TOYOKAWA, H.; O'DONNELL, D.R.; SMIYH, D.M.; DUDAS, J.R.; RURIN, J.P.; MARRA, K.G. Characterization of transplanted Green fluorescent protein+ bone marrow cells into adipose tissue. **Stem Cells**, v.26, p. 330-338, 2008.

VAUGHAN, L.C.; EDWARDS, G.B.; GERRING, E.L. Tendon injuries in horses treated with carbon fibre implants. **Equine Vet. J.**, v.17, p.45–50, 1985.

VIDAL, M.A.; ROBINSON, S.O.; LOPEZ, M.J.; PAULSEN, D.B.; BORKHSENIUS, O.; JONHSON, J.R.; MOORE, R.M.; GIMBLE, J.M. Comparison of chondrogenic potential in equine mesenchymal stromal cells derived from adipose tissue and bone marrow. **Vet. Surg.**, v.37, n.8, p.713-724, 2008.

WARFVINGE, K.; KIILGAARD, J.; LAVIK, E. Retinal progenitor cell xenografts to the pig retina: morphological integration and cytochemical differentiation. **Arch Ophthalmol**. v.123, p.1385-1393, 2005.

WEIR, C.; MOREL-KOPP, M.C.; GILL, A. et al. Mesenchymal stem cells: Isolation, characterization and *in vivo* fluorescent dye tracking. **Heart, lung and circulation**, v.17, p.395-403, 2008.

WU, X.; BRUCHEZ, M. P. Labeling cellular targets with semiconductor quantum dot conjugates. **Methods in cell biology**, v. 75, p. 171-183, 2004.

XIAO, Y.; FORRY, S.P.; GAO, X. et al. Desyeanrchemics and mechanisms of quantum dot nanoparticle cellular uptake. **Journal of Nanobiotechnology**, v.8, p.1-9, 2010.

YAO, J.; KOROTKOVA, T.; SMITH, R.L. Viability and proliferation of pluripotential cells delivered to tendon repair sites using bioactive sutures--an in vitro study. **J Hand Surg Am**, v.36, p.252-258, 2011.

ZHENG, Z.H.; LI, X.Y.; DING, J. et al. Allogeneic mesenchymal stem cell and mesenchymal stem cell-differentiated chondrocyte suppress the responses of type II collagen-reactive T cells in rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, v. 47, p.22–30, 2008.

ZHU, L.; CHANG, D.W.; DAI, L. et al. DNA damage induced by multiwalled carbon nanotubes in mouse embryonic stem cells. **Nano Lett.**, v.7, p. 3592–3597, 2007.

TRABALHO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences)

Política Editorial

O periódico *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science)*, ISSN 0102-0935

(impresso) e 1678-4162 (on-line), é editado pela FEPMVZ Editora, CNPJ: 16.629.388/0001-24, e destina-se à publicação de trabalhos científicos sobre temas de medicina veterinária, zootecnia, tecnologia e inspeção de produtos de origem animal e áreas afins.

Os trabalhos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Corpo Editorial, com assessoria de especialistas da área (relatores). Os trabalhos cujos textos necessitarem de revisões ou correções serão devolvidos aos autores. Os aceitos para publicação tornam-se propriedade do *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações neles contidos. São imprescindíveis originalidade, ineditismo e destinação exclusiva à Revista.

Reprodução de artigos publicados: A reprodução de qualquer artigo publicado é permitida desde que seja corretamente referenciado. Não é permitido o uso comercial dos resultados.

A submissão dos trabalhos é feita exclusivamente on-line, no endereço eletrônico <www.abmvz.org.br>.

Tipos de artigos aceitos para publicação

Artigo científico. É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa. Seções do texto: Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão e Conclusões. O número total de páginas não deve exceder a 15.

Relato de caso. Contempla principalmente as áreas médicas, em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada. Seções do texto: Introdução, Casuística, Discussão e Conclusões (quando pertinentes). O número total de páginas não deve exceder a 10.

Comunicação. É o relato sucinto de resultados parciais de um trabalho experimental, dignos de publicação, embora insuficientes ou inconsistentes para constituírem um artigo científico. Levantamentos de dados (ocorrência, diagnósticos, etc.) também se enquadram aqui. Deve ser compacto, com no máximo seis páginas impressas, sem distinção das seções do texto especificadas para “Artigo científico”, embora seguindo aquela ordem. Quando a comunicação for redigida em português deve conter um “Abstract” e quando redigida em inglês deve conter um “Resumo”.

Preparação dos manuscritos para publicação

Os trabalhos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impessoal. Para ortografia em inglês recomenda-se o *Webster's Third New International Dictionary*. Para ortografia em português adota-se o *Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa*, da Academia Brasileira de Letras.

Os trabalhos submetidos em inglês deverão conter resumo em português e vice-versa. Os trabalhos e ilustrações deverão ser apresentados em Microsoft Word, folha no formato A4, fonte Times New Roman tamanho 12, espaço entre linhas 1,5, margens de 3cm, com páginas e linhas numeradas (numeração contínua).

Seções de um trabalho

Título. Em português e em inglês. Deve ser o resumo do resumo e não ultrapassar 100 dígitos.

Autores. Os nomes dos autores virão abaixo do título, com identificação da instituição a que pertencem. Deve estar indicado o autor para

correspondência com endereço completo, telefone, fax e e-mail.

Resumo e Abstract. Devem conter no máximo 200 palavras em um só parágrafo. Não repetir o título. Cada frase é uma informação. Atenção especial às conclusões.

Palavras-chave e Keywords. No máximo cinco.

Introdução. Explicação concisa, na qual são estabelecidos brevemente o problema, sua pertinência, relevância e os objetivos do trabalho.

Material e Métodos. Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Não usar subtítulos.

Nos trabalhos que envolvam animais ou organismos geneticamente modificados deverá constar o número do protocolo de aprovação do Comitê de Bioética e/ou de Biossegurança.

Resultados. Apresentar clara e objetivamente os principais resultados encontrados.

Discussão. Discutir somente os resultados obtidos no trabalho.

Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto.

Conclusões. As conclusões devem estar apoiadas nos dados da pesquisa executada.

Ilustrações. São tabelas e figuras. Toda ilustração que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, dados sobre a fonte (autor, data) e a correspondente referência deve figurar na lista bibliográfica final.

Tabela. Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação do cabeçalho e no final da tabela. A

legenda recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Tab., mesmo quando se referir a várias tabelas.

Figura. Qualquer ilustração constituída ou que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema etc. As legendas recebem inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Fig., mesmo se referir a mais de uma figura. As figuras devem ser enviadas em arquivo separado, extensão.jpg.

Agradecimentos. Devem ser concisamente expressados.

Referências bibliográficas. As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética.

Citações bibliográficas

Citações no texto deverão ser feitas de acordo com ABNT/NBR 10520 de 2002. A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:

- autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88)
- dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974)
- mais de dois autores: (Ferguson et al., 1979) ou Ferguson et al. (1979)
- mais de um trabalho citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson et al. (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson et al., 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para trabalhos do mesmo ano.

Citação de citação. Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão citado por e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Na listagem de referência, deve-se incluir apenas a fonte consultada.

Comunicação pessoal. Não fazem parte da lista de referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

Referências bibliográficas

São adotadas as normas ABNT/NBR-6023 de 2002, simplificadas conforme exemplos:

Periódicos

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. *Not. Med. Vet.*, n.1, p.13-20, 1984.

Publicação avulsa

DUNNE, H.W. (Ed). *Enfermedades del cerdo*. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA

VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. *Anais...* São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). *Enfermedades del cerdo*. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.

SOUZA, C.F.A. *Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte*. 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Documentos eletrônicos

QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em:

<<http://www.org/critca16.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more combative, organized. *Miami Herald*, 1994. Disponível em:

<[http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerld-Summit-Related Articles/](http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerld-Summit-Related%20Articles/)>. Acessado em: 5 dez. 1994.

Taxas de publicação

Taxa de submissão. A taxa de submissão de R\$30,00 deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico

de submissão de artigos. Ao solicitar o boleto bancário, o autor informará os dados para emissão da nota fiscal. Somente trabalhos com taxa paga de submissão serão avaliados.

Taxa de publicação. A taxa de publicação de R\$55,00, por página impressa, será cobrada do autor indicado para correspondência, por ocasião da prova final do artigo. Se houver necessidade de impressão em cores, as despesas correrão por conta dos autores. A taxa de publicação deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico de submissão de artigos. Ao solicitar o boleto bancário, o autor informará os dados para emissão da nota fiscal.

Uso de células mononucleares da medula óssea no tratamento de tendinites

induzidas experimentalmente em equinos.

**The use of mononuclear cells from bone marrow on the treatment of
experimentally induced tendinitis in horses.**

Patricia G.G. Oliveira¹⁴, Ana Liz G. Alves², Armando de M. Carvalho², Carlos A. Hussni², Marcos J. Watanabe², René L. Amorim¹⁵, Marcela M.P. Rodrigues³, Ligia S. Mota¹⁶

Resumo - Foram induzidas lesões no tendão flexor digital superficial (TFDS) de ambos os membros anteriores de seis equinos, seguida de implante autólogo de células da fração mononuclear de medula óssea em apenas um membro de cada animal. Os animais foram avaliados por parâmetros clínicos, ultrassonográficos, histopatológico e imunoistoquímico. Paralelamente, realizou-se o cultivo de novas amostras para a caracterização das células utilizando-se marcadores CD34 e CD45 por meio da citometria de fluxo, confirmando a presença de células mesenquimais na fração mononuclear. A caracterização das fibras colágenas tipo I e tipo III no tecido neoformado mostraram melhora na qualidade da cicatrização tendínea dos membros tratados. A terapia com implante autólogo das células da fração mononuclear melhorou a organização tecidual e a sua qualidade, apresentando uma maior expressão significativa para colágeno tipo I.

Palavras-chave: equino, célula-tronco, fração mononuclear, medula óssea, tendão

Abstract –The present study was developed inducing a lesion in the SDFT of both thoracic limbs of six horses followed by autologous implantation of mononuclear cells

¹⁴ Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, Distrito de Rubião Júnior s/n, Caixa Postal 560, CEP: 18618-000, Botucatu – SP. patriciavet@terra.com.br. Cel.: (14) 9707-7907.

¹⁵ Departamento de Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, Distrito de Rubião Júnior s/n, Caixa Postal 560, CEP: 18618-000, Botucatu – SP.

¹⁶ Departamento de Genética do Instituto de Biociências - UNESP, Distrito de Rubião Júnior s/n, Caixa Postal 560, CEP: 18618-000, Botucatu – SP.

from bone marrow in only one affect limb of each horse. The horses were evaluated by clinical and ultrasonographic exams, and by histopathologic and immunohistochemistry patterns. Concomitantly, new samples were cultivated and characterized using CD34 and CD45 markers, proving the presence of mesenchymal cells in the mononuclear fraction. The characterization of collagen fibers type I and type III in the new tissue has showed an improvement in tendon healing in treated limbs. The therapy with autologous implant of the mononuclear fraction has improved tissue organization and its quality, having a significant higher expression of collagen type I.

Key words: equine, stem cell, mononuclear fraction, bone marrow, tendon

INTRODUÇÃO

Lesões tendíneas e ligamentares afetando os tendões digitais (superficial e profundo) e o aparato suspensório são importantes causas de claudicação em cavalos atletas, resultando em queda de desempenho e possível afastamento do animal das pistas. Essas lesões se apresentam como ruptura parcial ou total das fibras tendíneas, geralmente afetando o tendão flexor digital superficial (TFDS) (Alves et al., 2001). Os quadros de tendinite possuem alta incidência, e necessitam de um longo período de reabilitação. Os atuais tratamentos são de baixa eficácia na modulação do tecido cicatricial, ocorrendo variações em sua força e resistência, resultando em uma função reduzida do novo tecido e o predispondo à recidivas. A utilização da ultrassonografia para a avaliação de estruturas tendo-ligamentares permite melhor definição do diagnóstico, caracterizando o tipo da lesão e da estrutura afetada, sendo possível instituir um prognóstico mais adequado (Alves et al., 2001).

Estudos recentes vêm se concentrando no potencial terapêutico das células tronco (CT), verificando sua possibilidade de aplicação em enfermidades complexas, ou em lesões de difícil cicatrização. As células tronco mesenquimais possuem capacidade

de auto-replicação, além da habilidade de se diferenciar em fibroblastos, osteoblastos, condrócitos, tenócitos, adipócitos e miofibroblastos, de acordo com o estímulo local (Fortier e Smith, 2008). Essa diferenciação ocorre por toda a vida, tornando seu estudo particularmente interessante em lesões do sistema músculo-esquelético.

Dentre as células mononucleares estão presentes as células tronco mesenquimais. O uso da fração mononuclear em tratamentos de lesões ortopédicas possui a vantagem de permitir a realização do implante no momento do diagnóstico, com menor tempo de preparo das células e custo reduzido, e ainda aumenta a concentração de células tronco mesenquimais para o implante direto após a coleta de medula óssea quando comparado ao uso da medula óssea total (Barreira et al., 2008).

Este trabalho teve o objetivo de avaliar a qualidade da cicatrização tendínea nos membros tratados de equinos com implante de células mononucleares provenientes da medula óssea, por meio do acompanhamento clínico e ultrassonográfico, e avaliar as características morfológicas do tecido neoformado.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi aprovada pela Câmara de Ética em Experimentação Animal (número 18/2006). Foram utilizados seis equinos, distribuídos em dois grupos para formar seis membros em cada grupo, e receber os tratamentos, após indução de tendinite pela aplicação de colagenase. Os animais, entre dois e três anos, quatro fêmeas e dois machos, da raça Árabe, foram mantidos em Hospital Veterinário Escola.

No dia zero do experimento, induziu-se a lesão no tendão flexor digital superficial (TFDS) de ambos os membros torácicos por meio de injeção intratendínea de colagenase tipo I (1ml; 2,5mg/ml - Sigma-Aldrich C-0130). Após a indução, os animais foram tratados com fenilbutazona (2,2mg/kg), IV, uma vez ao dia durante sete dias. Os tendões lesados foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos: os do GT

foram tratados e os do GC usados como controle. Ao 12º dia do experimento, os equinos do GT receberam o implante das células da fração mononuclear. Os animais foram submetidos ao esquema de atividade física crescente após a indução da lesão, composta por caminhadas diárias, como apresentado a seguir: do 15º ao 45º dia, andar ao passo, por 15 minutos, uma vez ao dia; do 46º ao 60º dia, andar ao passo, por 15 minutos, duas vezes ao dia; do 61º ao 90º dia, andar ao passo, por 30 minutos, uma vez ao dia; do 91º ao 120º dia, andar ao passo, por 30 minutos, duas vezes ao dia. Aos 120 dias, todos os membros anteriores foram submetidos à biópsia de fragmento dos tendões flexores digitais superficiais.

Para a coleta de sangue da medula óssea realizaram-se sedação e bloqueio anestésico local em região das esternebras e introdução de agulha *Komiyashiki* 11G, no interior da medula óssea da quinta esternebra. Com auxílio de uma seringa de 20 mL contendo 1 mL de heparina, coletou-se o material. O volume total coletado foi, em média, de 15-20 mL de sangue. O sangue foi imediatamente homogeneizado, acondicionado em caixa térmica e encaminhado ao Departamento de Genética e Citogenética Animal.

O sangue foi inicialmente filtrado em equipo de transfusão, lavado com solução salina tamponada com fosfato Dulbecco's PBS (DPBS) e depositados em Histopaque (d=1,0770) . Os tubos foram centrifugados para separação dos constituintes do sangue por gradiente de densidade. Após a centrifugação, formou-se um halo esbranquiçado no meio do tudo contendo as células mononucleares que foi separado e lavado com DPBS. Seguiu-se à contagem das células e ao teste de viabilidade celular por exclusão do azul de tripan 0,2%. Para o implante, o material foi ressuspensão em 0,5mL de soro autólogo recém coletado. Os membros que compunham o GT receberam injeção intratendínea de

células mononucleares de medula óssea e os membros do GC receberam injeção de 0,5mL de solução salina 0,9%.

Os animais foram acompanhados por meio de exames físicos e ultrassonográficos desde o dia 0 até o 120º dia, quando foi realizada biópsia tendínea para verificação das características histológicas e imunoistoquímicas. As características avaliadas ao exame físico foram grau de claudicação - escores de 0 a 5 -, presença de sensibilidade e aumento de volume. Procedeu-se ainda ao exame ultrassonográfico dos animais nos dias 12 - momento 1 (M1), momento 30 (M2), momento 60 (M3), momento 90 (M4) e momento 120 (M5) -, para que fossem avaliados o tamanho do tendão e da lesão / o percentual da área lesada no interior do tendão / o alinhamento de fibras e / a ecogenicidade, graduada de 0 a 4, da seguinte forma: 0 - padrão normal (ecóico); 1 - queda de 25% do padrão ecóico (predominantemente ecóico); 2 - queda de 50% do padrão ecóico; 3 - queda de 75% do padrão ecóico (predominantemente anecóico); 4 - queda de 100% do padrão ecóico (totalmente anecóico).

Uma nova coleta foi feita um mês após o implante, para que fosse realizado o cultivo e a marcação celular com CD34 e CD45, confirmando a presença de células mesenquimais na amostra. Para tanto, após a separação da fração mononuclear, esta foi posta em garrafas de cultura e cultivadas por 10 a 15 dias até atingirem confluência 80%. Após este período, as células presentes foram marcadas com anticorpos CD34 e CD45, conforme instruções do fabricante, e analisadas em citômetro de fluxo.

Para a avaliação das alterações histológicas da reparação dos tendões lesados foram considerados: quantidade e características dos fibroblastos, presença de neovascularização, presença de fibras colágenas, aparência da matriz extracelular e seu arranjo, e também, o grau de organização tecidual. Para determinação da expressão dos

colágenos foi mensurado o porcentual de células marcadas, com auxílio do programa Leica QWin, por meio do processador de imagens binárias.

Para as variáveis não-paramétricas, recorreu-se aos testes de Friedman e de Wilcoxon para amostras pareadas. Para as variáveis quantitativas contínuas utilizou-se a metodologia de análise de variância para medidas repetidas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A realização de biópsia tendínea permitiu a avaliação histopatológica, observando-se a organização tecidual, e imunoistoquímica, com a caracterização das fibras colágenas tipo I (presentes no tendão sadio) e tipo III (presentes no tecido cicatricial).

O número médio de células obtidas, a viabilidade e o número de células viáveis totais foram, respectivamente: $42,92 \times 10^6$, 85,5% e $36,7 \times 10^6$.

O teste de viabilidade celular antes do implante celular realizado por Perin et al. (2004), resultou em 96% de viabilidade e o de Barreira (2008) 76%.

O uso da fração mononuclear no tratamento de lesões ortopédicas em equinos tem a vantagem de poder ser realizada no momento do diagnóstico, com menor tempo de preparo das células e custos, no entanto, esta é uma mistura heterogênea de tipos celulares (Richardson et al., 2007). O cultivo das células provenientes da fração mononuclear confirmou a existência de células mesenquimais, sendo caracterizado pela capacidade de crescimento celular e sua aderência ao plástico. As células cultivadas apresentaram 12% de marcação para CD34 e 78% para CD45, ambos em primeira passagem.

A hipocogenicidade da lesão no exame ultrassonográfico auxiliou a sua visualização, facilitando a realização do implante em seu exato local. Ocorreu mudança na ecogenicidade da lesão logo após o momento do implante celular, o que se deve à

maior ecogenicidade produzida pela alta concentração celular, que a curto prazo pode ser considerada erroneamente uma melhora da lesão.

Todas as características avaliadas ao exame físico avaliados mostraram melhora gradativa por todo o período. A claudicação e o aumento de temperatura local foram as primeiras características a regredir completamente ao primeiro mês, ao contrário do aumento de volume, que permaneceu leve até o momento da biópsia, em quatro animais. O grau de claudicação foi variável, a partir, em média do grau 2, em ambos os grupos.

Quanto à atividade locomotora após a administração de colagenase, observou-se claudicação moderada, que não estava mais presente aos 35 dias. Estes dados assemelham-se aos de Foland et al. (1992), que relataram aparecimento imediato de claudicação moderada após aplicação de colagenase, e aos de Marxen et al. (2004), que observaram, após 24 horas da lesão, claudicação entre 2 e 3, que se reduziu gradualmente até os 45 dias. A claudicação em grau moderado é um dos primeiros sinais a serem observados na clínica, quando o desenvolvimento da tendinite é resultante de esforço devido ao exercício, seguido de ruptura de fibras, o que, de forma similar, ocorre na indução da tendinite com o uso de colagenase. Esta claudicação inicia-se em grau moderado, torna-se leve em alguns dias e discreto ao redor de 30 dias, seja na clínica ou na tendinite experimental.

O maior valor da lesão e sua maior porcentagem de comprometimento das fibras foi observada aos 30 dias (M2), reduzindo-se gradualmente com o passar do tempo. Apesar de a área da lesão do grupo tratado ter-se iniciado com valor maior que o do grupo controle, este quadro inverteu-se no decorrer da pesquisa. A porcentagem de comprometimento de fibras, calculada pela relação entre a área lesada e área total do tendão, revelou-se semelhante à situação apresentada pela área da lesão. Ambas

atingiram o seu maior valor aos 30 dias, sendo os valores do grupo tratado maior que os do grupo controle, ocorrendo inversão do quadro aos 60 dias, com maior valor no grupo controle. A porcentagem de área lesada média foi significativamente menor ao 120º dia do que ao 12º ($P=0,0003$) e ao 30º dias ($P<0,0001$), em ambos os grupos. Ainda, a média da ecogenicidade da lesão inicial foi a mesma em ambos os grupos, com seu maior valor aos 30 dias. Para o GT ocorreu mudança significativa do escore de ecogenicidade ao longo do tempo ($P<0,001$), assim como para GC ($P=0,003$), e não houve diferença significativa entre os dois grupos, em todas as avaliações ($P>0,05$). A lesão tendínea continuou a se desenvolver até, aproximadamente, 21 dias em razão da ação da colagenase ou mesmo do edema produzido, que comprimia as células sadias ao seu redor, causando a morte celular de tenócitos. Este maior valor da lesão ocorreu até os 30 dias. O valor da ecogenicidade ao exame ultrassonográfico confirma esta continuidade de desenvolvimento da lesão até M2.

Outro dado importante foi a porcentagem de redução do tamanho da lesão em relação à sua maior área (30 dias) nos diferentes momentos consecutivos, de forma a comparar a sua real progressão. Tanto em GT quanto em GC a porcentagem de redução da lesão aumentou à medida que a avaliação se afastou do 30º dia, e, adicionalmente, houve uma diferença significativa ($P=0,0143$) entre o percentual de redução da lesão dos grupos tratado e controle, sempre maior no grupo tratado (Fig. 1). Isso comprova a eficiência das células mononucleares como tratamento de lesões tendíneas em equinos, com seu melhor preenchimento.

Os resultados do exame ultrassonográfico demonstraram que os 120 dias de acompanhamento não foram suficientes para que as lesões atingissem a normalidade do padrão ecóico. Os valores de comprometimento das fibras foram, em média, de 40% no grupo tratado e 33% no grupo controle. Este achado assemelha-se ao observado por

Sutter (2007), que descreveu um aumento da área lesada aos 30 dias após a lesão, como resposta ao trauma. De maneira semelhante, lesões induzidas pela aplicação de colagenase foram mais severas ao redor dos 20 dias, conforme descrito por Marxen et al. (2004). Aos 120 dias, houve redução da porcentagem de área lesada, atingindo valores de 16% no grupo tratado e 11% no grupo controle, não sendo este um período suficiente para a completa cicatrização da lesão, resultado semelhante ao obtido por Alves et al. (2001). O valor da ecogenicidade máxima após a indução da lesão foi grau 3,5 para os grupos tratado e controle. Lesões obtidas no presente experimento foram mais severas quanto à ecogenicidade que as observadas por Barreira et al. (2008), que obtiveram lesões de ecogenicidade grau 2,5. Aos 120 dias, a ecogenicidade apresentada foi grau 1 no GT e 1,3 em GC, mostrando que este tempo não foi suficiente para a normalização da ecogenicidade. Resultados descritos por Alves et al. (2001) aos 120 dias após a lesão, mostraram que o grau de ecogenicidade variou de 1 a 2, semelhantes aos também observados por Marxen et al. (2004), aos 150 dias pós lesão.

Os resultados obtidos na avaliação histológica realizada ao 120º dia após a indução da lesão mostraram que todos os animais apresentavam fibroplasia, de maneira semelhante aos relatos existentes na literatura (Goodship et al., 1994). Marxen et al. (2004) descreveram que, independentemente do tratamento aplicado à lesão tendínea, foram observados graus intensos de vascularização aos 150 dias, com grande número de vasos reciduais e recém formados por todo fragmento tendíneo.

Silver et al. (1983) descreveram hiper celularidade aos 14 meses após a indução experimental da lesão tendínea, observando o alinhamento de fibras, porém ainda com anormalidades histológicas. Os fibroblastos nos equinos do grupo tratado, ainda com alta celularidade, apresentaram núcleos mais alongados, e coloração da matriz mais forte que nos do grupo controle. No GT foram observadas fibras colágenas com maior

organização e alinhamento, porém ainda não semelhante ao tecido sadio. Os núcleos do fibroblastos encontravam-se alongados, porém a celularidade ainda foi alta se comparado à celularidade encontrada no tendão normal, em ambos os grupos. Os animais do GC apresentaram fibroblastos com núcleos mais arredondados e fibras com menor organização das fibras (Fig. 2).

Quanto à presença de neovascularização, os equinos do GC apresentaram maior quantidade de pequenos vasos, sendo estes de parede mais espessa. Os vasos não foram identificados em grande número na maioria dos cortes histológicos, diferentemente do que foi identificado por Silver et al. (1983), e em equinos tratadas com glicosaminoglicanos polisulfatados, quando foi descrito uma vascularização em grande intensidade (Marxen et al., 2004). Marr et al. (1993) relataram que a diminuição da celularidade e da vascularização são indicativas de progressiva maturação do tecido de granulação, pois a deposição de colágeno exerce pressão mecânica sobre as delicadas paredes de capilares neoformados, levando à diminuição da vascularização.

O efeito do tratamento com células da fração mononuclear de medula óssea, em especial das células precursoras mesenquimais, aplicadas às lesões tendíneas induzidas neste experimento, possibilitou melhor reparo tendíneo sob aspectos histológicos. Esta consideração está de acordo com dados divulgados por Herthel (2001), porém em resultados baseados nas análises clínica, ultrassonográfica e funcional das estruturas tendo-ligamentares. Barreira et al. (2008), ao avaliarem histologicamente lesões tratadas com células tronco mesenquimas contidas na fração mononuclear 48 dias após a sua indução, constataram redução da inflamação neste período.

O protocolo de exercícios adotado promoveu estresse longitudinal das fibras tendíneas, sendo observada melhora na organização tecidual em ambos os grupos,

concordando com um período mínimo de 90 dias para avaliação da cicatrização, conforme descreveram Goodship (1994) e Alves et al. (2001).

Para que se institua um tratamento com células mononucleares ou mesmo com células-tronco é necessário que se forme um tecido de granulação de suporte, que promova a adesão das células injetadas sem que haja fibrose substancial (Smith, 2004). Lesões centrais, com uma região hipocócica, devem ser ainda visíveis, como as geralmente apresentadas nas tendinites do flexor digital superficial em equinos, e se preecherem rapidamente, no momento do implante (Fortier e Smith, 2008).

Na avaliação imunoistoquímica, o anticorpo para colágeno tipo I mostrou marcação positiva de 46,9% no grupo tratado e de 36,5% no grupo controle. Essa diferenciação foi significativa ($P=0,0313$). Este resultado sinaliza uma maior quantidade de colágeno do tipo I presente no grupo tratado que no grupo controle, sendo este tipo caracterizado como a principal fibra constituinte do tendão sadio. Quanto ao colágeno tipo III, que identifica a fibra colágena existente no tecido cicatricial, este foi encontrado em 31,3% no GC e em 25,9% no GT, e esta diferença não foi significativa ($P=0,312$) (Fig. 3).

Durante o processo cicatricial, a fase proliferativa inicial é marcada por um pico na expressão de colágeno tipo III. Posteriormente, na fase de organização, a fibra colágena do tipo III é substituída por fibra colágena tipo I (Matsumoto et al., 2002). Os resultados da imunoistoquímica revelaram maior quantidade de colágeno tipo I se comparada ao tipo III, resultando em melhor cicatrização. Porém, a quantidade de colágeno tipo III marcada ainda foi alta, representando a continuidade do processo de cicatrização. Observou-se diferença significativa na marcação para colágeno tipo I entre os grupos, maior no grupo tratado, porém não para colágeno tipo III. Crovace et al. (2007) descreveram a presença de colágeno tipo I maduro em animais tratados com

implantes de células da fração mononuclear e de células mesenquimais cultivadas, e que apresentavam arquitetura tendínea normal entre 16 e 21 semanas após a indução de lesão. O grupo placebo apresentou maior quantidade de colágeno tipo III e menor organização. Hankemeier et al. (2007) também verificaram melhora na qualidade do tecido cicatricial e de sua resistência pela razão apresentada entre colágeno tipo I:colágeno tipo III, ao avaliarem lesões ligamentares em humanos. Na análise bioquímica de lesões tendíneas não tratadas, foi caracterizado um alto nível de colágeno tipo III em relação ao colágeno tipo I, sendo mantida a quantidade total de colágeno (Birch et al., 1997). Nesse caso, a marcação para fibras colágenas do tipo I e III foi difusa. Satomi et al. (2008) descreveram a marcação via imunofluorescência para colágeno tipo I e III na tendinose em humanos com distribuição semelhante, sendo a fibra colágena tipo I marcada de forma discreta e difusa, como também para fibra colágena tipo III, porém mais proeminente.

CONCLUSÕES

- 1- A terapia celular tendínea com células mononucleares da medula óssea melhora a organização tecidual ao promover um maior alinhamento das fibras e maior porcentual de redução da área lesada. O tecido neoformado é de melhor qualidade quando tratado com células mononucleares, por apresentar uma maior expressão de fibras colágenas tipo I aos 120 dias de tratamento.

Agradecimentos - Agradecemos à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo) pela concessão de bolsa de Mestrado.

BIBLIOGRAFIA

ALVES, A.L.G.; RODRIGUES, M.A.M.; AGUIAR, A.J.A. et al. Effects of the beta-aminopropionitrile fumarate and exercise on equine tendon healing: gross and histological aspects. *J. Equine Vet. Sci.*, v. 21, p.335-340, 2001.

BARREIRA, A.P.B.; ALVES, A.L.G.; SAITO, M.E. et al. Autologous Implant of Bone Marrow Mononuclear Cells as Treatment of Induced Equine Tendinitis. *Intern. J. Appl. Res. Vet. Med.*, v. 6, p.46-54, 2008.

BIRCH, H.L.; WILSON, A.M.; GOODSHIP, A.E. The effect of exercise-induced localised hyperthermia on tendon cell survival. *J. Exp. Biol.*, v. 1, p. 1703-1708, 1997.

CROVACE, A.; LACITIGNOLA, L.; DE SIENA, R. et al. Cell therapy for tendon repair in horses: an experimental study. *Vet. Res. Commun.*, v. 31, p.281-283, 2007.

FOLAND, J.W.; TROTTER, G.W.; POWERS, B.E. et al. Effect of sodium hyaluronate in collagenase induced superficial digital flexor tendinitis in horses. *Am. J. Vet. Res.*, v. 53, p. 2371-2376, 1992.

FORTIER, L.A.; SMITH, R.K. Regenerative medicine for tendinous and ligamentous injuries of sport horses. *Vet. Clin. N. Am. Equine Pract.*, v. 24, p. 191-201, 2008.

GOODSHIP, A.E.; BIRCH, H.L.; WILSON, A.M. The pathobiology and repair of tendon and ligament injury. *Vet. Clin. N. Am. Equine Pract.*, v. 10, p. 323-349, 1994.

HANKEMEIER, S.; VAN GRIENSVEN, M.; EZECHIELI, M. et al. Tissue engineering of ligaments by human bone marrow stromal cells in a liquid fibrin matrix: histological, biomechanical, and molecular biological results of a study with immunodeficient rats. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*, v.127, p.815-821, 2007.

HERTHEL, D.J. Enhanced suspensory ligament healing in 100 horses by stem cells and other bone marrow components. In: AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 47., 2001, San Diego. *Proceedings...* San Diego: 2001.p.319-321.

MARR, C.M.; McMILLIAN, I.; BOYD, J.S. et al. Ultrasonography and histopathological findings in equine superficial digital flexor tendon injury. *Equine Vet. J.*, v.25, n. 1, p.23-29, 1993.

MARXEN, S.; NETO, J.C.L.; CANOLA, J.C. et al. Polissulfato de glicosaminoglicanas no tratamento intralesional de tendinite induzida em eqüinos: avaliação clínica, ultrasonográfica e histopatológica. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 56, p.701-708, 2004.

MATSUMOTO, F.; TRUDEL, G.; UHTHOFF, H. High collagen type I and low collagen type III levels in knee joint contracture. *Acta Orthop. Scand.*, v. 73, p. 335-343, 2002.

PERIN, E.C.; DOHMANN, H.F.; BOROJEVIC, R. et al. Improved exercise capacity and ischemia 6 and 12 months after transendocardial injection of autologous bone marrow mononuclear cells for ischemiccardiomyopathy. *Circulation*, v.110, p.213-218, 2004.

Assad JA, Carvalho AC, Branco RV, Rossi MI, Dohmann HJ, Willerson JT

RICHARDSON, L.E.; DUDHUA, J.; CLEGG, P.D. et al. Stem cells in veterinary medicine- attempts at regenerating equine tendon after injury. *Trends Biotechnol.*, v.25, p.409-416, 2007.

SATOMI, E.; TEODORO, W.R.; PARRA, E.R. et al. Changes in histoanatomical distribution of types I, III and V collagen promote adaptative remodeling in posterior tibial tendon rupture. *Clinics*, v.63, n. 1, p.9-14, 2008.

SILVER, I.A.; BROWN, P.N.; GOODSHIP, A.E. et al. A clinical and experimental study of tendon injury, healing and treatment in the horse. *Equine Vet. J. Suppl.*, v.1, p. 1-43, 1983.

SMITH, R.K.; KORDA, M.; BLUNN, G.W. et al. Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. *Equine Vet. J.*, v. 35, p.99-102, 2003.

SMITH, R.K.W. Stem cell therapy for tendon and ligament injuries – clinical results. In: EUROPEAN SOCIETY OF VETERINARY ORTHOPAEDICS AND TRAUMATOLOGY CONGRESS, 12., 2004, Munique. *Proceedings...Munique*, 2004. p.187-188.

SPURLOCK, G.H.; SPURLOCK, S.L.; PARKER, G.A. Evaluation of Hylartin V therapy for induced tendinitis in the horse. *Equine Vet. Sci.*, v. 9, p.242- 246, 1989.

SUTTER, W.W. Autologous cell-based therapy for tendon and ligament injuries. *Clin. Tech. Equine Pract.*, v. 6, p.198-208, 2007.

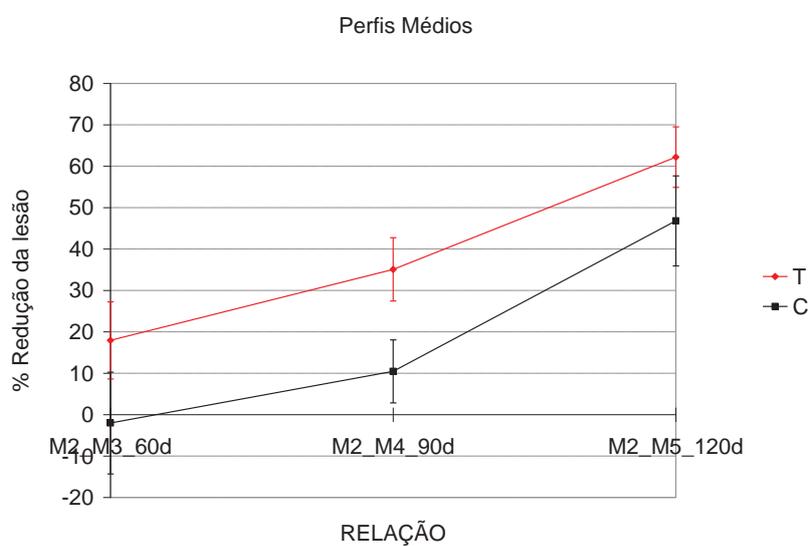


Fig. 1 - Perfis médios da porcentagem (%) de redução da lesão ao longo das avaliações dos grupos tratado (linha vermelha) e controle (linha preta).

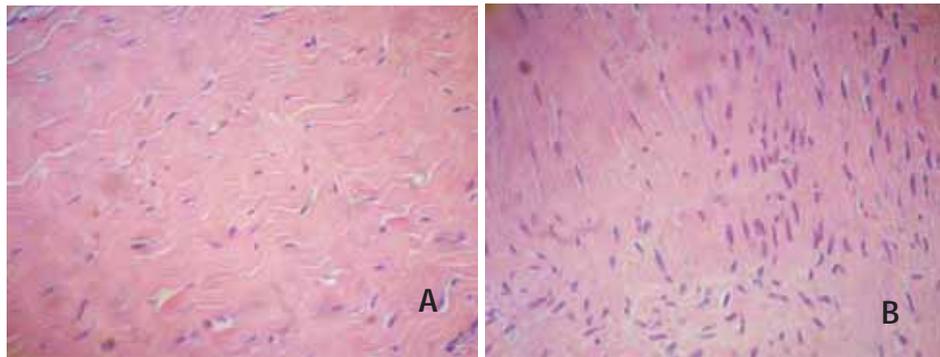


Fig. 2. - Cortes histopatológicos aos 120 dias: (A) tendão tratado apresentando núcleos alongados e ondulações das fibras. HE, obj. 40; (B) tendão do grupo controle com núcleos mais arredondados, sem padrão de ondulações. HE, obj. 40;

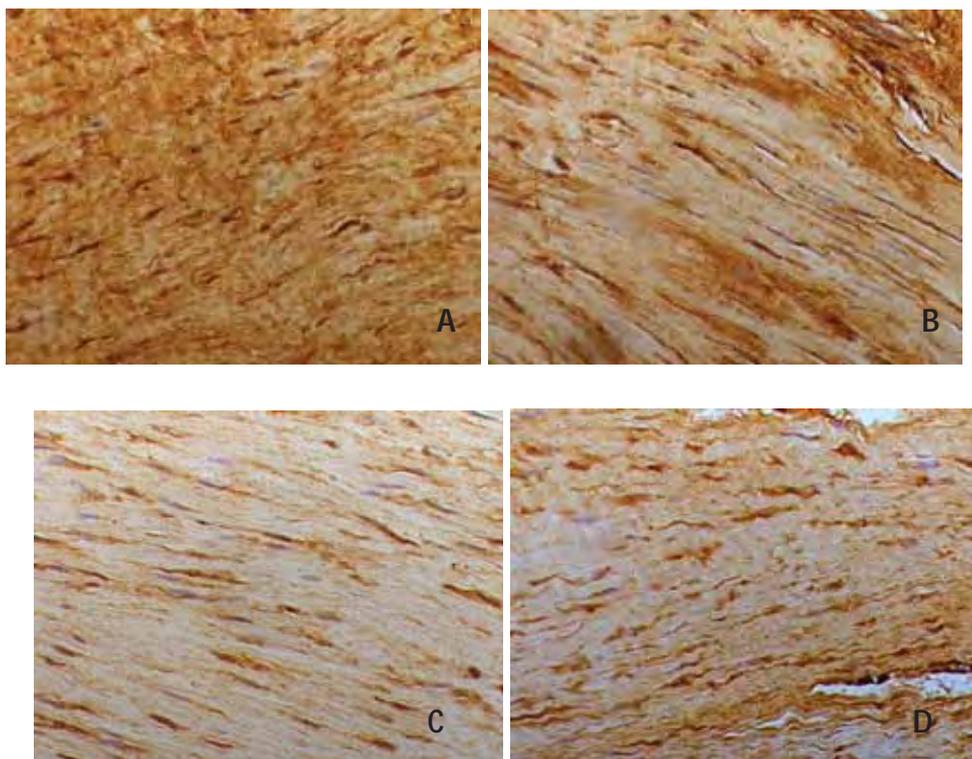


Fig. 3. - Imunoistoquímica do tecido tendíneo tratado e controle aos 120 dias: (A) colágeno tipo I membro tratado. Obj. 40; (B) colágeno tipo I membro controle. Obj. 40; (C) colágeno tipo III membro tratado. Obj. 40; (D) colágeno tipo III membro controle. Obj. 40.