

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
CAMPUS DE BOTUCATU**

**IMPLANTE AUTÓLOGO DE CÉLULAS MESENQUIMAIS NO  
TRATAMENTO DE TENDINITES INDUZIDA EM EQÜINOS:  
AVALIAÇÃO CLÍNICA, ULTRA-SONOGRÁFICA E  
IMUNOISTOQUÍMICA.**

**ANNA PAULA BALESIDENT BARREIRA**

**BOTUCATU, SP.**

**Julho, 2005**

**ANNA PAULA BALESIDENT BARREIRA**

**IMPLANTE AUTÓLOGO DE CÉLULAS MESENQUIMAIS NO  
TRATAMENTO DE TENDINITES INDUZIDAS EM EQÜINOS:  
AVALIAÇÃO CLÍNICA, ULTRA-SONOGRÁFICA,  
HISTOPATOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA**

Tese apresentada à Faculdade de  
Medicina Veterinária e Zootecnia da  
Universidade Estadual Paulista “Júlio  
Mesquita Filho, “*Campus* de Botucatu,  
para obtenção do Título de Doutor em  
Medicina Veterinária.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Ana Liz Garcia Alves

Botucatu  
2005

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO  
DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Barreira, Anna Paula Balesdent.

Implante autólogo de células mesenquimais no tratamento de tendinites induzidas em eqüinos: avaliação clínica, ultra-sonográfica, histopatológica e imunoistoquímica / Anna Paula Balesdent Barreira. – 2005.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2005.

Orientador: Prof<sup>a</sup> Ana Liz Garcia Alves

Assunto CAPES: 50501070

1. Eqüino - Cirurgia

CDD 636.1089796

Palavras-chave: Célula mesenquimal; Célula-tronco; Eqüino; Medula óssea; Tendinite.

## DEDICATÓRIA

À minha família, razão da minha existência, minha mola-mestra.

Em especial às minhas filhas pela oportunidade da descoberta do amor puro da maternidade. Desculpem-me pelas ausências, mas se vou longe, é porque tento buscar o melhor para todos nós.

Ao meu marido, meu amor, meu companheiro, pelo apoio incondicional e compreensão nos momentos de cansaço e afastamento.

À minha mãe, a quem amo intensamente, por tudo que representa, pela ajuda com minhas filhas e pelo suporte nos mais inusitados projetos.

Ao meu pai, por ter lutado pela vida durante este último ano e ter saído vencedor, dando-me a alegria de tê-lo ao meu lado neste importante momento de minha vida.

Aos meus irmãos, cunhadas, cunhados, sobrinhas, sobrinhos, afilhada e afilhado, por formarem esta linda família que me enche de alegria.

À minha sogra, uma verdadeira amiga.

A todos vocês, dedico este trabalho.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por dar-me forças e saúde para realizar este projeto longe de minha casa, família e trabalho.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Liz Garcia Alves, a quem muito admiro por sua competência, inteligência e afinco ao trabalho. Durante este período de orientação busquei uma profissional e encontrei mais que isto, encontrei uma amiga, que me apoiou em todos os momentos. Obrigada, Ana.

Aos pós-graduandos Brunna Fonseca e Marcos Watanabe, que com jeito quieto trabalham intensamente, estando sempre prontos a ajudar. À Regina Cássia Veronesi, pelo tratamento antiinflamatório dos animais.

Ao residente Bruno Carvalho, que muito me auxiliou no projeto e também ao Lucas Alfaia, ambos sempre dispostos a aprender e cooperar.

À Mere Saito, pelo trabalho de separação da fração mononuclear e viabilidade celular e à sua orientadora, Prof<sup>a</sup> Titular Aguemí Kohayagawa.

Às alunas de iniciação científica Ana Lúcia Yamada, Michele Vieira, Lílian Soares e Mayara Valinhos, que participaram do experimento.

Ao Guilherme Mendes, pelo auxílio na anestesia.

À Prof<sup>a</sup> Dra. Renée Laufer Amorim, pela amizade e ajuda durante esse período e à sua equipe, Leandro e Rafael, que sob sua orientação auxiliaram-me na análise histopatológica e imunoistoquímica.

À Prof<sup>a</sup> Lúgia de Souza Mota, pela permissão de utilização do Laboratório de Pesquisas do Departamento de Genética do Instituto de Biociências.

Ao Prof. Dr. Radovan Borojevic, que com sua sabedoria iluminou por diversas vezes o delineamento deste experimento. Também agradeço à sua equipe, em especial ao Hamilton e à Leandra pela ajuda.

À Universidade Castelo Branco, aos amigos e colegas de trabalho pelo companheirismo nesta batalha.

Aos amigos, tão importantes para a saúde mental, obrigada pelas conversas e gargalhadas.

Aos colegas, que contribuíram para a minha formação profissional.

À Inês, minha auxiliar doméstica, pela dedicação e amor ao cuidar de minha família.

Enfim, agradeço a todos que colaboraram de forma direta ou indireta para a execução deste projeto.

## LISTA DE FIGURAS

### Páginas

FIGURA 1: Esquema do delineamento experimental.....	25
FIGURA 2: Indução da lesão tendínea. A- Agulha posicionada no membro do animal. B- Imagem ultra-sonográfica da agulha dentro do TFDS.....	26
FIGURA 3: Exame ultra-sonográfico da região do osso esterno. A- Varredura. B- Imagem sonográfica da 4ª (seta amarela) e 5ª esternibras (seta azul).....	27
FIGURA 4: Punção aspirativa de medula óssea. A- Agulha parcialmente penetrada na região do esterno. B- Obtenção da amostra. C- Espículas na amostra em placa de Petri .....	28
FIGURA 5: Exame microscópio das amostras coradas por Romanowsky. A- Sangue periférico, composto por células maduras. B- Sangue de medula óssea, com células imaturas. ....	29
FIGURA 6: Separação da fração mononuclear. A- Refrigeração da amostra no transporte. B- Manipulação da amostra em fluxo laminar. C- Filtragem. D- Amostra depositada em Ficoll Hypaque. E- Centrifugação. F- Botão celular contendo fração mononuclear e pequena quantidade de PBS.. ....	30
FIGURA 7: Implante celular. A- Diluição da fração mononuclear em soro autólogo. B- Implante intratendíneo. C- Imagem ultra-sonográfica da agulha na lesão. D- Implante após infiltração...31	
FIGURA 8: Imagem ultra-sonográfica de lesão focal, do tipo 2, com comprometimento de 35% das fibras no corte transversal (esq.) e corte longitudinal (dir.).....	33
FIGURA 9: Técnica de biópsia. A- Incisão de pele e decúbito. B- Individualização do TFDS. C- Biópsia.....	34
FIGURA 10: Separação da fração mononuclear. A- Amostra coagulada, impedindo a separação da fração mononuclear. B- Teste de exclusão pelo azul tripan 0,2%.....	38
FIGURA 11: Aumento de volume no local do implante 3 dias após a técnica (seta) .....	39
FIGURA 12: Valores médios dos escores de claudicação, dos grupos experimentais nos diferentes momentos analisados .....	40
FIGURA 13: Valores médios da área total do tendão (cm <sup>2</sup> ), dos grupos experimentais nos diferentes momentos analisados .....	41
FIGURA 14: Valores médios da área de lesão (cm <sup>2</sup> ) dos grupos experimentais nos diferentes momentos analisados .....	42
FIGURA 15: Valores médios da porcentagem da área de lesão em relação à área do tendão, dos grupos experimentais nos diferentes momentos analisados .....	43
FIGURA 16: Valores médios da ecogenicidade da lesão dos grupos experimentais nos diferentes momentos analisados .....	44
FIGURA 17: Histopatologia tendínea. A- Tendão normal com fibras colágenas alinhadas e tenócitos escassos, HE, 200x. B- Tendão do grupo tratado - desorganização das fibras colágenas, HE, 200x. C- Tendão do grupo tratado - presença de fibroblastos (seta vermelha) e células arredondadas indiferenciadas, com morfologia condróide (seta verde), HE, 400x.....	46
FIGURA 18: Imunomarcagem citoplasmática para TGFβ1, ABC, DAB contra coloração Hematoxilina, ao microscópio óptico. A- Grupo tratado com menor índice de imunomarcagem, 1000x. B – Grupo controle, com maior índice de imunomarcagem, 400x.....	47
FIGURA 19: Imunomarcagem nuclear para o anticorpo Ki-67 (clone MIB1), BC, DAB contra coloração Hematoxilina, observado ao microscópio óptico 400x. A – Grupo tratado com maior índice de imunomarcagem. B – Grupo controle, com menor índice de imunomarcagem .....	47

**LISTA DE TABELAS****páginas**

TABELA 01 - Valores médios dos escores de claudicação, dos grupos experimentais, nos diferentes momentos analisados .....	40
TABELA 02 - Valores médios da área total do tendão (cm <sup>2</sup> ), dos grupos experimentais nos diferentes momentos analisados .....	41
TABELA 03 - Valores médios da área de lesão (cm <sup>2</sup> ) dos grupos experimentais nos diferentes momentos analisados .....	42
TABELA 04 - Valores médios da porcentagem da área de lesão em relação ao tendão, dos grupos experimentais, nos diferentes momentos analisados .....	43
TABELA 05 - Valores médios dos escores de ecogenicidade da lesão, dos grupos experimentais, nos diferentes momentos analisados .....	44

**LISTA DE ABREVIATURAS**

CM	centímetros
CT	célula-tronco
DOCA	distal ao osso carpo-acessório
EUA	Estados Unidos da América
FBAPN	fumarato de betaminopropionitrila
IGF-1	fator de crescimento tipo insulina 1
L SUS	ligamento suspensório do boleteo
LAPP	ligamento anular palmar proximal
LA-TFDP	ligamento acessório do tendão flexor digital profundo
LA-TFDS	ligamento acessório do tendão flexor digital superficial
MAD	membro anterior direito
MAE	membro anterior esquerdo
MEC	matriz extracelular
MIB-1	marcador nuclear de proliferação celular
ML	mililitros
PBS	solução salina de tampão fosfato
PE	padrão ecogênico
PSI	puro-sangue inglês
RMD	região metacarpiana direita
RME	região metacarpiana esquerda
TCE	terapia com choques extracorpóreos
TFDP	tendão do músculo flexor digital profundo
TFDS	tendão do músculo flexor digital superficial
TGF- $\beta$	fator de crescimento transformante $\beta$

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	04
2.1 Os tendões .....	04
2.2 As tendinites e sua fisiopatologia .....	07
2.3 Tratamento das tendinites .....	09
2.3.1 Tratamentos antiinflamatórios.....	10
2.3.2 Programa de reabilitação .....	11
2.3.3 Demais terapias tendíneas.....	13
2.3.4 Tratamento com células-tronco.....	14
2.4 Punção aspirativa de medula óssea em eqüinos .....	16
2.5 Separação da fração mononuclear.....	18
2.6 Avaliação do processo de reparação .....	19
2.6.1 Avaliação clínica e ultra-sonográfica.....	19
2.6.2 Avaliação histopatológica e imunoistoquímica.....	21
3. OBJETIVOS.....	23
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	24
4.1 Animais experimentais.....	24
4.2 Delineamento experimental .....	24
4.3 Administração da colagenase.....	26
4.4 Punção aspirativa de medula óssea.....	27
4.5 Separação da fração mononuclear.....	29
4.6 Implante das células mononucleares de medula óssea.....	31
4.7 Atividade física.....	32
4.8 Acompanhamento clínico e ultra-sonográfico.....	32
4.9 Exame macroscópico e biópsia .....	33
4.10 Análise histopatológica e imunoistoquímica.....	35

4.11	Análise estatística .....	36
5.	RESULTADOS .....	37
5.1	Técnicas de manipulação das células mesenquimais.....	37
5.1.1	Punção aspirativa de medula óssea .....	37
5.1.2	Separação da fração mononuclear .....	38
5.1.3	Implante das células da fração mononuclear .....	39
5.2	Análise do reparo tendíneo.....	39
5.2.1	Análise clínica .....	39
5.2.2	Análise ultra-sonográfica.....	41
5.2.3	Análise macroscópica .....	45
5.2.4	Análise histopatológica e imunoistoquímica .....	45
6.	DISCUSSÃO.....	48
6.1	Técnicas de manipulação das células mesenquimais.....	48
6.1.1	Punção aspirativa de medula óssea .....	48
6.1.2	Separação da fração mononuclear .....	49
6.1.3	Implante das células da fração mononuclear.....	50
6.2	Análise do reparo tendíneo.....	50
6.2.1	Análise clínica e ultra-sonográfica .....	50
6.2.2	Análise histopatológica e imunoistoquímica .....	53
7.	CONCLUSÕES.....	57
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
9.	ANEXOS .....	66

**BARREIRA, A.P.B.** Implante autólogo de células mesenquimais no tratamento de tendinites induzidas em eqüinos: avaliação clínica, ultra-sonográfica, histopatológica e imunoistoquímica. Botucatu, 2005, 97 p., tese de doutorado, UNESP, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, São Paulo.

## **RESUMO**

A lesão do tendão do músculo flexor digital superficial (TFDS) é uma importante causa de claudicação em eqüinos, com prevalência de 13 a 30%, de acordo com a atividade eqüestre. Sua instalação pode comprometer a carreira do potro com recidivas ou causar o afastamento das corridas. Além disto, determina longos períodos de recuperação, com prejuízo à função tendínea. Os tratamentos propostos são diversos, mas efeitos como melhora da qualidade ou rapidez da cicatrização não são confirmados por estudos controlados. A terapia intralesional com fatores de crescimento (TGF- $\beta$  e IGF-1), assim como a terapia com choques extracorpóreos vêm mostrando resultados promissores. Recentemente, os avanços médicos têm demonstrado crescente interesse na utilização das células-tronco em terapia de doenças degenerativas e também em cicatrização lenta ou ineficaz. Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do implante autólogo de células mesenquimais de medula óssea na cicatrização tendínea, comparando tendões tratados com tendões do grupo controle. Foi induzida lesão do TFDS de ambos os membros anteriores de seis eqüinos, seguida por implante autólogo em apenas um membro de cada animal. Os animais foram avaliados por parâmetros clínicos e ultra-sonográficos e após biópsia realizada ao 48<sup>o</sup> dia do experimento, foram verificadas características histopatológicas e imunoistoquímicas. Resultados como aumento do infiltrado inflamatório celular, abundância da matriz, diminuição da necrose, discreto aumento no índice de proliferação celular (Ki-67, clone MIB1) e menor imunomarcagem do TGF- $\beta$ 1 caracterizam a aceleração do reparo tendíneo no grupo tratado. Estudos aprofundados devem ser desenvolvidos com o objetivo de definir a influência do tratamento em fase posterior do reparo. Conclui-se, então, após a análise dos resultados, que a terapia celular tendínea com células precursoras mesenquimais acelerou o reparo tendíneo ao 48<sup>o</sup> dia após o tratamento.

**Palavras-chave:** célula-tronco, célula mesenquimal, punção aspirativa, medula óssea, eqüino.

**BARREIRA, A.P.B.** Autologous implant of mesenchymal cells as treatment of induced tendinitis in equine: a clinic, ultrasonographic, histopathologic e imunohistochemistry. Botucatu, 2005, 100 p., doctor thesis (tese de doutorado), UNESP, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, São Paulo.

## **ABSTRACT**

The superficial digital flexor tendonitis (SDFT) is an important cause of lameness in horses with incidence from 13 to 30% depending of the exercise modality. This injury can occur in yearlings and compromise its carrier by reinjury or even the impossibility of return to athletic life. Although long periods of rest are necessary to tendon repair, there is an elasticity loss in the tendon. As current treatment regimes have only marginal effects there is interest in researching therapies that influence the quality or the duration of tendon repair. Intralesional therapy with growth factors (TGF $\beta$ 1 e IGF-1) and radial shock wave therapy have been presenting promising results. Recently, medical interest has been directed to the stem cells therapy of degenerative diseases and cases of deficient healing process. This study aims to evaluate the influence of autologous mesenchymal stem cells from bone marrow in tendon healing, comparing treated and none treated tendons. Induced collagen lesions were in both forelimbs TFDS from six horses, followed by autologous implant in one forelimb from each animal. The horses were evaluated by clinical, ultrasonographic, histopathologic and imunohistochemistry parameters. Tendon biopsies were done at day 48. Results such as high inflammation cells infiltration and synthesis of extracellular matrix, few necrosis areas, discrete increase in cellular proliferation (Ki-67) and low immunoreactivity to TGF $\beta$ 1 found in treatment group suggested the acceleration of tendon repair in this group. Further studies should be developed in order to verify the influence of this treatment on later phase of tendon repair. Overall, after analysis of results, we conclude that cellular therapy with mesenchymal stem cells have accelerate tendon repair at 48 days after treatment.

**Key word:** stem cell, mesenchymal cells, bone marrow, tendonitis, equine.

## 1. INTRODUÇÃO

A tendinite do músculo flexor digital superficial (TFDS) é uma causa importante de claudicação em eqüinos, com características de alta incidência, longo período de reabilitação e baixa eficácia dos atuais tratamentos na modulação do tecido cicatricial. Apesar da recuperação demorada há diminuição da elasticidade tendínea, justificando as freqüentes recidivas. Como consequência geral, os prejuízos relacionados a este tipo de lesão são marcantes na criação de eqüinos.

Estas lesões são usualmente relacionadas ao exercício, pois na fadiga muscular o tendão é submetido a estiramento que excede a sua capacidade elástica, causando lesão. Também é descrito um processo degenerativo gradual em animais submetidos à rotina de exercícios intensos, causando alterações subclínicas e, posteriormente a tendinite. Alguns fatores genéticos, desvios de aprumos, ferrageamento inadequado, pista irregular, sobrepeso, dentre outros, também podem influenciar na instalação desta enfermidade.

A partir da utilização da ultra-sonografia na avaliação de estruturas tendo-ligamentares foi possível uma melhor definição do diagnóstico, com precisa caracterização do tipo de lesão e da estrutura afetada, permitindo assim emitir um prognóstico mais preciso.

Apesar do tratamento com antiinflamatórios (sistêmicos e locais) demonstrar efeito, ainda não há a oferta de um fármaco que resulte na melhora da qualidade do tecido de reparo, ou mesmo na redução do tempo de cicatrização. Desta forma, o tratamento desta lesão mostra-se frustrante para veterinários de eqüinos em todo o mundo.

Com a proposta de melhorar a qualidade do tecido de reparo, além da ação antiinflamatória, foi testada a utilização de injeções intralesionais de glicosaminoglicanos (GAG), dentre eles, o ácido hialurônico. Mesmo com melhora clínica e ultra-sonográfica foram freqüentes os casos de recidiva. O fumarato de beta-aminopropionitrila, que associado ao programa de reabilitação sugeria promover um alinhamento fibrilar mais eficaz, não se encontra disponível no mercado atualmente.

Métodos fisioterapêuticos como ultra-som, laser, campo magnético pulsátil, dentre outros, propõem influência na cicatrização, mas sem comprovação em estudos controlados. Recentemente a terapia por ondas de choque extracorpóreo têm revelado bons resultados na analgesia e no reparo tendíneo.

Algumas técnicas cirúrgicas também são indicadas em situações específicas, como o "splitting" tendíneo na drenagem de hematomas e desmotomia do anular, na descompressão do tendão inflamado. A desmotomia do acessório do TFDS, que aumenta a extensão da unidade músculo-tendínea foi preconizada para a redução de casos de recidiva. No entanto, há trabalhos que sugerem o aumento na incidência de desmíte do suspensório do boleto em animais que receberam este tratamento.

Experimentos indicam que a infiltração intralesional de fatores de crescimento (TGF- $\beta$ 1 e IGF-1) apresentaram resultados promissores. Estas substâncias são citocinas liberadas no processo inflamatório de tendões e demais tecidos, tendo ação moduladora na migração, proliferação e síntese celular.

Entretanto, recentemente os experimentos têm voltado sua atenção para o potencial terapêutico das células-tronco, quando aplicadas a enfermidades complexas ou lesões de difícil cicatrização.

As células precursoras mesenquimais possuem capacidade de auto-replicação e habilidade de diferenciação em fibroblasto, que pode manter-se indiferenciado ou diferenciar-se em osteoblastos, condrócitos, tenócitos, adipócitos e miofibroblastos, de acordo com o estímulo local. Esta diferenciação ocorre durante toda a vida, tornando seu estudo particularmente importante em lesões do sistema músculo-esquelético.

O conhecimento sobre o processo de reparo tendíneo e suas implicações na capacidade atlética do indivíduo afetado vêm estimulando a realização de pesquisas sobre novas terapias neste tecido e a terapia celular com células-tronco mesenquimais demonstra potencial promissor. No entanto, apesar de resultados divulgados, ainda há a necessidade de estudos controlados que confirmem a contribuição deste método terapêutico na qualidade da cicatrização e função tendínea.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 OS TENDÕES

Os tendões têm como função transferir a força biomecânica dos músculos para os ossos, promovendo a movimentação do esqueleto. Os ligamentos possuem função similar, mas para tal, unem duas extremidades ósseas (SMITH e WEBBON, 1996).

Em grandes quadrúpedes como os eqüinos, a massa muscular dos membros é localizada proximal ao corpo e ao reduzir o peso da extremidade, possibilita locomoção mais eficiente. Esta adaptação anatômica resultou na formação de tendões longos como o tendão do músculo flexor digital superficial (TFDS), o tendão do músculo flexor digital profundo (TFDP), tendão do músculo extensor digital comum e o ligamento suspensório do boleto (WILSON, 1996). Nesta espécie, a eficiência da locomoção é maximizada pela habilidade dos tendões flexores e do ligamento suspensório do boleto em armazenar e liberar energia, função que requer elasticidade (GOODSHIP *et al.*, 1994; SMITH e WEBBON, 1996).

O tendão é um tecido conjuntivo denso, altamente organizado, composto predominantemente por fibroblastos esparsos, os tenócitos, envolvidos por matriz extracelular, representada por seu componente fibroso, as fibras colágenas e componente amorfo, sob a forma de gel (ALBERTS *et al.*, 2004).

As fibras colágenas do tipo I são mais abundantes neste tecido (75 a 95 %) e apresentam-se sob a forma de longas fitas, dispostas em arranjo helicoidal, enroladas entre si, semelhantes a uma corda torcida. O colágeno do

tipo III é o segundo mais abundante e pode ser encontrado ao redor das fibras do tipo I e no endotendão. Com a idade, é observado o aumento de sua quantidade, especialmente na área central do terço médio da região metacarpiana. Traços de colágeno do tipo II e V foram detectados em tendões normais (GOODSHIP *et al.*, 1994; CRAYCHEE, 1995; SMITH e WEBBON, 1996 e ALVES, 1998).

A morfologia da ondulação é relacionada com o comportamento elástico do tendão e sua intensidade varia de acordo com o segmento tendíneo e idade do animal (SMITH e WEBBON, 1996). Sob carga igual, as fibras colágenas com menor ondulação, quando comparadas às mais onduladas, sofrerão maior tensão e poderão se romper precocemente (WILINK *et al.*, 1992 *apud* PATTERSON-KANE *et al.*, 1998).

As moléculas de colágeno formam ligações covalentes entre si, designadas ligações cruzadas, responsáveis pela estabilidade estrutural das fibrilas, determinando a força mecânica dos tendões. Tanto o tipo, quanto o número das ligações se modificam com a idade e com a função do tecido. Elas têm como objetivo atuar na solubilidade e na resistência do tendão frente à digestão enzimática (GOODSHIP *et al.*, 1994).

O diâmetro das fibras colágenas, obtido em corte transversal, apresenta-se uniforme durante a fase inicial de desenvolvimento, mas com o avançar da idade é observado um padrão bi ou tri-modal (GOODSHIP *et al.*, 1994). Com a lesão, é observada a tendência ao aumento da quantidade de fibras de menor diâmetro (SMITH e WEBBON, 1996).

As células mesenquimais são precursoras dos fibroblastos, que por sua vez tanto se mantêm sob a forma indiferenciada nos tecidos, como sob a forma diferenciada, sendo denominados de condrócitos, osteócitos, tenócitos, adipócitos e células musculares lisas, dependendo de onde estão localizados. Os membros desta família não estão apenas relacionados, mas também são conversíveis entre si, possibilitando em laboratório, a diferenciação de fibroblastos em adipócitos e vice-versa. Quando um tecido é lesado, os fibroblastos localizados na região proliferam, migram para a área de cicatrização e produzem grandes quantidades de matriz rica em colágeno, que ajuda a isolar e reparar o tecido lesado (ALBERTS *et al.*, 2004).

Os tenócitos possuem morfologia bipolar, núcleo alongado e estão organizados em colunas entre as fibras colágenas (RICHARDSON, 2005). Diferentes tipos celulares foram descritos, tomando como base a morfologia nuclear (GOODSHIP *et al.*, 1994).

A matriz extracelular (MEC) é composta por uma grande variedade de proteínas e polissacarídeos secretados localmente, formando uma rede organizada, em estreita associação com a superfície celular que a produz. A matriz pode tornar-se calcificada, como em ossos e dentes; transparente como na córnea; ou ainda pode adotar formas de cordões como em tendões, conferindo grande força tensora (ALBERTS *et al.*, 2004).

Acreditava-se que a MEC dos vertebrados servia simplesmente como substância inerte na estabilização da estrutura física dos tecidos, mas após diversas pesquisas foi demonstrado que esta é ativa e desempenha um papel complexo na regulação do comportamento das células vizinhas, influenciando seu desenvolvimento, migração, proliferação, forma e função (ALBERTS *et al.*, 2004; RICHARDSON, 2005), como suposto por Goodship *et al.*, em 1994.

Duas principais classes de macromoléculas extracelulares compõem a matriz: (1) os glicosaminoglicanos (GAG), cadeias de polissacarídeos ligados a proteínas formando proteoglicanos sulfatados (GAG polissulfatados) ou não (ác. hialurônico), apresentando-se sob a forma de gel hidratado e (2) as proteínas fibrosas, incluindo o colágeno, a elastina, a fibronectina e a laminina, responsáveis por funções adesivas e estruturais (PATTERSON-KANE *et al.*, 1997; ALBERTS *et al.*, 2004).

A nutrição da estrutura tendínea é obtida por difusão, através das bainhas sinoviais e pelo afluxo sanguíneo proveniente da junção músculo-tendínea, da inserção óssea e do *vinculum* (membrana que une o epitendão ao tecido celular subcutâneo). Áreas avasculares são encontradas em regiões sujeitas às forças compressivas e de tensão, sendo seu aumento observado com a idade (SMITH e WEBBON, 1996).

## 2.2. AS TENDINITES E SUA FISIOPATOLOGIA

A tendinite é importante causa de claudicação em eqüinos (ROONEY e GENOVESE, 1981; RANTANEN *et al.*, 1985; GOODSHIP *et al.*, 1994; GILLIS *et al.*, 1996; PATTERSON-KANE *et al.*, 1998; DAHLGREN, *et al.*, 2001), sendo a lesão do TFDS a mais freqüente, com prevalência variando de 13 a 17% em cavalos PSI de corrida (ROONEY e GENOVESE, 1981; OIKAWA e KASASHIMA, 2002), chegando a 30% em cavalos de caça europeus (GOODSHIP E BIRCH, 1996). Ainda é relatado por Rooney e Genovese (1981) que 25% dos casos de tendinite ocorre precocemente e pode comprometer a carreira do potro com recidivas e até o afastamento da atividade atlética (GENOVESE *et al.*, 1996).

A fragilidade do TFDS está relacionada a diversos fatores. Durante o galope, a elasticidade e a resistência tendínea são levadas ao seu limiar (GOODSHIP *et al.*, 1994), ou seja, para cumprir perfeitamente o papel de absorver a energia elástica durante o movimento, o TFDS deve trabalhar em margens muito pouco seguras, próxima ao seu ponto de rompimento de 12 a 16% de estiramento. Este é sugerido como o maior fator etiológico destas lesões (PATTERSON-KANE *et al.*, 1998). Um outro fator envolvido é o calor produzido na região central tendínea, em torno de 42 a 45°C com a repetição de tensão e relaxamento realizados durante o movimento. Esta temperatura resulta em microtraumas subclínicos, que ao se intensificarem, podem causar a manifestação clínica de tendinite (PATTERSON-KANE *et al.*, 1997; PATTERSON-KANE *et al.*, 1998; OIKAWA e KASASHIMA, 2002).

Os eventos envolvidos na cicatrização tendínea de eqüinos têm sido estudados através da inoculação intratendínea de colagenase purificada de bactérias, que causam destruição das fibras colágenas tendíneas, simulando tendinites de ocorrência natural (WILLIAMS, 1984; SPURLOCK *et al.*, 1989; FOLAND *et al.*, 1992; GIFT *et al.*, 1992).

Causada por estiramento excessivo, por calor ou trauma, a tendinite se instala com o edema ou rompimento de fibras colágenas, das arteríolas e capilares locais, formando um hematoma no interior do tendão, que pode estender-se para o paratendão. No decurso de poucos dias, o coágulo é substituído por tecido conjuntivo de granulação (PEACOCK, 1984).

Durante a primeira semana da cicatrização, a congestão e o acúmulo de fluidos no local promovem isquemia e necrose de tenócitos. A extensão da necrose está relacionada ao grau do comprometimento vascular (SILVER et al., 1983). Há também a infiltração de macrófagos e polimorfonucleares, que irão remover o tecido necrótico, depositar fibrina e juntamente com as plaquetas liberar citocinas, em especial os fatores de crescimento (PDGF, TGF- $\beta$ , TGF- $\alpha$ , IGF-1 e EGF). É então desencadeada a resposta quimiotóxica e proliferativa das células fibroblásticas localizadas no paratendão (envoltório tendíneo externo) e no tendão, que irão atuar ou se diferenciar como tenócitos, sintetizando colágeno tipo I, III e V no tecido cicatricial (GOODSHIP e BIRCH, 1996; ALBERTS *et al.*, 2004). Também são liberadas as metaloproteinases, enzimas dependentes de zinco, que causam degradação enzimática das fibras colágenas e da matriz interfibrilar, sendo a colagenase de particular importância no tecido tendíneo (CHVAPIL, 1996).

As células endoteliais dos capilares lesados aumentam de tamanho e adquirem atividade mitótica pronunciada, resultando na formação de brotos vasculares, que determinam o trajeto dos fibroblastos em migração para a região. Os cordões de fibrina também fornecem o arcabouço para a proliferação de fibroblastos. À medida que a lesão é preenchida pelas células reparadoras recém formadas, o exsudato inflamatório é reabsorvido. A fibrina é fagocitada progressivamente e digerida por enzimas, especialmente as proteases e catepsinas (ALBERTS *et al.*, 2004).

Entre a segunda e quarta semanas após a lesão há a deposição de colágeno e proliferação de fibroblastos. O infiltrado leucocitário, o edema e o aumento da vascularização tendem a desaparecer, ocorrendo uma maturação progressiva do tecido de granulação. O alinhamento dos fibroblastos e a subsequente síntese de fibras colágenas são dependentes da orientação das fibras depositadas na região (DAVIS, 1996).

O colágeno inicialmente apresenta-se imaturo no tecido cicatricial neoformado, com arquitetura desorganizada e predominância de colágeno tipo III, com fibras de pequeno diâmetro. Com a evolução do processo, há a predominância destas fibras maiores. Também pode ser observado o aumento do número de ligações químicas estáveis à medida que o reparo evolui (GOODSHIP et al., 1983; GOODSHIP et al., 1994).

O tecido cicatricial tendíneo é menos organizado e mais frágil do que o normal, pois são observadas alterações em sua composição e organização (GOODSHIP *et al.*, 1994).

Lesões do TFDS dos membros posteriores possuem melhor prognóstico do que nos anteriores, pois os tendões são mais longos e não possuem o ligamento acessório tão desenvolvido quanto nos anteriores. Como resultado, são mais tolerantes à fibrose e à perda de elasticidade que acompanham o processo de cicatrização (BRAMLAGE, 1998).

O tempo de cicatrização para as tendinites é longo, cerca de 3 a 24 meses, dependendo da gravidade da lesão. Durante este período o animal deve realizar um programa de reabilitação, a fim de minimizar a perda da elasticidade tendínea e, conseqüentemente, diminuir a ocorrência de recidivas (GILLIS, 1996). Caso o animal seja confinado sem cumprir o programa de reabilitação, ou mesmo, seja solto a pasto, há diminuição da elasticidade tendínea, resultando em prejuízo à sua função. Por esta razão, em cavalos PSI que retornam ao treinamento após a recuperação de tendinites, cerca de 70% não chega a competir (OIKAWA e KASASHIMA, 2002).

### **2.3 TRATAMENTO DAS TENDINITES**

Com o progressivo conhecimento adquirido sobre a biologia básica dos tendões e com o auxílio da ultra-sonografia, que permite o diagnóstico das lesões, diversas pesquisas têm testado a eficácia das terapias utilizadas em tendinites. Em geral, os objetivos da terapia são: diminuição da inflamação, melhora da qualidade do tecido cicatricial e redução do tempo de cicatrização, resultando na restauração da morfologia e função tendínea, com diminuição das recidivas e diminuição dos prejuízos (GAUGHAN, 1998; OIKAWA e KASASHIMA, 2002).

### 2.3.1 Tratamentos Antiinflamatórios

A área afetada deve receber atadura, que ao promover uma compressão uniforme, minimiza o edema, além de diminuir ou neutralizar as forças biomecânicas na estrutura afetada (GAUGHAN *et al.*,1998; REEF, 1998).

A aplicação tópica de frio deve ser realizada intensamente na fase inicial através de gelo, ducha ou massagens refrescantes, com o objetivo de reduzir a resposta inflamatória inicial (GAUGHAN *et al.*,1998; REEF, 1998). Ao ser testada a capacidade destes métodos na diminuição da temperatura local, tanto a ducha fria quanto o gelo apresentaram eficácia, não havendo diferença entre ambos, no entanto as massagens refrescantes não promoveram a ação desejada (OIKAWA e KASASHIMA, 2002). Segundo Henninger (1992), a aplicação de frio deve ser realizada diversas vezes ao dia, com duração de 20-30 minutos em cada aplicação.

A administração de antiinflamatórios em eqüinos pode ser realizada com o uso de fármacos não esteróides (AINEs) ou esteróides. O AINEs mais utilizado é a fenilbutazona, que apresenta meia vida longa, sendo ideal como terapia antiinflamatória de manutenção até a fase subaguda. O flunixin meglumine pode ser utilizado nos primeiros dias após a lesão, pois possui ação rápida, mas com alto custo. O cetoprofeno também pode ser usado (BRAMLAGE, 1998; GENOVESE, 1998; GAUGHAN, 1998). Apesar do benefício destes fármacos, o uso prolongado deve ser evitado, pois possuem potencial de indução de úlceras gástricas, lesões renais e demais efeitos colaterais (HENNINGER, 1992).

Atualmente, há mais de cinqüenta diferentes AINEs no mercado, havendo ainda fluxo contínuo de novas fórmulas. Este comportamento dinâmico da indústria farmacêutica é resultado do entendimento que nenhum fármaco disponível possui ação ideal no controle ou modificações dos sinais da inflamação, sem que haja efeitos deletérios no indivíduo. Recentemente, o meloxicam utilizado em humanos e cães, vem sendo testado em eqüinos (ALENCAR *et al.*, 2003).

Este fármaco possui ação inibidora da prostaglandina sintetase (ciclo-oxigenase) em tecidos inflamados, reduzindo os sinais clínicos da inflamação e

vem obtendo bons resultados em enfermidades músculo-esqueléticas agudas e crônicas (NELL *et al.*, 2002).

Quando a inflamação é grave, os corticosteróides podem ser utilizados, pois revelam ação antiinflamatória intensa, no entanto quando utilizados a médio prazo, retardam a cicatrização e podem induzir a formação de pontos de calcificação intratendínea (BRAMLAGE, 1998; GENOVESE, 1998; GAUGHAN *et al.*, 1998; REEF, 1998). A aplicação intralesional experimental com corticosteróides resulta em necrose de fibras colágenas, morte dos tenócitos e calcificação distrófica (HENNINGER, 1992).

Em casos que apresentam marcante edema, ao invés de recorrer aos corticosteróides, pode-se realizar a administração sistêmica de AINEs em associação ao dimetilsulfóxido (DMSO), que possui intensa ação na limpeza dos radicais livres resultantes da inflamação (HENNINGER, 1992; REEF, 1998).

Na fase subaguda é recomendada a terapia local de contraste quente e frio, onde a difusão do calor pode ser promovida por massagens ou métodos fisioterapêuticos. Dentre as massagens, o DMSO tópico pode ser utilizado sozinho ou em associação a outros produtos (REEF, 1998).

### **2.3.2 Programa de Reabilitação**

Um dos fatores mais estudados na cicatrização tendínea eqüina é a atividade física, principalmente porque sabemos que na fase de maturação cicatricial a tensão aplicada corretamente às fibras tendíneas contribui de maneira significativa para a orientação das fibras colágenas.

Pesquisas demonstram que a imobilização de articulações de cães e coelhos resulta em perda progressiva de glicosaminoglicanos nos tecidos tendíneo e peritendíneos (GOODSHP *et al.*, 1994). Também é relatado que as ligações covalentes formadas entre as fibras colágenas aumentam após nove semanas de imobilização, diminuindo a força de tensão dos tendões (VILARTA e VIDAL, 1989). Estes estudos indicam que é necessária a atuação de forças de tensão constantes para a manutenção das propriedades físicas e químicas dos tendões.

O estresse longitudinal obtido com o exercício controlado, estimula a produção e o alinhamento do colágeno em fibras paralelas durante a evolução do reparo. Entretanto, a determinação do momento adequado para o início de um exercício controlado, bem como sua quantificação, são imperativas para que ocorra um alinhamento correto (GILLIS, 1996).

Imediatamente após a injúria tendínea, o cavalo deve ser confinado, a fim de prevenir o aumento da lesão ou envolvimento de outras estruturas; no entanto, este confinamento não deve perpetuar-se pelo período de cicatrização tendínea, pois resultaria em prejuízo ao alongamento das fibras (REDDING, 1992; ALVES *et al.*, 1998; GAUGHAN, 1998).

Diversas publicações relatam a adaptação tendínea frente ao exercício (GILLIS *et al.*, 1993, PATTERSON-KANE *et al.*, 1997, PATTERSON-KANE *et al.*, 1998, BARREIRA *et al.*, 2002), mas Gillis, em 1996 estabeleceu um protocolo de exercício progressivo, controlado e gradativo para lesões tendo-ligamentares de eqüinos, o qual vem sendo respeitado até hoje. Após a realização do repouso inicial, o qual é dependente da gravidade da lesão, o protocolo consta na evolução das seguintes fases:

- caminhada puxada, associada ou não à natação;
- caminhada montada;
- inserção de trote ou marcha;
- inserção do galope;
- e por fim, o animal é liberado para trabalho normal.

A evolução do programa é controlada pela imagem ultra-sonográfica, onde pode ser observada a resposta tendínea individual, com o cumprimento ou não das fases esperadas do reparo. Em geral, são necessários seis meses de reabilitação para o retorno das características morfológicas tendíneas.

Para a realização correta deste programa de exercício gradativo é necessário que o animal esteja bem ferrageado, promovendo o equilíbrio das forças biomecânicas que agem no casco (REEF, 1998).

### 2.3.3 Demais Terapias Tendíneas

Existem vários relatos na literatura de fármacos que preconizam a influência nas etapas da reparação tendínea, dentre elas estão o glicosaminoglicano polisulfatado (GAG) o hialuronato sódico e o fumarato de beta-aminopropionitrila (FBAPN) (SMITH, 1996; REDDING *et al.*, 1998, ALVES *et al.*, 2001-a, 2001-b; OIKAWA e KASASHIMA, 2002). Entretanto resultados de pesquisas controladas não confirmaram a eficácia da utilização de GAG e do ác. hialurônico em lesões tendíneas, quando avaliado o retorno às pistas ou o índice de recidivas (HENNINGER, 1993; REEF, 1998). O FBAPN por sua vez, sugeria ação no remodelamento das fibras colágenas, com ação mais eficaz quando associado ao protocolo de exercício controlado (ALVES *et al.*, 2001a, 2001b; DAHLGREN *et al.*, 2001), no entanto este fármaco não encontra-se atualmente disponível no mercado.

Algumas técnicas cirúrgicas são indicadas para o tratamento de tendinites em situações específicas, como o “splitting” tendíneo, que promove a drenagem do hematoma intra-tendíneo e a desmotomia do anular, realizada em tendinites do TFDS, quando acomete o terço distal da região metacarpiana (BRAMLAGE, 1998; REEF, 1998; OIKAWA e KASASHIMA, 2002). Em 1998, BramLage descreveu a desmotomia do acessório do TFDS, relatando o alongamento do músculo flexor digital superficial e seu tendão, aumentando o limite elástico, com conseqüente aumento das taxas de retorno às corridas e diminuição de recidivas. Sua eficácia é controversa, sendo relatado o possível aumento do risco da instalação de desmites do suspensório do boleto (REEF, 1998).

A aplicação de métodos fisioterapêuticos em eqüinos, como o ultra-som, estimulação elétrica, laser e campo magnético propõem ações diversas, porém com eficácia controversa, necessitando de pesquisas para comprovar sua contribuição na medicina esportiva eqüina (REEF, 1998).

Recentemente a terapia com choques extracorpóreos e a terapia intralesional com fatores de crescimento (TGF- $\beta$  e IGF-1) vêm mostrando resultados promissores (DAHLGREN *et al.*, 2001). No entanto, as atenções têm sido direcionadas para o potencial terapêutico das células-tronco.

### 2.3.4 Tratamento com células-tronco

Apesar do conhecimento anterior da existência das células-tronco, vêm sendo divulgadas informações mais detalhadas sobre estas células, que além de possuírem a capacidade de auto-renovação, revelam amplo potencial de diferenciação em diversas linhagens celulares. Estas células participam do processo de crescimento, remodelação e cicatrização tecidual. Embora o conhecimento do reparo tecidual seja bastante antigo, apenas recentemente os pesquisadores identificaram estas populações celulares no indivíduo adulto (SOARES e SANTOS, 2002; CHEN e GOLDHAMER, 2003; RICHARDSON, 2005).

As células-tronco encontradas em embriões humanos de até sete dias (totipotentes) são capazes de formar um novo embrião em sua totalidade; aquelas encontradas em embriões com mais de 7 dias e no cordão umbilical são pluripotentes, pois podem dar origem a vários tecidos, mas não todos. No entanto, as células-tronco contidas na medula óssea, em sítios específicos de cada tecido adulto e até no sangue periférico, são denominadas de células progenitoras. Elas possuem comprometimento com uma linhagem celular: endoderma, mesoderma ou ectoderma (FAGOT-LARGEAULT, 2004).

As células-tronco são encontradas em indivíduos adultos em populações extremamente pequenas, variando de uma a sete células-tronco em cada 100.000 células. Elas são mantidas quiescentes até que recebam o estímulo do ambiente para iniciarem sua diferenciação. Este estímulo pode ocorrer durante o processo de cicatrização, pois este envolve uma complexa interação entre células inflamatórias, interleucinas, citocinas, proteínas da matriz extracelular e o desenvolvimento de novos capilares (PERIN *et al.*, 2003).

Estas células são identificadas por combinações de antígenos de superfície, como o CD 34, CD 45, dentre outros (BALDUÍNO, 2003\*), que são ativados ou desativados durante o processo de diferenciação, por meio de um comando genético. Uma parte das células do organismo no entanto,

---

\* BALDUÍNO, A. Células-tronco em terapias celulares, uma atualidade. In: II FÓRUM EM MEDICINA VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE CASTELO BRANCO, 2003, Rio de Janeiro. (comunicação pessoal)

permanece em estado indiferenciado, sendo as células progenitoras dos organismos adultos (ALBERTS *et al.*, 2004).

Mesmo derivadas de uma mesma linhagem germinativa, cada progenitora origina um diferente tecido. As precursoras mesenquimais dão origem às células do tecido conjuntivo, ou seja, inicialmente se diferenciam em fibroblastos e estes em osteoblasto/osteócito, miofibroblastos/miócito, adipócitos, condroblastos/condrócitos e tenócitos, dentre outros. As linhagens ectodérmica e endodérmica dão origem ao tecido endotelial e parênquima dos diversos órgãos (MONTENEGRO e FRANCO, 1995; ALBERTS *et al.*, 2004; NEURINGER e RANDELL, 2004).

A partir da descoberta do potencial de diferenciação das células-tronco, tem sido explorada sua aplicação terapêutica, sob a forma de implante celular ou na bioengenharia voltada para transplantes. Este novo campo de conhecimento é chamado de Medicina Regenerativa (LEVENBERG *et al.*, 2003).

Na medicina regenerativa, a melhora da cicatrização pode ser realizada pelo fornecimento dos elementos celulares requisitados durante o processo, garantindo a geração de novas células. Também é necessária a produção de estruturas supramoleculares, ou seja, matriz extracelular que providencie a organização espacial plenamente funcional dos novos tecidos gerados e sua integração sistêmica (LEVENBERG *et al.*, 2003).

Atualmente, a medicina regenerativa tem sido testada em casos de infarto do miocárdio (PERIN *et al.*, 2003); no diabetes tipo I (HORI *et al.*, 2002; ZALZMAN *et al.*, 2003); em casos de lesão de medula espinhal (TENG *et al.*, 2002); em enfermidades pulmonares (NEURINGER e RANDELL, 2004); no tratamento de leucemias (HUMPHRIES *et al.*, 1981; PASSEGUÉ, *et al.*, 2003); na reconstituição de tecido epitelial intensamente comprometido, como em queimados (ALONSO e FUCHS, 2003; LI *et al.*, 2004); nas grandes perdas ósseas ((MUSCHLER *et al.*, 2003); em disfunções musculares (CHEN e GOLDHAMER, 2003); na recuperação de cartilagem (FORTIER *et al.*, 1998) e nas tendinites (YOUNG *et al.*, 1998; SMITH *et al.*, 2003; THOMAS, 2003).

## 2.4 PUNÇÃO ASPIRATIVA DE MEDULA ÓSSEA EM EQÜINOS

A medula óssea de eqüinos consiste em células precursoras, granulócitos, plaquetas e gordura (HERTHEL, 2002). Nos indivíduos adultos, as células precursoras podem ser obtidas por punção da medula óssea, sendo possível a realização da técnica no esterno, costela, pélvis, crânio, úmero, fêmur e tibia, pois nestes locais há uma constante função hematopoiética (SPEIRS, 1999; THOMAS, 2003).

Em animais jovens ou de pequeno porte (cães e gatos) a tuberosidade coxal é o local de escolha para a obtenção de medula óssea, pois não há órgãos adjacentes e o osso é acessível abaixo da pele. No entanto, é difícil obter amostras da tuberosidade coxal em eqüinos pela densidade e espessura ósseas da região (CAR e BLUE, 2000).

Em grandes animais a medula óssea pode ser coletada nas costelas, onde está disponível próxima à superfície do osso e durante o ato de punção, a pessoa que coleta a amostra se posiciona de forma segura. A desvantagem fica representada pela pequena superfície da costela, que dificulta no assentamento da agulha na superfície óssea (ROSE, 1993).

Em eqüinos, o esterno é o sítio de escolha para a técnica, pois a atividade hematopoiética persiste na esternobra por toda a vida do animal, os ossos são cobertos por massa muscular delgada, e a cavidade medular é coberta por uma fina camada de osso, facilitando o acesso a esta região. As desvantagens da punção deste local são a posição desconfortável e perigosa em que a pessoa que coleta a amostra é forçada a assumir e a relativa proximidade dos órgãos vitais, incluindo o coração (SPEIRS, 1999; THOMAS, 2003).

A contenção correta e tranquilização dos eqüinos minimiza as possíveis complicações relacionadas ao procedimento. A preparação cirúrgica do local de punção, o uso de instrumentos esterilizados, luvas e técnicas de assepsia devem minimizar o risco de infecções iatrogênicas. Se o paciente tem anomalias de coagulação, como a trombocitopenia ou coagulação intravascular disseminada, pode ocorrer hemorragia. Neste caso, recorre-se ao controle da hemorragia por pressão local direta por três a cinco minutos ou até uma transfusão de sangue pode ser realizada. Quando o esterno ou a abordagem

costal é utilizada, o clínico deve ser cuidadoso ao introduzir a agulha diretamente na esternobra ou costela, para evitar a entrada na cavidade torácica. O risco de pneumotórax, hemorragia incontrolada ou laceração cardíaca pode ser diminuído pelo uso da vigilância e monitoração da agulha durante o procedimento (MORRIS, 1983).

O esterno é um osso segmentado e mediano, que completa o esqueleto do tórax ventralmente e articula-se com as cartilagens das costelas esternais lateralmente. Ele consiste em um número de seis segmentos ósseos, as esternobras, unidas por meio de cartilagem no indivíduo jovem (SISSON, 1975).

São recomendadas agulhas especiais para a coleta da medula óssea e dentre elas estão incluídas as agulhas modelo *Rosenthal, Illinois sternal*, e *Jamshidi*. A amostra deve ser coletada em solução anticoagulante (heparina ou EDTA), apesar de haver relato de coletas sem o produto, caso os esfregaços sejam preparados com prontidão (KATHELEEN, 2000).

Contrariando descrições da técnica de punção do esterno em eqüinos, onde o animal é submetido à anestesia geral e decúbito dorsal (HERTHEL, 2002; THOMAS, 2003), segundo Speirs (1999) e Smith *et al.* (2003), seria possível realizar a punção do esterno do eqüino, com o animal mantido em apoio quadrupedal e sob sedação. Em ambas as situações, o osso é estabilizado em uma mão e pressão firme, com rotação são utilizados para permitir a penetração da agulha no osso cortical. Uma vez firmemente assentado no osso, o mandril é removido e uma seringa de 20 mL, com ou sem anticoagulante, é utilizada para a aspiração. Aplica-se uma pressão negativa forte e a agulha da coleta deve ser deixada no local, a fim de permitir a coleta da alíquota desejada.

O ultra-som pode ser utilizado para a determinação do local de punção (THOMAS, 2003).

A partir da obtenção da amostra, pode ser realizado no tratamento de tendinites ou desmites o implante intralesional de medula óssea total, da fração mononuclear ou mesmo dos tenócitos cultivados *in vitro*. Herthel (2002) e Thomas (2003) descreveram uma marcante diferença na reversão da claudicação causada por lesões do ligamento suspensório do boleto, no retorno às corridas, onde 15% do grupo controle apresentou-se sem claudicação após

12 meses, contra 84% do grupo que recebeu a terapia celular.

Tanto a injeção intratendínea de grandes volumes pode romper fibras, como acredita-se que a espícula e a gordura da medula óssea podem ser deletérias para a cicatrização tendínea.

Ainda em 2003, Smith *et al.*, em estudo controlado, verificaram a eficácia do implante autólogo de células mesenquimais (precursoras dos fibroblastos) como novo tratamento para tendinite do TFDS. Eles obtiveram as células por punção aspirativa do externo, separaram a fração mononuclear, cultivaram as células mesenquimais e realizaram o implante intralesional em um animal de pólo. Os resultados revelaram melhora clínica e ultra-sonográfica do tendão, porém sem explorá-los por métodos histopatológicos ou imunoistoquímicos.

Zuk *et al.* (2002) relataram a possibilidade de se extrair as precursoras mesenquimais a partir de tecido adiposo. Neste caso, o adipócito se diferenciaria em fibroblasto indiferenciado, para depois se diferenciar em células especializadas, de acordo com o estímulo exógeno. Com o anúncio do sucesso laboratorial deste método, verificou-se a possibilidade de sua aplicação na terapia tendínea, onde as células mesenquimais seriam estimuladas a diferenciar-se em tenócitos e estes, uma vez implantados na lesão, poderiam promover uma produção mais intensa de componentes da matriz extracelular, dentre eles o colágeno tipo I. Mais recentemente foi divulgada nos EUA a oferta comercial desta terapia celular em lesões tendo-ligamentares, sob solicitação da página eletrônica [www.vet-stem.com](http://www.vet-stem.com) Em seguida, a mesma oferta foi feita no mercado brasileiro.

## **2.5. SEPARAÇÃO DA FRAÇÃO MONONUCLEAR**

O preparo dos esfregaços de medula óssea merece cuidadosa atenção, porque mesmo a coleta mais especializada pode ser improdutiva, se o esfregaço for de má qualidade. Caso não tenha sido utilizado anticoagulante na coleta, as lâminas devem ser preparadas imediatamente e, quando presente, o esfregaço pode ser realizado até uma hora após a coleta (KATHLEEN, 2000).

Os esfregaços devem ser rapidamente secos ao ar para melhor manutenção da morfologia celular. Diferentes corantes, como o de

Romanowsky ou hematoxilina e eosina, podem ser utilizados na avaliação de rotina da medula óssea aspirada. A concentração dos corantes precisa ser aumentada quando comparada à concentração utilizada para corar esfregaços de sangue periférico e esta concentração depende da celularidade do aspirado de medula óssea e da espessura da preparação dos esfregaços (BARTL, 1984; KATHLEEN, 2000).

Se o material da seringa incluir anticoagulante, expeli-lo numa placa de Petri é de benefício para a observação das espículas de medula e sua presença confirma a origem medular da amostra obtida durante a punção. As espículas de medula são observadas como fragmentos cinzas, opacos, de forma irregular, que se grudam no fundo da placa quando esta é inclinada. Elas geralmente são distinguíveis de glóbulos de gordura claros, brilhosos e esféricos (KATHLEEN, 2000).

## **2.6 AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE REPARAÇÃO**

O processo de cicatrização pode ser acompanhado por métodos não invasivos, como a avaliação clínica e ultra-sonográfica ou invasivos como a biópsias, que permite a realização do exame histopatológico e imunoistoquímico.

### **2.6.1 Avaliação Clínica e Ultra-Sonográfica**

A avaliação clínica, quando realizada com o animal em estação, é feita pela inspeção e palpação da região afetada, na busca de sinais de inflamação como o aumento de volume, calor e dor à compressão tendínea. Entretanto, é marcante a limitação destes métodos em definir com precisão a estrutura afetada, a intensidade do comprometimento e a fase de reparação (GENOVESE *et al.*, 1986, ALVES *et al.*, 1993).

A avaliação clínica também é realizada no animal em movimento de média velocidade (trote ou marcha) para verificação da presença ou não de claudicação (REEF, 1998).

Em posse dessas informações observa-se prognóstico reservado em lesões tendo-ligamentares de cavalos atletas, que até a década de oitenta não possuíam um método de diagnóstico adequado. A avaliação era realizada clínica e radiograficamente, agrupando lesões leves e graves, agudas e crônicas, em um mesmo diagnóstico. Com a falta de definição do problema, o tratamento era instituído de maneira arbitrária e conseqüentemente os resultados obtidos eram pobres (HENNINGER, 1992).

A partir da aplicação da ultra-sonografia na avaliação de tendões e ligamentos de eqüinos, foram publicados diversos artigos sobre o exame ultrasonográfico na classificação das lesões e o acompanhamento do processo cicatricial (HAUSER e RANTANEN, 1982 *apud* SMITH e WEBBON, 1996).

O TFDS normal possui aparência sonográfica homogênea e ligeiramente menos intensa que o TFDP. Ao corte longitudinal a estrutura possui aparência hiperecótica linear. A área tendínea, avaliada pelo corte transversal, é considerada normal entre 0,60 cm<sup>2</sup> e 1,20 cm<sup>2</sup>, dependendo da raça (RANTANEN *et al.* 1986; GENOVESE *et al.*, 1986; GILLIS *et al.*, 1993; WOOD *et al.*, 1993; WOOD *et al.*, 1994).

Uma lesão tendínea focal e aguda, com rompimento de fibras e conseqüente hemorragia, apresenta-se no corte transversal (CT) como área anecótica, enquanto que no corte longitudinal (CL) é observada a ausência do padrão fibrilar. À medida que o hematoma é substituído pelo tecido de granulação e a deposição de colágeno se inicia, ao CT observa-se imagem hipoecótica e no CL ecos curtos e desalinhados. (GENOVESE *et al.*, 1986; MARR *et al.*, 1993; CRAYCHEE, 1995; REEF, 1998).

Já a tendinite recente e difusa possui aparência complexa, com a alternância de áreas anecóticas e hipoecóticas, ocupando toda área tendínea em determinados cortes transversais, caracterizando a presença de áreas de baixa densidade tecidual presentes na fase aguda e subaguda da inflamação. No CL é observada a presença de ecos curtos e desalinhados. Quanto mais crônica a lesão, mais ecótica a sua aparência, sua ecotextura tende à heterogeneidade, bordas irregulares, pouco diferenciadas das estruturas vizinhas e no corte longitudinal estas lesões costumam apresentar fibras irregulares e desalinhadas. Durante o processo cicatricial podem ser formados

pontos de fibrose intratendíneos, representados sonograficamente por focos hipereecóicos (MARR *et al.*, 1993; REEF, 1998).

A gravidade da lesão é definida pela combinação de sua extensão, área em corte transversal, ecogenicidade da lesão e padrão de alinhamento das fibras no corte longitudinal. O aumento de volume tendíneo com hipoecogenicidade e preservação do padrão de alinhamento de fibras pode ser uma evidência precoce da lesão (REEF, 1998).

De forma simplificada, pode-se classificar as lesões tendíneas pelo percentual de comprometimento de fibras no corte transversal, onde divide-se a área da lesão pela área do tendão. Em tendinites focais, são classificadas de lesões leves aquelas com envolvimento focal de até 15% das fibras no CT, as moderadas atingem de 15 a 25% e as graves revelam comprometimento de mais de 25% das fibras. No caso de tendinites difusas o aumento da área tendínea servirá de parâmetro para sua classificação, sendo leves com aumento tendíneo de até 20%, moderadas com 20 a 35% e graves com mais de 35% de aumento de volume em relação à média fisiológica, ou ao membro contralateral. Com a classificação das lesões é possível determinar de forma mais precisa o prognóstico que acompanha a lesão instalada (GENOVESE *et al.*, 1997).

### **2.6.2 Avaliação Histopatológica e Imunoistoquímica**

Dentre os métodos invasivos de avaliação do tecido cicatricial, um dos mais utilizados, em estudos experimentais, é a biópsia tendínea com subsequente exame histopatológico e imunoistoquímico. O exame histopatológico é de fundamental importância na avaliação das fibras colágenas, celularidade, vascularização e grau de organização da MEC durante o processo de cicatrização tendínea (ALVES, 1998).

Muitas técnicas de coloração foram desenvolvidas para a avaliação das fibras colágenas ao microscópio óptico, sendo em sua maioria colorações tricrômicas. Embora as fibras colágenas apareçam geralmente bem coradas por estes métodos, também são coradas outras estruturas que contém colágeno, como as fibras reticulares e as membranas basais. Deste modo, é

necessária a análise imunoistoquímica para diferenciar os diferentes tipos de colágeno entre si e em relação aos demais componentes colágenos (HORTON,1984; ALVES *et al.*, 2001a e b).

A imunoistoquímica fornece a marcação de antígenos específicos em cortes histopatológicos, por uma reação antígeno-anticorpo, permitindo a caracterização da expressão de uma determinada substância (CHANG *et al.*, 1997).

Alguns são os marcadores da atividade proliferativa determinada pelo meio da marcação imunoistoquímica, dentre eles pode ser citado o Ki67 (clone MIB-1), proteína presente em todas as fases do ciclo de divisão celular (BACCHI e GOWN, 1993; DAHLGREN *et al.*, 2001)

O fator de crescimento transformante  $\beta$  (TGF-  $\beta$ ) é uma citocina relacionada à cicatrização tecidual, cujas funções incluem o estímulo à migração dos fibroblastos e macrófagos, angiogênese, produção de colágeno, regulação da atividade das proteinases e seus inibidores. Apesar de sua ação pró-inflamatória na fase inicial da cicatrização, o TGF-  $\beta$  participa na modulação da deposição dos componentes da MEC, como o colágeno, glicosaminoglicanos e fibronectina (CHANG *et al.*, 1997).

Esta citocina é capaz de influenciar tanto processos fisiológicos, como patológicos. A expressão do TGF-  $\beta$ 1 em tendões normais é mínima, quando comparados com tendões lesados, onde o receptor para o TGF-  $\beta$ 1 tem seu pico de expressão aos quatorze dias após a indução da lesão e diminui após cinquenta e seis dias, evidenciando aumento durante o processo de lesão e cicatrização tendínea ou ligamentar (NGO *et al.*, 1997).

Em pesquisa realizada por Caminoto e colaboradores (2005) foi observada maior imunoreatividade para TGF-  $\beta$ 1 em ligamentos que receberam terapia por ondas de choque extracorpóreas, quando comparadas ao grupo controle. A partir deste resultado acredita-se que a avaliação deste parâmetro fornece informações sobre o reparo de estruturas tendo-ligamentares.

### **3. OBJETIVOS**

A presente investigação experimental foi desenvolvida em eqüinos, submetidos à tendinite do flexor digital superficial, induzida quimicamente pela da injeção intratendínea de colagenase, com os seguintes objetivos:

1. Verificar a viabilidade da técnica de punção aspirativa de medula óssea, realizada em eqüinos em estação, como método de obtenção das células precursoras.
2. Avaliar a eficácia do implante autólogo de células precursoras mesenquimais obtidas em medula óssea no tratamento de tendinites induzidas.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS**

Foram utilizados 06 animais da espécie eqüina, cujos membros anteriores foram distribuídos em 2 grupos de seis membros cada (GA e GB) e receberam diferentes tratamentos após indução de tendinite pela aplicação de colagenase<sup>1</sup>. Os animais experimentais apresentaram em média seis anos de idade, sem raça definida, compreendendo três fêmeas e três machos, clinicamente sadios, sem alterações do aparelho locomotor.

Os animais foram mantidos no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP – Campus de Botucatu. Foram pesados, vermifugados com Ivermectina<sup>2</sup>, na dose de 200 ug/Kg via oral, dez dias antes do experimento e mantidos em baias individuais, recebendo água, alimentação concentrada e balanceada e feno de “coast-cross”.

### **4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL**

Ao dia zero do experimento foi induzida a lesão do TFDS de ambos os anteriores pela injeção intratendínea de colagenase<sup>1</sup>. Os tendões lesionados foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos: GA – tratamento e GB – controle. Ao dia 12 do experimento, o GA recebeu o implante das células da

---

<sup>1</sup> Colagenase tipo 1: C-0130, Sigma Pharmaceutical

<sup>2</sup> Equalan – Merck Sharp & Dohme

fração mononuclear, dentre elas as células mesenquimais. Os animais permaneceram por duas semanas confinados em baias individuais e após este período, foram submetidos ao esquema de atividade física composta por caminhadas diárias com duração de 5', 10' e 15', até o 24<sup>o</sup>, 36<sup>o</sup> e 48<sup>o</sup> dias, respectivamente. Houve acompanhamento clínico e ultra-sonográfico desde o dia zero até o 48<sup>o</sup>, quando foi realizada a biópsia para a verificação das características histopatológicas e imunoistoquímicas (Figura 1).

**Grupo A - Tratamento:** constituído por 06 membros anteriores que receberam injeção de colagenese<sup>1</sup> nos tendões flexores digitais superficiais resultando em lesão tendínea focal, como demonstram as imagens do anexo 1. Doze dias após a indução da lesão, receberam o implante intralesional de células da fração mononuclear da medula óssea.

**Grupo B - Controle:** constituído por 06 membros anteriores que receberam injeção de colagenese<sup>1</sup> nos tendões flexores digitais superficiais, resultando em lesão tendínea focal, como demonstram as imagens do anexo 1. Este grupo não recebeu qualquer tipo de tratamento intralesional.

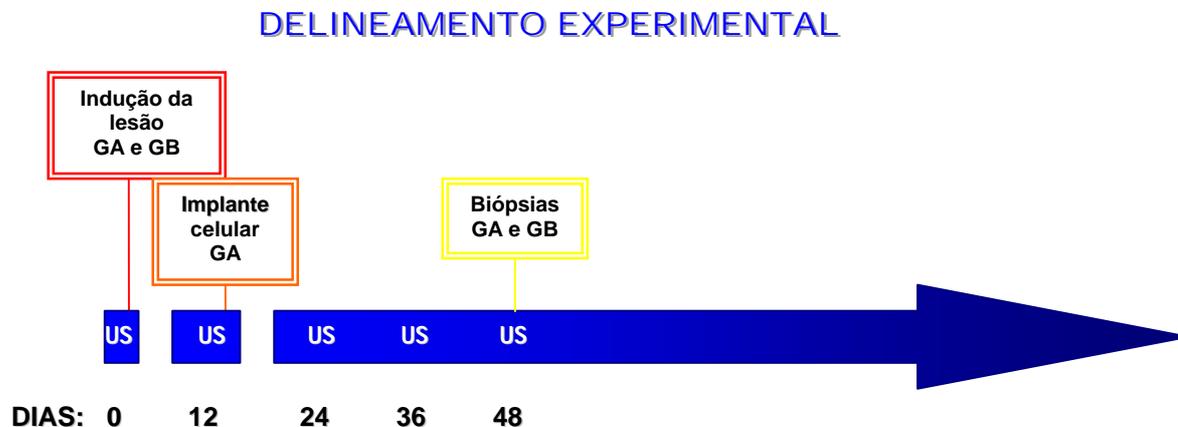
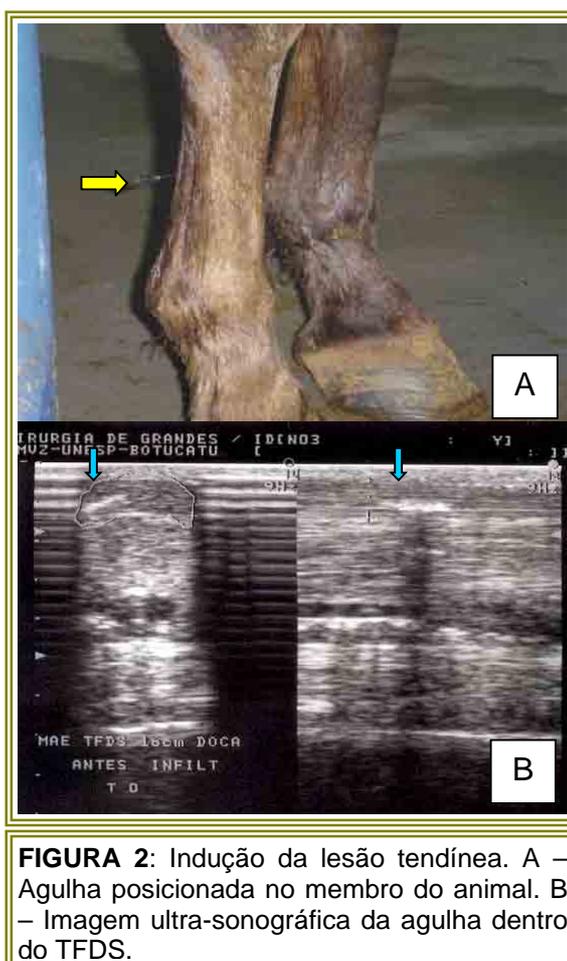


FIGURA 1: Esquema do delineamento experimental.  
GA- grupo tratamento; GB- grupo controle e US- exame ultra-sonográfico.

### 4.3 ADMINISTRAÇÃO DE COLAGENASE

A administração da colagenase foi considerada como o início do experimento, sendo realizada após sedação dos animais com romifidina<sup>3</sup> (40mcg/Kg P.V.) por via intravenosa e bloqueio anestésico dos nervos palmares medial e lateral, na região metacarpiana proximal com três mL de cloridrato de lidocaína<sup>4</sup>, sem vasoconstritor em cada sítio de infiltração anestésica. A região palmar do metacarpo dos dois membros foi preparada com tricotomia e anti-sepsia. Injetou-se colagenase (0.5mL, 2.5mg/mL) na região lateral do metacarpo, atingindo o centro dos tendões flexores digitais superficiais, de cada um dos membros anteriores, utilizando-se agulha hipodérmica 30 x 8 descartável com auxílio de aparelho de ultra-som (Figura 2). Após a indução da lesão foi administrado Meloxicam, antiinflamatório não esteróide, por via oral, na dose de 0,6 mg/Kg, uma vez ao dia, por 15 dias.



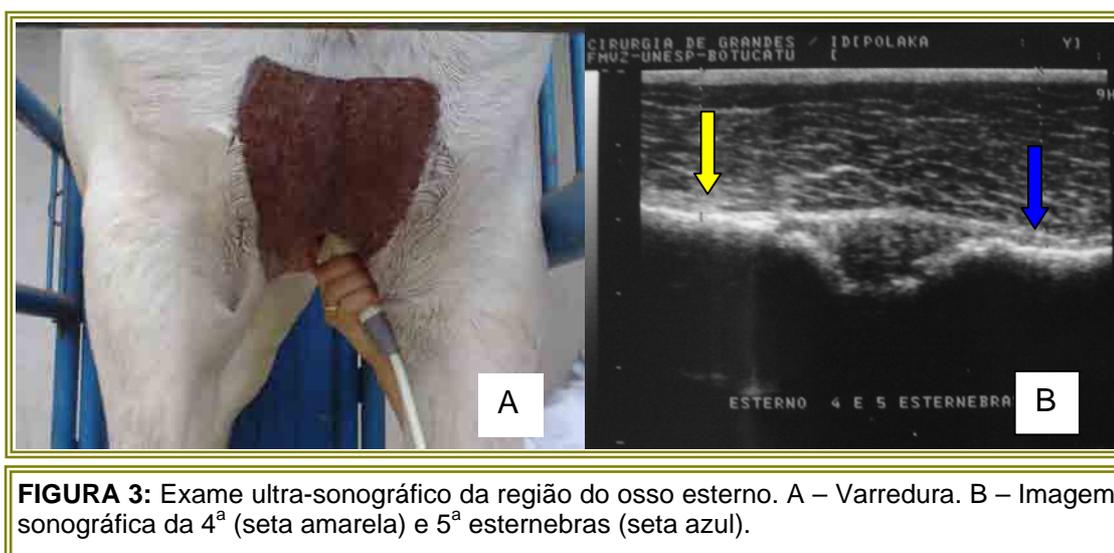
**FIGURA 2:** Indução da lesão tendínea. A – Agulha posicionada no membro do animal. B – Imagem ultra-sonográfica da agulha dentro do TFDS.

<sup>3</sup> Sedivet - Boehringer

<sup>4</sup>Xilocaína 1% - Merrel Lepetit

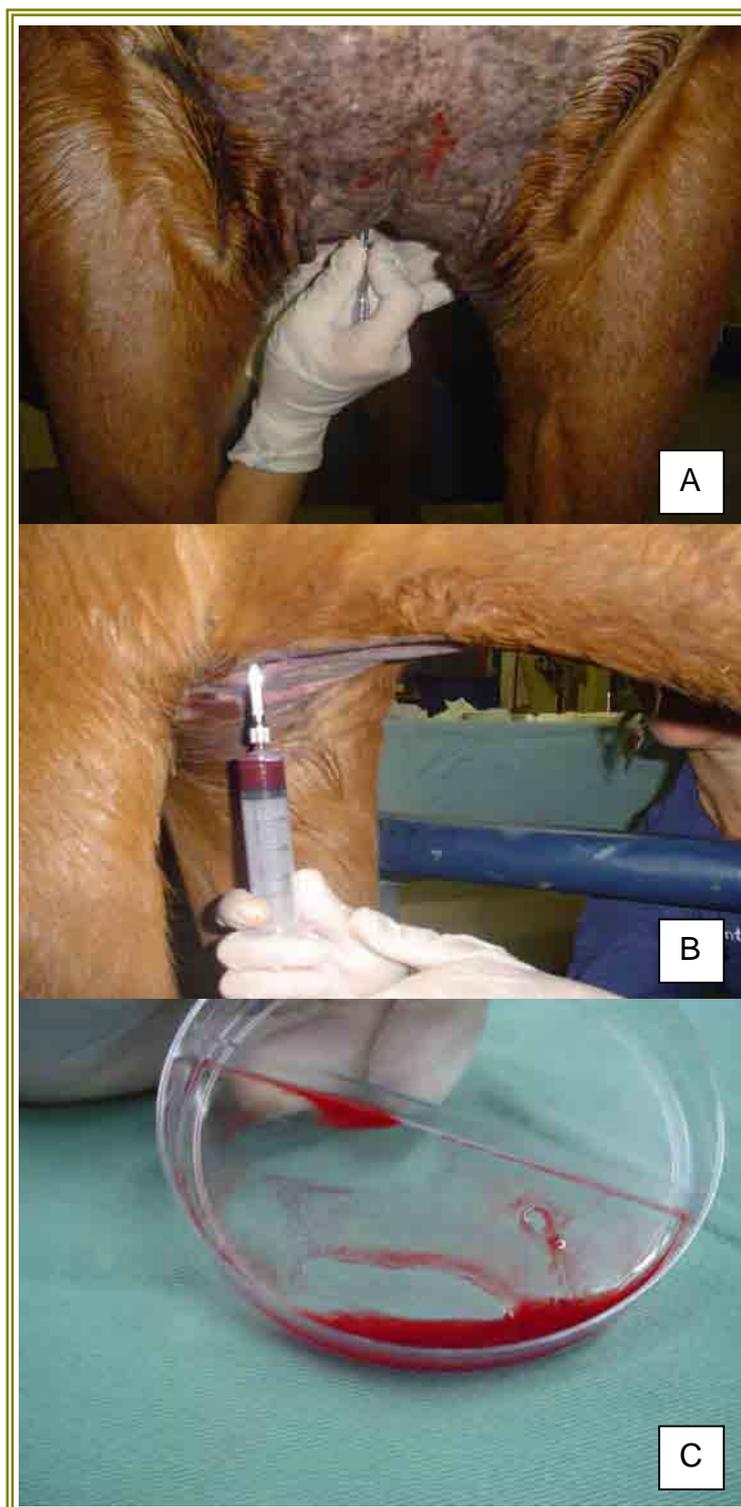
#### 4.4 PUNÇÃO ASPIRATIVA DE MEDULA ÓSSEA

Os animais foram mantidos em estação, contidos em brete e sedados com romifidina, seguindo o mesmo protocolo já descrito. Em seguida, foi realizada a tricotomia de uma área de 5 x 20 cm na região referente ao osso esterno de cada equino, permitindo a execução do exame ultra-sonográfico (Figura 3). Após localizada a 5<sup>a</sup> esternebra, o bloqueio anestésico local foi realizado, seguido de anti-sepsia local. Foi introduzida a agulha de punção de medula óssea em eqüinos, modelo *Jamshid*<sup>6</sup>, de calibre oito e 12 cm de comprimento. Uma vez bem fixa a agulha dentro do esterno, retirou-se o mandril e realizou-se a aspiração das células da medula óssea com auxílio de uma seringa de 20mL contendo 1mL de heparina a 1000 UI/mL (Figura 4). A primeira alíquota foi expelida em placa de Petri para a verificação a olho nu da presença de espículas e glóbulos de gordura, sugerindo a origem medular da amostra. Após este procedimento, foram coletadas outras cinco alíquotas acondicionadas em seringas de cinco mililitros, contendo 1mL de heparina cada. As amostras foram identificadas, acondicionadas em gelo e encaminhadas ao Laboratório de Pesquisas do Departamento de Genética do Instituto de Biociências (UNESP, Botucatu) para a separação da fração mononuclear.



**FIGURA 3:** Exame ultra-sonográfico da região do osso esterno. A – Varredura. B – Imagem sonográfica da 4<sup>a</sup> (seta amarela) e 5<sup>a</sup> esternebbras (seta azul).

<sup>6</sup> Technology, São Paulo.

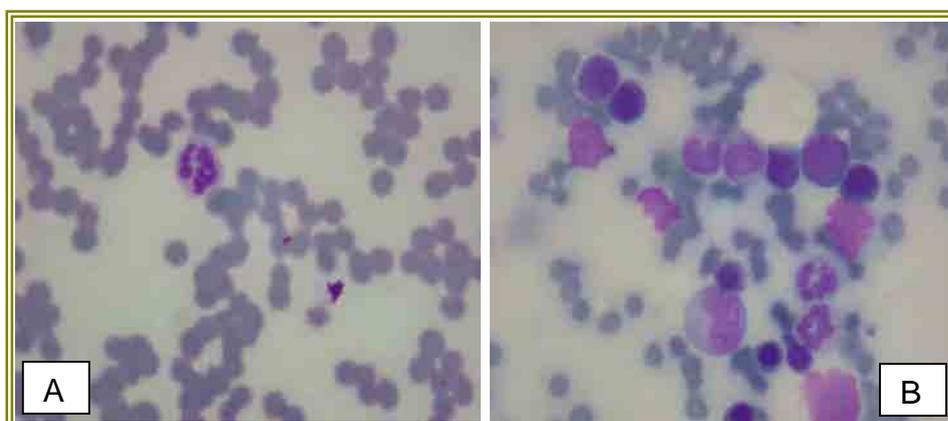


**FIGURA 4:** Punção aspirativa de medula óssea. A – Agulha parcialmente penetrada no osso esterno. B – Obtenção da amostra. C – Espículas na amostra em placa de Petri.

#### 4.5 SEPARAÇÃO DA FRAÇÃO MONONUCLEAR

Além da observação a olho nu de grânulos acinzentados (espículas) em placa de Petri, ao chegar ao laboratório uma pequena porção de cada amostra foi utilizada para realização de esfregaços, que sob a coloração Romanowsky, permitiram a confirmação da origem da amostra, se medula óssea ou sangue periférico (Figura 5). Toda a manipulação da amostra em laboratório realizou-se em fluxo laminar, a fim de se evitar contaminação.

Uma vez confirmada a origem medular, a amostra foi diluída em PBS e filtrada em equipo de transfusão<sup>7</sup> para remoção dos agregados celulares. Em seguida o filtrado foi delicadamente depositado em Ficoll Hypaque<sup>8</sup> e centrifugado a 500 g por 30' a temperatura ambiente, a fim de realizar a separação de seus constituintes por gradiente de concentração. Após centrifugação, foi formado um anel esbranquiçado, rico na fração mononuclear da medula óssea, entre o plasma e os resíduos eritrócitos. Esta camada foi retirada e lavada por duas vezes em PBS e novamente centrifugada 500 g por 10' (Figura 6). A fração mononuclear, quando pronta para o implante, foi submetida ao teste de viabilidade celular por exclusão do azul tripan 0,2%<sup>9</sup>.

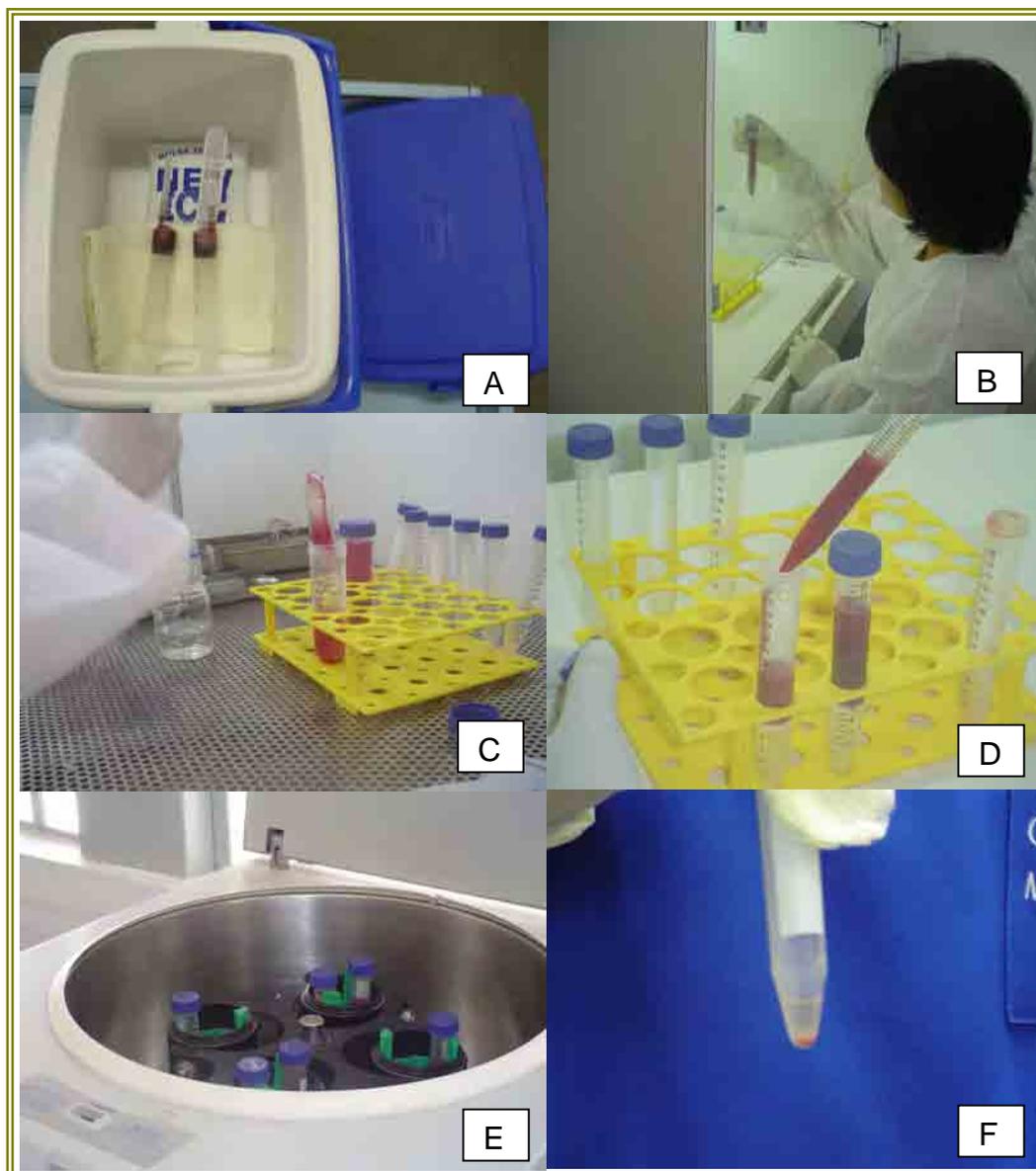


**FIGURA 5:** Exame microscópio das amostras coradas por Romanowsky. A - Sangue periférico, composto por células maduras. B - Sangue de medula óssea, com células imaturas.

<sup>7</sup> Embramed, SP

<sup>8</sup> Ficoll-Paque Plus (d=1,077) Sigma Chemical Co.

<sup>9</sup> Merk

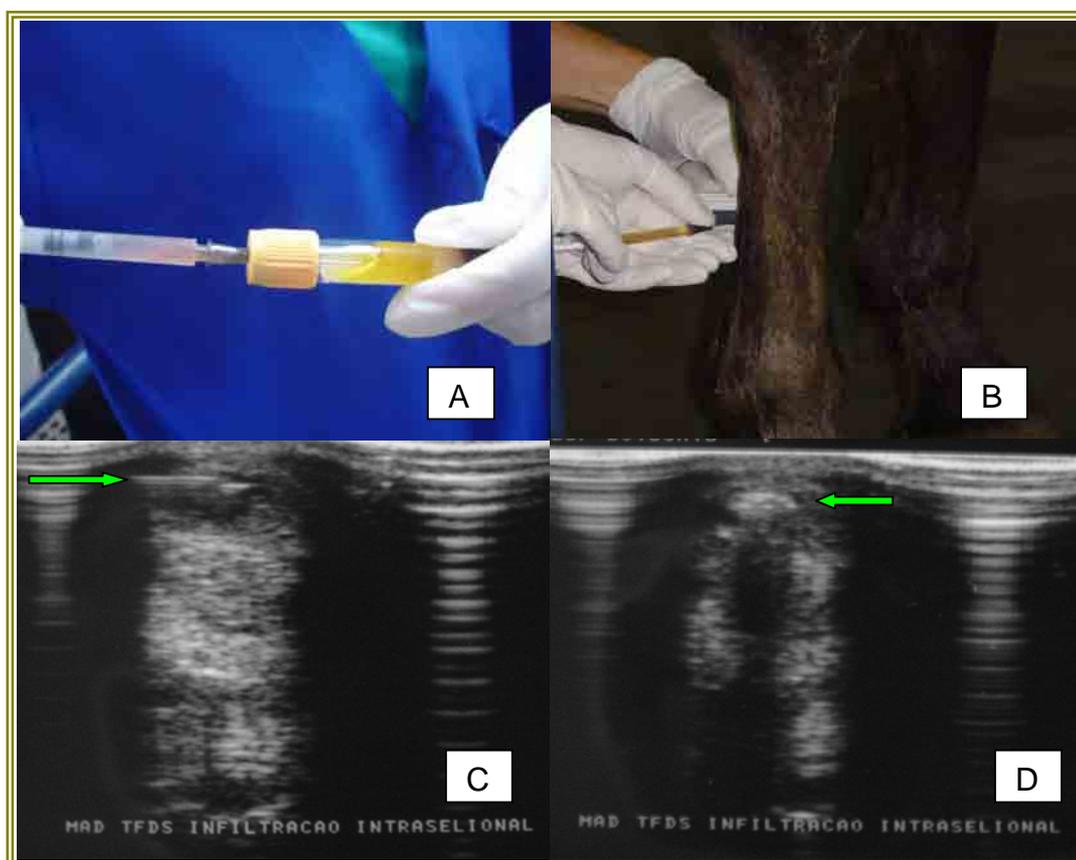


**FIGURA 6:** Separação da fração mononuclear. A – Refrigeração da amostra no transporte. B – Manipulação em fluxo laminar. C – Filtragem. D – Amostra depositada em Ficoll Hypaque. E – Centrifugação. F – Botão celular contendo a fração mononuclear em pequena quantidade de PBS.

#### 4.6 IMPLANTE DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA

Os membros que compunham o do grupo tratamento (GA) receberam injeções intratendíneas de células mononucleares de medula óssea, dentre elas as células mesenquimais, ao 12<sup>o</sup> dia após a aplicação de collagenase.

O implante foi realizado com o animal sob tranquilização, conforme descrito anteriormente e submetidos ao bloqueio anestésico regional dos nervos palmares medial e lateral. Houve a identificação da área de lesão pelo ultra-som, seguido de anti-sepsia local e implante intralesional de cerca de 0,5 mL de suspensão celular diluída em soro autólogo recém coletado.



**FIGURA 7:** Implante celular. A – Diluição da fração mononuclear em soro autólogo. B– Implante intratendínea com o auxílio da ultra-sonografia. C– Imagem ultra-sonográfica da agulha na lesão (seta). D – Implante após infiltração (seta).

#### **4.7 ATIVIDADE FÍSICA**

Os animais do experimento foram submetidos à atividade física controlada e progressiva, monitorada periodicamente pelo exame ultra-sonográfico. O esquema utilizado foi o de Gillis (1996) modificado, como descrito a seguir:

- 15 – 24º dia: andar ao passo, por 5 minutos, uma vez ao dia.
- 24º – 36º dia: andar ao passo, por 10 minutos, uma vez ao dia.
- 36º – 48º dia: andar ao passo, por 15 minutos, uma vez ao dia.

#### **4.8 ACOMPANHAMENTO CLÍNICO E ULTRA-SONOGRÁFICO**

Após administração da colagenase, os animais foram acompanhados por 48 dias. Nos primeiros quinze dias, realizou-se exame clínico diário, sendo notificada a presença de claudicação, quantificada em escores de 0 a 5, segundo STASHAK (2002). Pesquisou-se também aumento de volume, temperatura e sensibilidade dolorosa à palpação dos membros lesados. Após a avaliação inicial, foi mantido o intervalo de doze dias entre os exames, até o final do experimento.

O exame ultra-sonográfico foi realizado com equipamento portátil<sup>5</sup>, provido de transdutor linear de 7,5MHz, propiciando o acompanhamento dos tendões desde 48 horas após a administração da colagenase, para checar o início da formação da lesão e a seguir ao 12º, 24º, 36º, e 48º dia do experimento. Foram avaliados os planos transversais e longitudinais da lesão e as imagens obtidas foram impressas para posterior comparação entre os diferentes momentos e grupos de animais.

Foram avaliados os seguintes parâmetros nas lesões:

- a) Área do tendão
- b) Área da lesão tendínea
- c) Ecogenicidade da lesão, graduada de 0 a 4 (GENOVESE et al.,1986):

---

<sup>5</sup> ALOKA, modelo SSD 900



Após a delimitação do campo cirúrgico, foi realizada a incisão cutânea próximo-distal, na face látero-caudal do terço médio da região metacarpiana, de aproximadamente seis centímetros de extensão. A seguir, foi realizada a divulsão romba do tecido subcutâneo e abertura de fáscia e paratendão, visualizando o tendão flexor digital superficial. Na seqüência foi feita a tração e a exposição do tendão, para possibilitar o acesso e observação de presença de aderências no local. Uma vez localizada a região da lesão, foi realizada a excisão de fragmento de 1 cm<sup>2</sup> da lesão, com o auxílio de pinça e bisturi (Figura 9). A síntese da fáscia foi realizada em plano único de sutura contínua com fio vicril 2-0. A síntese cutânea foi procedida com fio de nylon em pontos simples separados.

Os fragmentos colhidos para exame histopatológico foram fixados em solução de formalina tamponada a 10% e encaminhados para o laboratório de Anatomia Patológica da FMVZ (UNESP, Botucatu) para a realização dos exames histopatológico e imunoistoquímico.

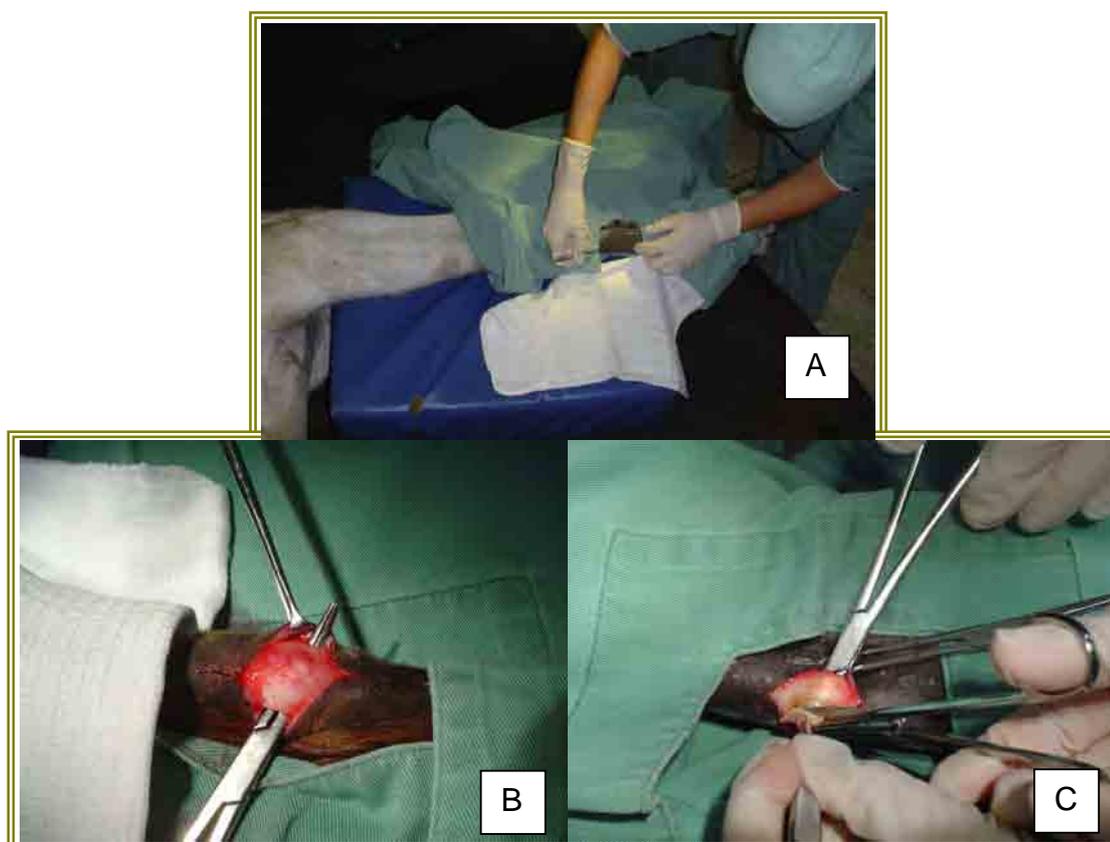


FIGURA 9: Técnica de biópsia. A – Incisão de pele e decúbito. B – Individualização do TFDS. C – Biópsia.

#### 4.10 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA

Os fragmentos foram processados pelos métodos habituais para obtenção de cortes histopatológicos e corados pelos métodos de Hematoxilina-Eosina (H.E.). A análise histopatológica foi feita por microscopia óptica, sem o conhecimento prévio dos grupos a que pertenciam as lâminas.

Para a avaliação das alterações histopatológicas da reparação dos tendões lesados foram considerados a quantidade e as características dos fibroblastos, a presença e tipo de infiltrado inflamatório, neovascularização, de fibras colágenas, aparência da matriz extracelular, seu arranjo e o grau de desorganização tecidual presente.

A fim de permitir avaliação semi-quantitativa, as características foram relatadas como leves, moderadas ou intensas. Um escore foi estabelecido para a graduação de cada característica na avaliação histopatológica, em uma escala de 0 a 3, com o grau 3 indicando as alterações mais intensas.

Para a realização da técnica de imunistoquímica, novos cortes de 3  $\mu\text{m}$  de espessura foram obtidos dos blocos de parafina e distendidos em lâminas histológicas devidamente preparadas com Poly-L-Lysine<sup>10</sup>. Este produto possui a função de promover a aderência dos cortes a lâmina. Para a incubação com o anticorpo primário Ki-67<sup>11</sup> e anticorpo monoclonal liofilizado para TGF- $\beta$ <sup>12</sup> tipo 1, o material foi desparafinado com banhos sucessivos em xilol e álcool absoluto em concentração decrescente e a recuperação antigênica foi feita em banho-maria a 96,5°C em solução tamponada de citrato a pH 6,0. O bloqueio da peroxidase endógena foi feita com peróxido de hidrogênio e água destilada (1:1). O material foi incubado com BSA (albumina bovina) 5% para redução das reações de fundo. Os anticorpos primários foram incubados durante a noite a 4°C. O anticorpo secundário biotilado anti-coelho, anti-cabra e anti-camundongo<sup>13</sup> foi incubado a temperatura ambiente por 30'. O material foi incubado com Streptavidina-peroxidase a temperatura ambiente por 30' e DAB

---

<sup>10</sup> Sigma P8920

<sup>11</sup> DAKO, Clone MIB-1

<sup>12</sup> NCL, TGF- $\beta$  monoclonal

<sup>13</sup> LSAB, DAKO

foi utilizado como cromógeno. A contra coloração feita com hematoxilina. Foi então realizada a contagem das células marcadas positivamente para TGF $\beta$ 1 e MIB-1, marcador de citoplasma e núcleo, respectivamente. Este procedimento foi realizado com um equipamento que consta em microscópio<sup>14</sup> acoplado a uma câmara digital<sup>15</sup>, de onde as imagens são observadas e processadas por um programa computacional de análise de imagem<sup>16</sup>. Foram contadas as células positivas e negativas em dois campos para cada lâmina, o que permitiu contabilizar o percentual de positividade.

#### 4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise dos resultados expressos em escores, como o grau de claudicação e ecogenicidade da lesão, foram utilizados testes não paramétricos de Friedman para comparação de momentos em cada grupo e teste de Wilcoxon para comparação de grupos em cada momento (ZAR, 1996). Para os dados paramétricos, como a área do tendão, área da lesão e porcentagem de comprometimento de fibras, foi utilizada a análise de medidas repetidas (MORRISON, 1990) para comparar, em média, os efeitos dos momentos em cada grupo. A comparação entre grupos em cada momento foi realizada pelo teste *t* pareado. Todas as comparações foram realizadas no nível de 5% de significância.

---

<sup>14</sup> Leica DMLD

<sup>15</sup> Sony – DXV15A

<sup>16</sup> KS 300, versão 3.0 - Zeiss

## **5. RESULTADOS**

### **5.1 TÉCNICAS DE MANIPULAÇÃO DAS CÉLULAS MESENQUIMAIS**

#### **5.1.1 Punção Aspirativa de Medula Óssea**

A contenção em brete, associada a tranquilização demonstrou-se adequada para a punção de medula óssea do esterno, apesar da posição desconfortável que a pessoa que realiza o procedimento precisa adotar.

Verificou-se a necessidade de treinamento do responsável pela coleta da amostra, uma vez que nas primeiras punções, algumas amostras foram provenientes de sangue periférico e não da medula óssea.

Também houve inicialmente dificuldade na distinção macroscópica entre medula óssea e sangue periférico, porém após período de ajuste da técnica de punção (projeto piloto), tornou-se possível identificação da amostra em placa de Petri. Características como consistência gelatinosa, presença de agregados celulares, grânulos (espículas) e glóbulos de gordura foram observados em medula óssea, características bem diferentes do sangue periférico. Apesar da possibilidade de definição macroscópica da origem da amostra, esta foi sistematicamente confirmada pela microscopia óptica em coloração Romanowsky, a qual revelou-se adequada para a análise da morfologia celular.

A classificação da amostra foi especialmente útil na fase de treinamento para a punção, no entanto após a definição da 5ª esternebra como sítio ideal de punção para a técnica descrita em animais em estação, todas as amostras continham células indiferenciadas em marcante proporção, caracterizando sua

origem medular.

Em média, obteve-se 10-12 mL de medula óssea em cada animal, sendo este volume obtido em diversas alíquotas. Inicialmente foi utilizada seringa de 20 mL para promover intensa pressão negativa, sendo esta posteriormente substituída por cinco seringas de 5 mL heparinizadas.

Não houve perfuração pleural ou cardíaca, caracterizando a segurança da técnica.

### 5.1.2 Separação da Fração Mononuclear

Inicialmente, a separação da fração mononuclear foi dificultada pela presença de coágulo e fibrina (Figura 10). Após o treinamento da punção e a filtragem de medula óssea através de filtro contido em equipos de transfusão de sangue, esta dificuldade foi superada, sendo possível a obtenção da fração mononuclear.

As amostras, quando preparadas para o implante, variavam de 0,5 a 0,7 mL em seu volume.

Foi realizado o teste de viabilidade por exclusão do corante azul tripan 0,2%<sup>18</sup> (Figura 10), onde observou-se 76% de células viáveis.

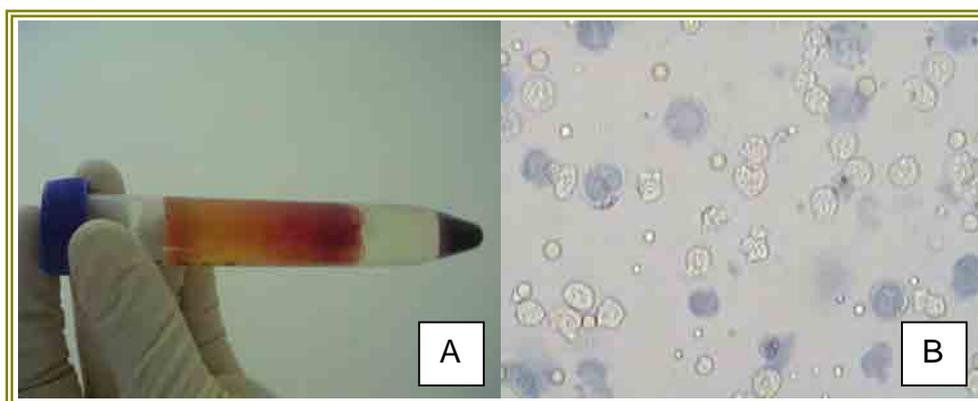


FIGURA 10: Separação da fração mononuclear. A – Amostra coagulada, impedindo a separação da fração mononuclear. B – Teste de exclusão pelo azul tripan 0,2%.

---

<sup>18</sup>Merk

### 5.1.3 Implante das Células da Fração Mononuclear

O implante celular revelou ser uma técnica simples, quando utilizado o ultra-som como guia. Foi observada a intensificação dos sinais clínicos da inflamação local por três dias (em média) após o implante, sendo as alterações relatadas a seguir.

## 5.2 ANÁLISES DO REPARO TENDÍNEO

### 5.2.1 Análise Clínica

Achados clínicos como o aumento de volume (Figura 11), dor à palpação tendínea e claudicação estiveram presentes desde a indução da lesão até o implante celular, porém variando em intensidade (leve a moderado) sem diferença significativa entre os grupos.

Após o implante celular no grupo tratado, realizado ao 12<sup>o</sup> dia do experimento, foi observado discreto aumento de volume local, além daquele que se seguiu à injeção de colagenase. Este aumento de volume iniciou-se 24 horas após o implante, permanecendo em média até o 36<sup>o</sup> dia do experimento.

Não houve diferença quanto à intensidade da sensibilidade à palpação entre os grupos, nos diferentes momentos do experimento, sendo esta observada em geral até o 36<sup>o</sup> dia do experimento em ambos os grupos.

Quanto à atividade locomotora após administração de colagenase, observou-se claudicação variável, partindo em média de grau 3 e chegando ao final do experimento em média em grau 1 (Tabela 01, Figura 12). Três animais apresentaram claudicação mais evidente no membro tratado, persistindo em



FIGURA 11: Aumento de volume no local do implante 3 dias após a técnica.

grau 3 por 5 dias, em média, após o tratamento (17<sup>o</sup> dia do experimento) e chegando a grau 1 em torno do 40<sup>o</sup> dia do experimento. No grupo controle houve uma manifestação mais amena da claudicação, onde a diminuição do escore a grau 1 ocorreu em torno do 30<sup>o</sup> dia do experimento.

Quando houve dificuldade na observação da claudicação de um membro isoladamente, seu contralateral recebeu bloqueio anestésico.

A administração do Meloxicam surtiu ação antiinflamatória efetiva, já que ao término da terapia, ao 15<sup>o</sup> dia do experimento, foi observada a intensificação dos sinais da inflamação, como aumento de volume e sensibilidade dolorosa à palpação local por três a quatro dias. No entanto, não houve diferença quanto à manifestação da claudicação.

TABELA 01: Valores médios dos escores de claudicação, dos grupos experimentais nos diferentes momentos analisados.

Grupos	12 dias	24 dias	36 dias	48 dias
GA*	3	2	2	1
GB	3	3	1	1

\*GA – grupo tratamento

GB – grupo controle

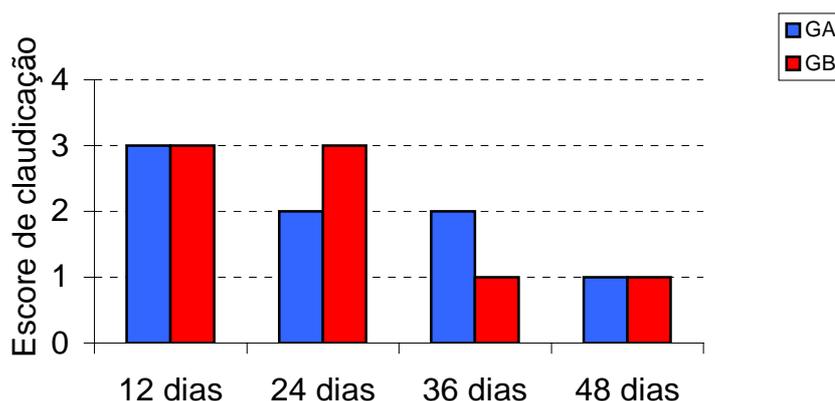


FIGURA 12: Escores médios do grau de claudicação, dos grupos experimentais nos diferentes momentos analisados.

### 5.2.2 Análise Ultra-Sonográfica

Os resultados da avaliação ultra-sonográfica transversal e longitudinal da lesão, após uma semana da aplicação de colagenase, demonstraram imagem hipocóica, bastante nítida, na maioria dos animais, possibilitando a delimitação e mensuração da área lesada, bem como a individualização das estruturas tendíneas e ligamentares adjacentes.

Os resultados obtidos no exame ultra-sonográfico demonstraram que os 48 dias de acompanhamento não foram suficientes para que as lesões atingissem a normalidade do padrão ecóico, definida como escore zero.

Ao analisarmos em separado a área total do tendão (Tabela 02, Figura 13) pode-se observar que não houve diferença entre os grupos nos diferentes momentos, além de ambos evoluírem de forma semelhante, apresentando a maior área ao dia 36, sendo a partir deste momento observada a tendência à diminuição.

TABELA 02: Valores médios da área total do tendão (cm<sup>2</sup>), dos grupos experimentais nos diferentes momentos analisados.

	0 dia	12 dias	24 dias	36 dias	48 dias
GA*	0,64 <sup>Aa</sup>	0,88 <sup>Aba</sup>	0,88 <sup>ABa</sup>	1,06 <sup>Ba</sup>	0,81 <sup>ABa</sup>
GB	0,68 <sup>Aa</sup>	0,86 <sup>Aba</sup>	0,84 <sup>ABa</sup>	1,03 <sup>Ba</sup>	0,71 <sup>Aa</sup>

\*GA – grupo tratado

GB – grupo controle

\*\*Para cada grupo, médias de momentos seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem significativamente ( $p>0,05$ )

Para cada momento, médias de grupos seguidas de letras minúsculas iguais não diferem significativamente ( $p>0,05$ )

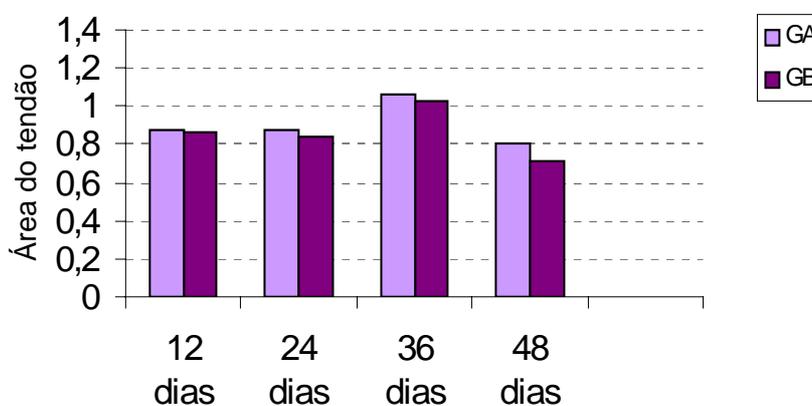


FIGURA 13: Valores médios da área total do tendão (cm<sup>2</sup>), dos grupos experimentais nos diferentes momentos analisados.

TABELA 03: Valores médios da área de lesão (cm<sup>2</sup>) dos grupos experimentais nos diferentes momentos analisados

	12 dias	24 dias	36 dias	48 dias
GA*	0,25 <sup>Aa</sup>	0,3 <sup>Aa</sup>	0,49 <sup>Ba</sup>	0,34 <sup>Aa</sup>
GB	0,12 <sup>Ab</sup>	0,27 <sup>ABa</sup>	0,38 <sup>Ba</sup>	0,17 <sup>Ab</sup>

\* GA - grupo tratado  
GB - grupo controle

\*\*Para cada grupo, médias de momentos seguidas de letras maiúsculas iguais, não diferem significativamente ( $p>0,05$ )

Para cada momento, medianas de grupos seguidas de letras minúsculas iguais, não diferem significativamente ( $p>0,05$ )

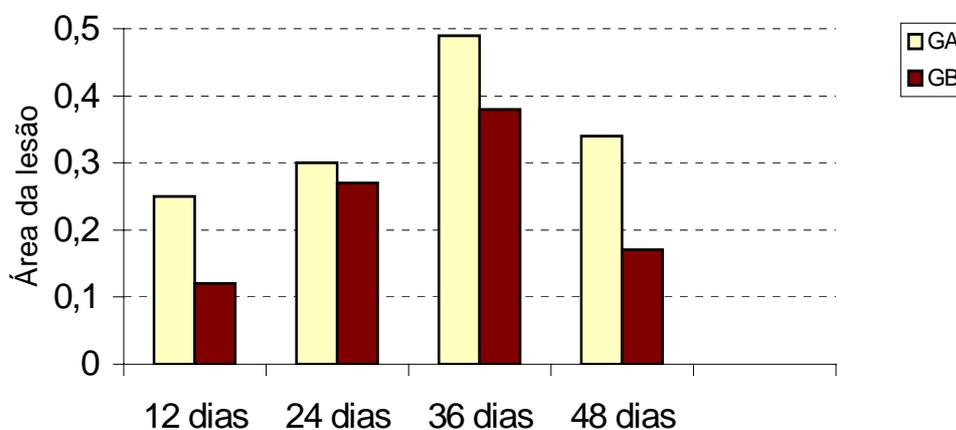


FIGURA 14 : Valores médios da área de lesão (cm<sup>2</sup>) dos grupos experimentais nos diferentes momentos analisados.

A análise da porcentagem de comprometimento de fibras, calculada pela relação entre área da lesão e área total do tendão, revelou-se semelhante à área da lesão, tanto na comparação dos momentos em cada grupo, como na comparação entre os grupos em cada momento (Tabela 04, Figura 15). Na interpretação dos resultados deve-se considerar que as lesões do grupo tratado já partiram de valor maior (25%), quando comparadas com o grupo controle (12%) e ao final do experimento a diferença significativa mostrou-se novamente presente, sendo observado no grupo tratado 34% e no controle 17%. Enfim, a diferença entre os grupos foi observada ao início e ao fim do experimento, sendo a porcentagem de comprometimento de fibras maior ao dia

48 do que ao dia 12, caracterizando a plena atividade do processo de reparo tendíneo ainda no término do experimento (Tabela 04, Figura 15).

TABELA 04: Valores médios da porcentagem da área de lesão em relação à área do tendão, dos grupos experimentais nos diferentes momentos analisados.

	12 dias	24 dias	36 dias	48 dias
GA*	0,25 <sup>Aa**</sup>	0,30 Aa	0,49 Ba	0,34 Aa
GB	0,12 Ab	0,27ABa	0,38 Ba	0,17 Ab

\*GA - grupo tratado  
GB - grupo controle

\*\*Para cada grupo, médias de momentos seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem significativamente ( $p > 0,05$ )

Para cada momento, médias de grupos seguidas de letras minúsculas iguais, não diferem significativamente ( $p > 0,05$ )

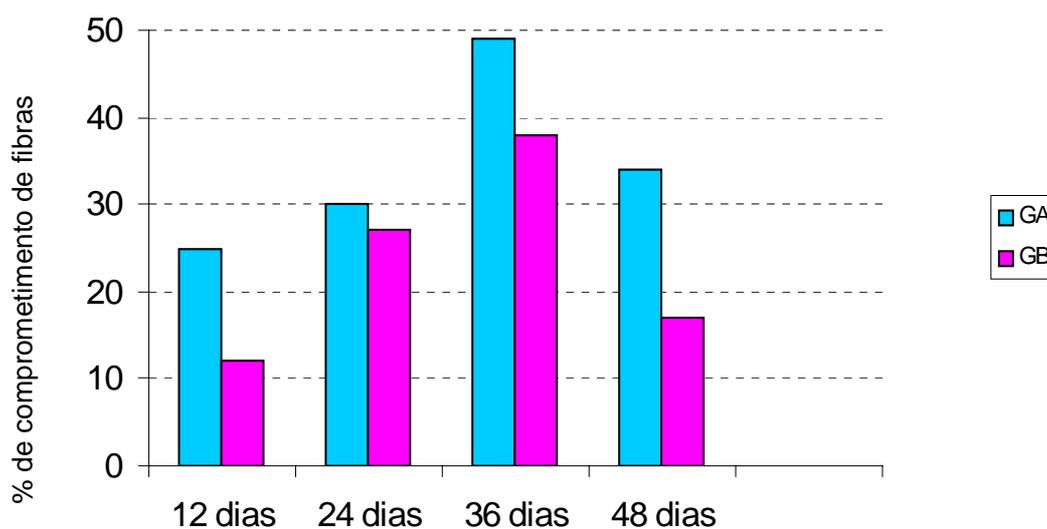


FIGURA 15: Valores médios da porcentagem da área de lesão em relação à área do tendão, dos grupos experimentais nos diferentes momentos analisados.

Ao comparar-se a média de ecogenicidade da lesão dos grupos nos diferentes momentos, observou-se diferença significativa apenas ao dia 12 (Tabela 05, Figura 16), no entanto quando analisados os momentos seguidos de cada grupo observou-se evolução diferente entre eles. No grupo tratado houve melhora do padrão ecogênico ao longo do experimento, o que não foi observado no grupo controle.

TABELA 05: Valores médios da ecogenicidade da lesão dos grupos experimentais nos diferentes momentos analisados.

	12 dias	24 dias	36 dias	48 dias
GA*	2,5 <sup>Aa**</sup>	2,5 <sup>Aa</sup>	2,5 <sup>Aa</sup>	2 <sup>Aa</sup>
GB	1,5 <sup>Ab</sup>	2 <sup>Aa</sup>	2,5 <sup>Ba</sup>	2,5 <sup>Ba</sup>

\*GA - grupo tratamento

GB - grupo controle

\*\*Para cada grupo, escores médios de momentos seguidos de letras maiúsculas iguais, não diferem significativamente ( $p>0,05$ )

Para cada momento, escores médios de grupos seguidas de letras minúsculas iguais, não diferem significativamente ( $p>0,05$ )

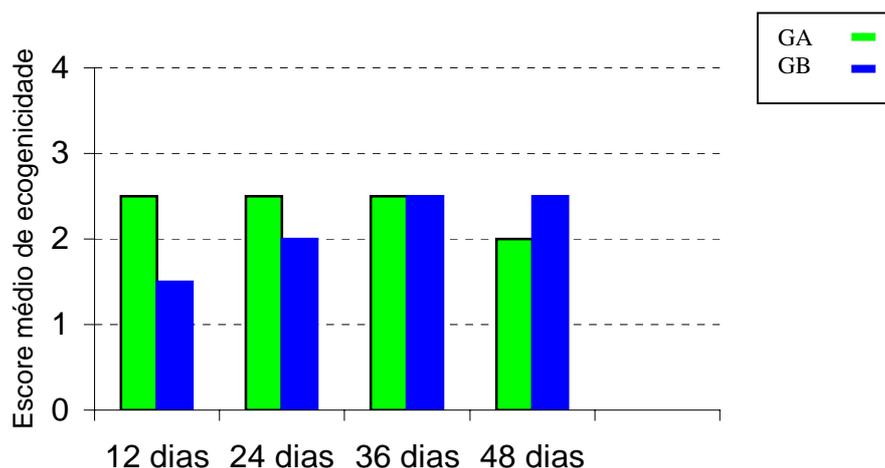


FIGURA 16 : Escores médios da ecogenicidade da lesão dos grupos experimentais nos diferentes momentos analisados.

### 5.2.3 ANÁLISE MACROSCÓPICA

Não foram observados sinais de infecção na área perilesional, em quaisquer dos animais, à inspeção cirúrgica no momento da biópsia.

O local da lesão foi identificado de modo preciso, em todos os membros do grupo tratamento (GA) e do grupo controle (GB), sem diferença entre eles, pois a área lesionada apresentou-se escura e sem o brilho usual das fibras tendíneas.

### 5.2.4 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA

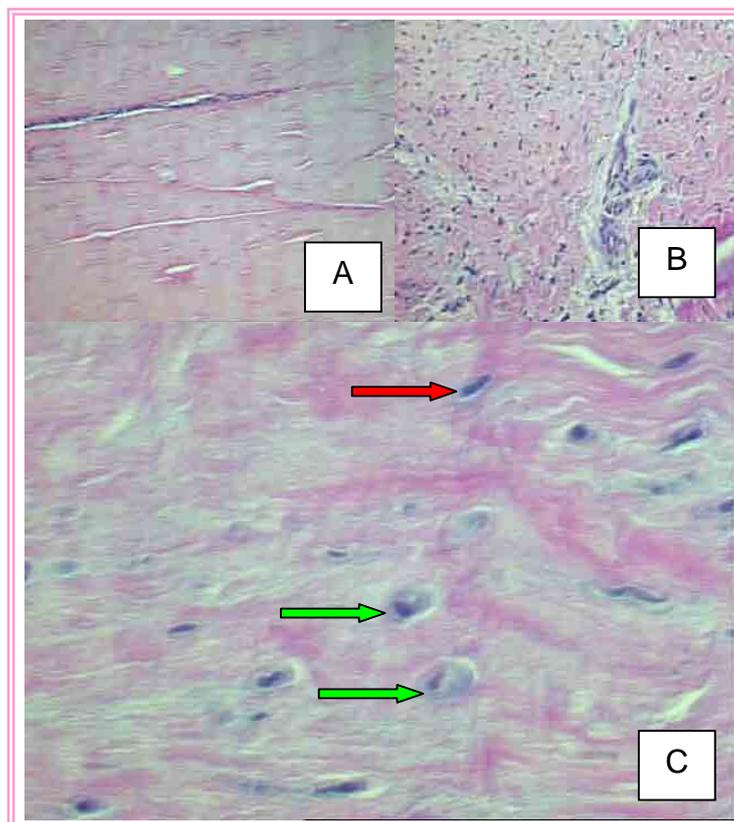
Os achados predominantes da análise histopatológica, em ambos os grupos foram de eventos pertinentes às fases iniciais da inflamação e subsequente reparo tendíneo, sendo observadas em fase aguda alterações vasculares (hemorragia e edema) e áreas de necrose, enquanto que os achados referentes à fase mais tardia do reparo foram encontradas características como infiltrados vasculares mononucleares, proliferação de fibroblastos e a intensificação da matriz extracelular.

No exame histopatológico do grupo controle (GB) foi observada a predominância de áreas de necrose, hemorragia e discreto infiltrado perivascular, enquanto que no grupo tratamento (GA) foi observada a predominância de áreas de intensa presença de MEC ainda em desarranjo, infiltrado perivascular, tecido de granulação exuberante e maior quantidade de tenócitos, caracterizando a predominância dos eventos iniciais da inflamação ao grupo controle e início do reparo no grupo tratamento. Neste grupo também foi observada a presença de células atípicas contendo citoplasma e núcleos grandes, sugerindo seu grau de maturação inicial (células indiferenciadas) (Figura 17).

Na avaliação imunoistoquímica, o anticorpo para TGF $\beta$ 1 mostrou marcação positiva dos fibroblastos ativados, sendo observado 30% de reatividade no grupo controle, comparado com 15,5% no grupo tratado (Figura 18). Este resultado sinaliza maior intensidade da liberação do TGF $\beta$ 1, citocina abundante no processo inflamatório tendíneo, no GB, quando comparado com o GA.

Quanto a imunoreatividade ao Ki-67 (MIB-1), que sinaliza proliferação tecidual, não houve diferença significativa entre os grupos, sendo encontrado o percentual de 8,1% no grupo tratado e 7,4% no controle (Figura 19). Entretanto, baseado em achados clínicos, ultra-sonográficos e histopatológicos observou-se reagudização da tendinite do animal 1, o que desviou a média do índice proliferativo do grupo controle. Ao analisar-se os dados sem contabilizar o citado animal, obteve-se diferente resultado, sendo notada diferença significativa entre os grupos (4,2% no grupo controle e 8,1% no grupo tratado).

Os resultados histopatológicos e imunoistoquímicos obtidos no presente estudo demonstraram que os grupos apresentaram diferença quanto à fase do reparo tendíneo, havendo predominância de eventos iniciais no grupo controle e eventos mais tardios no grupo tratado.



**FIGURA 17:** Histopatologia tendínea. A – Tendão normal com fibras colágenas alinhadas e tenócitos escassos, HE, 200x. B– Tendão do grupo tratado - desorganização das fibras colágenas, HE, 200x. C– Tendão do grupo tratado - presença de fibroblastos (seta vermelha) e células arredondadas indiferenciadas, com morfologia condróide (seta verde), HE, 400x.

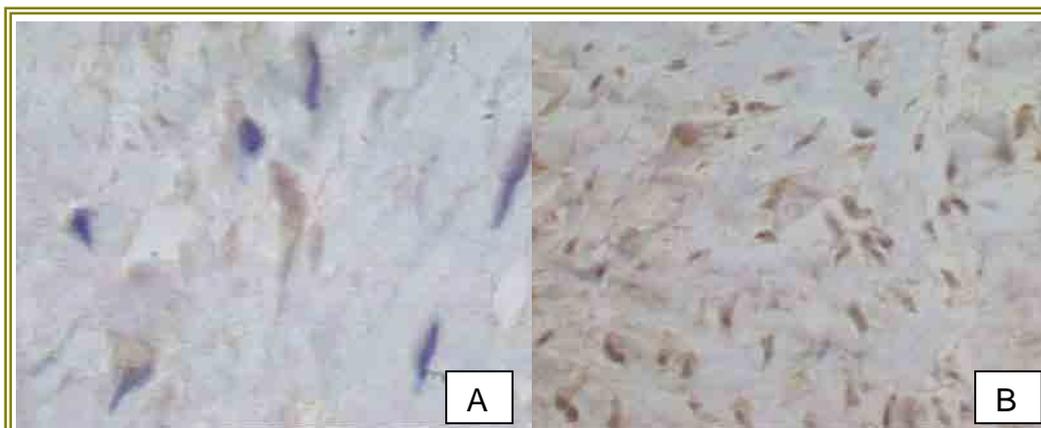


FIGURA 18: Imunomarcção citoplasmática para TGF $\beta$ 1, ABC, DAB contra coloração Hematoxilina, observado ao microscópio óptico. A– Grupo tratado com menor índice de imunomarcção, 1000x. B – Grupo controle, com maior índice de imunomarcção, 400x.

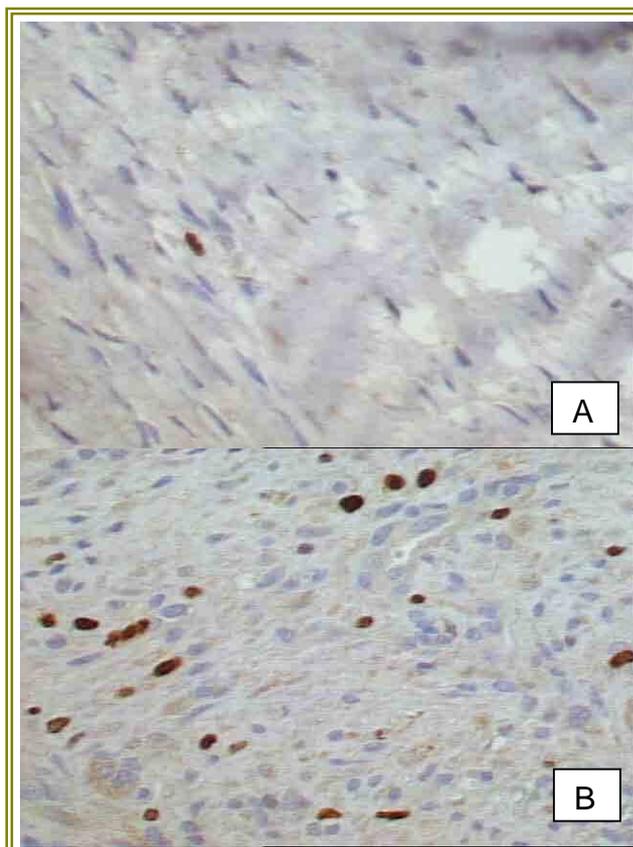


FIGURA 19: Imunomarcção nuclear para o anticorpo Ki-67 (clone MIB1), BC, DAB contra coloração Hematoxilina, observado ao microscópio óptico 400x. A – Grupo tratado com maior índice de imunomarcção. B – Grupo controle, com menor índice de imunomarcção.

## **6. DISCUSSÃO**

### **6.1 TÉCNICAS DE MANIPULAÇÃO DAS CÉLULAS MESENQUIMAIS**

#### **6.1.1 Punção Aspirativa de Medula Óssea**

Observou-se que a técnica da punção de medula óssea em esterno de eqüinos em estação, como descrito por Smith em 2003 é viável, apesar do desconforto causado à pessoa que coleta a amostra, devido à posição em relação ao animal e a força ventro-dorsal necessária para a penetração da agulha. A viabilidade da realização desta técnica deve ser ressaltada neste projeto, uma vez que os demais artigos publicados sobre a punção de medula óssea em eqüinos desenvolvidos por Herthel (2002) e Thomas (2003), a descrevem com animais mantidos em decúbito dorsal e sob anestesia geral.

A tranqüilização adotada mostrou-se eficiente na contenção para este procedimento, quando o animal foi posicionado no brete, não sendo necessária a anestesia geral, como descrito por Herthel (2002) e Thomas (2003). Desta maneira, o custo e risco da técnica foram reduzidos.

Apesar do tamanho da agulha e da extensa penetração no tecido ósseo, não foi observada manifestação de dor, sugerindo a eficácia do bloqueio anestésico aliado à sedação. No entanto, para avaliação adequada na mensuração da dor, seria necessário monitorar-se outros parâmetros.

Foram coletados em média 10-12 mL de medula, sendo esta quantidade suficiente para a obtenção da amostra, com pequeno volume (0,5 a 0,7 mL), pois segundo Redding e colaboradores (1998), volumes superiores a 1 mL,

quando injetados no tendão, promovem lesão de fibras por compressão. Todos os animais foram submetidos à punção de apenas um local e caso fosse necessária uma amostra de maior volume, demais sítios poderiam ser explorados, como sugerido por Katheleen (2000).

A aparência macroscópica das amostras mostrou-se semelhante às descrições de Car e Blue (2000), sendo caracterizadas por sangue com gotículas de gordura e presença de pequenos grânulos acinzentados (espículas). Entretanto, não encontramos descrição na literatura quanto à consistência gelatinosa da amostra, especialmente da primeira alíquota e sua persistência em formar pequenos agregados celulares, apesar do anticoagulante.

### **6.1.2 Separação da Fração Mononuclear**

O procedimento de separação mononuclear foi possível com a técnica descrita, o que vem ao encontro com os resultados obtidos por Perin e colaboradores (2003), que descreveram procedimento similar em humanos. Smith e colaboradores (2003) realizaram técnica semelhante em eqüinos, porém com cultivo das células mesenquimais *in vitro*.

O teste de viabilidade celular antes do implante foi realizado por Perin *et al.* (2003), com resultado superior (96%) ao obtido nesta pesquisa (76%). Os demais trabalhos publicados na espécie eqüina não realizaram este procedimento (HERTHEL, 2002; THOMAS, 2003; SMITH *et al.*, 2003). A discrepância de resultados entre a espécie humana e eqüina demonstra a necessidade de ajuste do procedimento à espécie, a ser realizado em futuras pesquisas. É possível que a utilização de centrífuga refrigerada diminua a morte celular, pois o procedimento requer até 30' de centrifugação, o que resulta em aquecimento do equipamento, caso este não seja refrigerado. Acredita-se na importância deste teste de viabilidade celular prévio ao implante, a fim de assegurar a confiabilidade do mesmo.

### **6.1.3 Implante das Células da Fração Mononuclear de Medula Óssea**

O implante celular foi realizado com facilidade, sendo a técnica de injeção intratendínea amplamente discutida pela literatura (GAUGHAN *et al.*, 1998; ALVES *et al.*, 2001a, 2001b; DAHLGREN *et al.*, 2001).

A intensificação da inflamação após o implante mostrou diferença em relação aos procedimentos terapêuticos de infiltração intralesional de glicosaminoglicanos ou FBAPN, nos quais não são observados aumento de volume ou sensibilidade à palpação tendínea, como descrito por Reef (1998). A inflamação causada pelo implante celular pode ser explicada pela presença de células, que precisam ser reconhecidas pelo organismo que as recebeu e, para isto, há necessidade da resposta celular da inflamação.

## **6.2 ANÁLISE DO REPARO TENDÍNEO**

### **6.2.1 Análise Clínica e Ultra-sonográfica**

Em concordância com a literatura (WILLIAMS,1984; SPURLOCK, *et al.*,1989; ALVES, 1998) pode-se afirmar que a tendinite induzida pela administração intratendínea de colagenase na dose de (0,5 mL, 2,5 mg/ mL) demonstrou ser um modelo eficiente para o estudo da reparação tecidual.

Como relatado por Foland *et al.* (2003), a administração da colagenase provocou alterações clínicas locais como aumento de volume e sensibilidade a palpação, em todos os animais implantados, bem como claudicações simétricas nos membros anteriores. Estes efeitos foram similares aqueles observados em lesão de ocorrência natural e aguda decorrente do exercício excessivo.

O aumento de volume na região após administração de colagenase foi interpretado como edema decorrente do processo inflamatório instalado. Este permaneceu, em média, 30 dias após a administração da colagenase em todos os animais, sendo que em alguns, esteve presente até o final do experimento, o que corrobora com os relatos de Williams (1984) e Gift *et al.* (1992).

O aumento da sensibilidade na área lesada, observado à palpação, foi atribuído ao processo inflamatório que se instalou no local, permanecendo em média até o 48º dia em ambos os grupos. Os resultados obtidos na presente pesquisa não foram similares aos de Williams (1984), que relataram a permanência das alterações clínicas por apenas uma semana, nos animais submetidos à injeção intratendínea de colagenase. Esta diferença entre os resultados experimentais pode ser justificada pela diferente concentração da colagenase, ou mesmo pela diferença no tamanho da lesão instalada neste experimento, porém este dado não pode ser avaliado, uma vez que não tenha sido realizado o acompanhamento ultra-sonográfico das lesões.

Os membros dos animais do grupo tratado com células-tronco contidas na fração mononuclear apresentaram discreto aumento de volume, além do já existente, iniciado 24 horas após o implante e perpetuando-se por até o dia 36 do experimento. Cinco membros tratados também apresentaram aumento de sensibilidade local e claudicação após a terapia celular. Estas alterações sugerem a intensificação do processo inflamatório no grupo tratado, achado que corrobora a análise ultra-sonográfica das lesões, o que pode justificar a aceleração do reparo tendíneo, já descrito.

Quanto à atividade locomotora, após administração de colagenase, observou-se claudicação moderada (grau 3) por até 12 dias no grupo tratamento e até 24 dias no grupo controle. Estes dados estão de acordo com Foland *et al.* (1992), que relataram aparecimento imediato de claudicação moderada após aplicação de colagenase.

As imagens sonográficas das lesões induzidas no presente experimento possibilitaram a delimitação de suas bordas, estando este resultado de acordo com os achados de Genovese *et al.* (1986); Alves (1994); Denoix (1996), porém diferentes dos resultados de Henry *et al.* (1986) que não obtiveram imagem nítida, mesmo após uma semana de ocorrência da lesão.

As imagens anecóicas e hipoecóicas, segundo Henry *et al.* (1986); Dyson (1989); Reef *et al.* (1989); Genovese *et al.* (1990), Alves *et al.* (1993); Goodship e Birch (1996), Reef *et al.* (1996), são compatíveis com áreas de hemorragia, edema e tecido de granulação inicial na fase aguda da lesão.

A lesão induzida no presente experimento com colagenase (2,5mg/mL; 0,5 mL) revelou comprometimento de até 49% das fibras no corte transversal

do grupo tratamento e até 38% no grupo controle, apresentando ecogenicidade média máxima de grau 2,5 em ambos os grupos. Estas lesões apresentaram-se maiores do que as produzidas no experimento realizado por Alves (1998).

Ao avaliar-se o padrão ecóico, foi observada diferença apenas no dia do implante, sendo o grupo tratado mais ecóico que o controle, apesar da escolha aleatória dos membros que iriam compor os grupos.

As alterações clínica e ultra-sonográfica observadas com o implante celular não parecem estar presentes nos demais tratamentos intratendíneos, como divulgado (REEF *et al.*, 1996; HENNINGER, 1994; JONES, 1996; CHVAPIL, 1996; DAVIS, 1996). Genovese (1992) observou, em membros tratados com FBAPN, o retorno mais rápido à ecogenicidade normal, quando comparado aos membros controle.

No presente estudo observou-se que o percentual de área de lesão apresentou-se maior ao final do experimento (GA: 34%; GB: 17%), quando comparado com o início do mesmo (GA: 25%; GB: 12%), apontando a intensa atividade de reparo ao 48º dia após a lesão, o que pode ser confirmado por estudos que sugerem o período mínimo de cicatrização tendínea de três meses (GILLIS, 1996; REEF, 1998)

Fato semelhante foi relatado por Genovese (1992), onde nas avaliações entre 14 e 19 semanas, 80% dos animais tratados com FBAPN e submetidos à exercício apresentaram diminuição significativa da lesão, comparado à 25% dos animais submetidos a outros tipos de tratamentos.

Apesar de acreditar-se que o protocolo de exercício adotado promoveu o estresse longitudinal no colágeno recém formado, como amplamente discutido pelos autores (HENNINGER, 1994; GILLIS, 1996; JONES, 1996), a organização longitudinal das fibras tendíneas não foi observada, pois as biópsias foram realizadas ao 48º dia após a indução da lesão e segundo Gillis (1996) e Alves (1998) seriam necessários ao menos 90 dias para avaliar esta característica. Futuros experimentos que tenham este enfoque devem ser desenvolvidos com este intuito.

As células-tronco mesenquimais demonstraram ter ação benéfica na fase inicial do processo de reparo, ou seja, durante o período de produção de matriz extracelular, beneficiando a redução do tamanho da lesão e de sua ecogenicidade nos 36º e 48º dias.

De acordo com os parâmetros utilizados para a avaliação ultrasonográfica, verifica-se que as células contidas na fração mononuclear de medula óssea atuaram na fase inicial do processo de reparo, semelhantes a outros tratamentos freqüentemente utilizados como os glicosaminoglicanos sulfatados e não sulfatados que estimulam a fibroplasia na fase inicial do processo de maturação (REDDING *et al.*, 1992; GAUGHAM, 1998; ALVES, 1998).

### **6.2.2 Análise Histopatológica e Imunoistoquímica**

Ao exame macroscópico identificou-se o local prévio da lesão por inspeção visual, em todos os membros do grupo controle e do grupo tratamento. Fato semelhante ocorreu no experimento de Williams (1984) que após eutanásia, identificou nitidamente as lesões tendíneas ao 6<sup>o</sup>, 9<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup> mês após a indução de tendinite experimental.

Os resultados obtidos no exame histopatológico realizado no 48<sup>o</sup> dia após a lesão mostraram que todos os grupos apresentaram fibroplasia de maneira semelhante aos relatos existentes na literatura (SILVER *et al.*, 1983; PEACOCK, 1984; SPURLOCK, 1989; GOODSHIP *et al.*, 1994; ROBBINS *et al.*, 1994). Foram observadas diferenças entre os grupos, quanto à fase do reparo tendíneo, sendo observadas ocorrências pertinentes à fase inicial no grupo controle e ocorrências mais tardias no grupo tratamento. Esta aceleração do processo de reparo vem confirmar os achados ultra-sonográficos. O estudo sob microscopia óptica, na coloração de hematoxilina-eosina, demonstrou que havia maior grau de necrose e hemorragia no grupo controle em comparação ao grupo tratamento do experimento.

As alterações histopatológicas encontradas ao dia 48<sup>o</sup> após a indução da lesão não estão de acordo com a cronologia divulgada por Pool (1996) e Davis (1996), onde são citadas a predominância de hemorragia, edema e necrose na primeira semana do processo de reparo tendíneo em eqüinos. No presente experimento estas alterações ainda encontravam-se presentes ao 48<sup>o</sup> dia, em especial nos animais do grupo controle.

Pool (1996) relatou que a diminuição da celularidade e 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.

Os mecanismos de diferenciação da célula precursora mesenquimal em tenócitos vem sendo ainda pesquisados, no entanto há dificuldade no reconhecimento das fases deste processo, quando analisadas as células por sua morfologia. Baseado neste fato foi relatada por Richardson (2005) a necessidade de marcações para o colágeno tipo I, sintetizado pelos tenócitos para identificar a célula por sua função, além de sua diferenciação através de marcadores superficiais. O encontro de células que possuíam citoplasma e núcleos grandes, com morfologia condróide, neste experimento determina a necessidade de pesquisas futuras na identificação das mesmas.

Assim sendo, considera-se que o efeito do tratamento com células da fração mononuclear de medula óssea, em especial as células precursoras mesenquimais, aplicadas a lesões tendíneas induzidas neste experimento, possibilitou melhora significativa na aceleração do reparo tendíneo, sob análise histopatológica. Esta consideração está de acordo com dados divulgados por Herthel (2002) e Thomas (2003), que sugeriam este efeito, porém baseados em análise clínica, ultra-sonográfica e funcional das estruturas tendo-ligamentares em resposta à terapia celular com células da medula óssea.

Os resultados histopatológicos foram confirmados pela imunoistoquímica, que revelou maior reatividade ao TGF $\beta$ 1 no grupo controle, quando comparado ao grupo tratamento. Houve diferença significativa, quanto ao número de fibroblastos marcados no grupo controle (30%), quando comparados com o grupo tratado (15%). A expressão do TGF  $\beta$ 1 pode explicar a diminuição da presença de células inflamatórias no grupo tratado (FU *et al.*, 2002) e sua marcação no tecido denota a predominância da liberação de citocinas, indicando a fase inicial do reparo. O TGF  $\beta$ 1 tem ação pró-inflamatória na fase inicial da reparo tecidual e também participa com menor intensidade na modulação da deposição de componentes da matriz extracelular, aumentando a síntese de colágeno, fibronectina e glicosaminoglicanos pelos fibroblastos (CHANG *et al.*, 1997). O resultado caracteriza a fase inicial da reparação tecidual no grupo controle, com intensa liberação de citocinas (TGF  $\beta$ 1),

resultando, posteriormente, na quimiotaxia dos fibroblastos e células inflamatórias. Entretanto, no grupo tratado, observa-se menor concentração do TGF  $\beta$ 1, sugerindo, em concordância com os resultados da histopatologia, a observação de fase posterior do reparo neste grupo.

O índice de marcação de células em proliferação pelo Ki-67, quando relacionado ao reparo tecidual, revela fase posterior àquela citada, quando já ocorreu a quimiotaxia e, uma vez os fibroblastos no local da inflamação, estes iniciam sua proliferação e a síntese de matriz extracelular (ALBERTS *et al.*, 2004). Apesar dos índices de Ki-67 mais elevados no grupo tratado, a diferença não foi significativa entre os grupos, quando analisados todos os animais do experimento, no entanto, ao serem verificados os resultados sem contabilizar dos dados discrepantes do animal 1, este índice mostrou-se o dobro no grupo tratado. A ocorrência da reagudização do processo inflamatório deste animal tornou a avaliação da proliferação celular difícil de ser discutida, pois quando considera-se sua presença em ambos os grupos não houve diferença significativa entre eles, no entanto quando analisados os dados sem este animal, observamos que o índice proliferativo do grupo tratamento (8%) revela-se o dobro do grupo controle (4%). Levando em consideração que a proliferação celular ocorre durante o crescimento, em processos oncológicos, remodelação e reparo tecidual, em especial durante a fase de granulação (RABENHORST *et al.*, 1993), acredita-se que os animais tratados revelaram maior índice proliferativo (com diferença significativa ou não) por estarem em média nesta fase do reparo (granulação). No entanto, demais estudos controlados devem ser realizados para confirmar esta afirmação. Novamente os dados condizem com os trabalhos publicados por Herthel (2002), Thomas (2003) e Smith (2003).

Nos resultados do presente experimento, a terapia celular atuou de forma sinérgica ao exercício, já que ambos os grupos foram submetidos ao programa de reabilitação. A ação benéfica conjunta da atividade física controlada com as demais terapias foi defendida por Chapvil (1996); entretanto, não há, até o presente momento na literatura, publicação sobre a ação do exercício em tendões que sofreram a terapia celular com células mesenquimais.

O tendão equino é constituído predominantemente por fibras colágenas tipo I, seguidas de fibras do tipo III (GOODSHIP *et al.*, 1994, ALVES, 1998). O

diâmetro destas moléculas difere, conferindo diferentes forças de tensão. Neste estudo não foram marcadas as moléculas de colágeno, devido ao período escolhido para a biópsia, porém deve-se salientar a importância de demais estudos sobre esta terapia em fases tardias do reparo.

Em síntese, os parâmetros utilizados na monitorização do reparo de lesão tendínea induzida quimicamente em eqüinos, permitiram demonstrar que o grupo submetido à terapia celular apresentou diferença benéfica em relação ao grupo controle.

Sendo assim, acredita-se que a utilização da terapia celular, combinada ao esquema de atividade física controlada e com acompanhamento de avaliações clínicas e ultra-sonográficas seriadas, pode acelerar o processo de reparação tendínea, podendo contribuir de maneira decisiva para a redução do período de recuperação.

No presente trabalho não possível verificar se as células-tronco mesenquimais regeneraram o tecido tendíneo ou promoveram apenas a aceleração do reparo. Estudos controlados futuros, com maior tempo de observação e número de animais experimentais poderão verificar a qualidade do tecido neoformado.

## **7. CONCLUSÕES**

Os resultados obtidos nas condições experimentais do presente estudo permitem concluir que:

- a) A técnica de punção aspirativa de medula óssea de esterno, realizada em eqüinos mantidos em estação, mostrou-se viável, possibilitando o estudo das terapias celulares com células precursoras meesenquimais na espécie.
  
- b) A terapia celular tendínea com células precursoras mesenquimais acelerou o processo de cicatrização tendínea.
  
- c) A utilização do exame ultra-sonográfico demonstrou ser um parâmetro eficaz na avaliação da evolução do processo de reparação tendínea, sendo observada equivalência entre os achados ultra-sonográficos, histopatológicos e imunoistoquímicos ao 48<sup>o</sup> dia do experimento, no que se refere ao estágio de evolução do processo de reparação tendínea.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALENCAR, M.M.A., PINTO, M.T., OLIVEIRA, D.M., PESSOA, A.W.P., CANDIDO, I.A., VIRGÍNIO, C.G., COELHO, H.S.M., ROCHA, M.F.G. Margem de segurança do meloxicam em cães: efeitos deletérios nas células sangüíneas e trato gastrointestinal. **Ciência Rural**. v.33, n.3, p.525-532, 2003.

ALONSO, L.; FUCHS, E. Stem cells of the skin epithelium **Proc. Nath. Acad. Sci. USA**. v. 100, n. 1, p. 11830-11835, 2003.

ALVES, A. L. G., BORGES, A. S., BARROS, B. P. et al. Tratamento de tendinites e desmites na espécie eqüina em sua fase aguda, utilizando o glicosaminoglicano polissulfatado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DO CBCAV, 2, 1996, Ribeirão Preto. **Anais...** Santa Maria: Finep, 1996. p. 96-8, 1996.

ALVES, A.L.G. Influência da beta-aminopropionitrila associada à atividade física na reparação de eqüinos após agressão pela colagenase. Análise ultrasonográfica e morfológica. 1998. 92p. **Tese de doutorado**. Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

ALVES, A.L.G.; RODRIGUES, M.A.M.; AGUIAR, A.J.A.; THOMASSIAN, A.; NICOLETTI, J.L.M.; HUSSNI, C.A.; BORGES, A.S. Effects of de beta-aminopropionitrie fumarate and exercise on equine tendon healing: Gross and histological aspects. **J. Equine Vet. Sci.**, v.21, p 335-340, 2001a.

ALVES, A.L.G.; RODRIGUES, M.A.M.; BORGES, A.S.; NICOLETTI, J.L.M.; THOMASSIAN, A.; HUSSNI, C.A. Influência do fumarato de beta-aminopropionitrila associada ao exercício na cicatrização tendínea – avaliação clínica e ultra-sonográfica. **Rev. Educ. Contin. CRMV-SP**, v.4, p. 17-19, 2001b.

BARREIRA, A.P.B.; BORGES, J.R.J.; CURY, L.; PITOMBO, C.A.; MACAHYBA, R. Adaptação tendínea de eqüinos, frente ao exercício: avaliação ultrasonográfica. **Rev. Bras. Ciênc. Vet.**, v. 9, n.1, p. 95-97, 2002.

BARTL, R.; FRISCH, B.E.; BUCHENRIEDER, B.; SOMMERFELD, W.; MUTHMANN, H.; JAGER, K.; HOFFMAN-FEZER, G.; BURKHARDT, R. Multiparameter studies on 650 bone marrow biopsy cores. Diagnostic value of combined utilization of imprints, cryostat, and plastic sections in medical practice. **Bibl. Haematol.** v.50, p.1-16, 1984.

BRAMLAGE L.R. Tendinitis, the approach to treatment. **Equine diagnostic ultrasound.** Baltimore: William e Wilkins, 1998.

CAMINOTO, E.H.; ALVES, A.L.G.; AMORIM, R.L.; THOMASSIAN, A.; HUSSNI, C.A.; NICOLETTI, J.L.M. Ultrastructural and immunocytochemical evaluation of the effects of extracorporeal shock wave treatment in the hindlimbs of horses with experimentally induced suspensory ligament desmitis. **American Journal of Veterinary Research.** V.66, n.5, p. 892-896, 2005.

CAR, B.D.; BLUE, J.T. Punção aspirativa e biópsia de medulla óssea. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Shalm's. Veterinary Hematology.** Philadelphia: Lippencott Williams and Wilkins, 2000, cap.4, p.18-29.

CHANG, J. Gene expression of transforming growth factor beta-1 in rabbit zone II flexor tendon wound healing: evidence for dual mechanisms of repair. **Plast. Reconstr. Surg.** Baltimore, v.100, p.397-344, 1997.

CHEN, J.C.J.; GOLDHAMER, D.J. Skeletal muscle stem cells. **Reprod. Biol. Endocrin.** 2003. disponível em [www.rbej.com](http://www.rbej.com). Acessado em 29/06/2004.

CHVAPIL, M. Present status of the pharmacology of fibrosis and scar contractures. In: DUBAI INTERNATIONAL EQUINE SYMPOSIUM,1996 **Proceedings of Dubai ...**, Dubai, 1996, p.395-406.

CRAYCHEE, T.J. Ultrasonographic evaluation of equine musculoskeletal injury. **Veterinary Diagnostic Ultrasound**, p.265-304, 1995.

DAHLGREN, L.A.; NIXON, A.J.; BROWER-TOLAND, B.D. Effect of beta-aminopropionitrile on equine tendon metabolism in vitro and on effects of insulin-like growth factor-I on matrix production by equine tenocytes. **Am. J. Vet. Res.**, v.62, n.10, p.1557-1562, 2001.

DAVIS, W. M. The clinical application of scar remodeling in disease status. In: DUBAI INTERNATIONAL EQUINE SYMPOSIUM, 1996, **Dubai. Proceedings ...** Dubai: Neyenesch Printers , 1996. p.407-16.

DENOIX, J. Functional anatomy of tendons and ligaments in the distal limbs (manus and pes). In: DUBAI INTERNATIONAL EQUINE SYMPOSIUM,1996. **Proceedings of Dubai.** Dubai, 1996, p. 23-81.

DYSON, S. J. The use of ultrasonography for assessment of tendon damage. **Equine Vet. Educ.**, v.1, p.42, 1989.

DYSON, S. J. Treatment of superficial digital flexor tendinitis: a comparison of conservative management, sodium hyaluronate, and glycosaminoglycan polysulfate. In: AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 43, 1997. **Proceedings...** Phoenix. *Lexington*, 1997. p.297 - 300.

FAGOT-LARGEAULT, A. Embryos, stem cells and cellular therapies – philosophical and anthropological problems. **Nature**, v.430, n.125, 2004.

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. 2371-6, 1992.

FORTIER, A.L.; NIXON, A.J.; WILLIAMS, J.; CABLE, C.S. Isolation and chondrocytic differentiation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Am. J. Vet. Res.** v. 59, n.9, p.1182-1187, 1998.

GAUGHAN, E. M. Managing tendinitis in horses. **Vet. Med.**, v.89, p.789 - 94, 1994.

GAUGHAN, E.M., DeBOWES, R.M.; GIFT, L.J. Medical Management of Flexor Tendon Disorders in Horses. **Equine Diagnostic Ultrasound**, 1<sup>a</sup> ed. Baltimore: William e Wilkins, 1998, p. 572-576.

GENOVESE, R.L Treatment of Superficial Digital Flexor Tendinitis – an opinion. **Equine Diagnostic Ultrasound**, Baltimore: William & Wilkins, 1998, p.543-571.

GENOVESE, R.L.; RANTANEN, N.W.; HAUSER, M.L.; SIMPSON, B.S.: Diagnostic Ultrasonography of equine limbs. **Vet. Clin. North Am. Equine Pract.**, v. 2, n. 1, p.145-226, 1986.

GENOVESE, R.L.; Reef, V.B.; Longo, K.L. Superficial digital flexor tendonitis: long term sonographic and clinical study of racehorses. In: DUBAI INTERNATIONAL EQUINE SYMPOSIUM,1996. **Proceedings of Dubai ...**, Dubai, 1996, p.187-205.

GIFT, L. J., GAUGHAM, R. M., DEBOWES, J. P. et al. The Influence of intratendinous sodium hyaluronate on tendon healing in horses. **Vet. Comp. Orthop. Traumatol.**, v. 5, p. 151-7, 1992.

GILLIS, C.L. Tendon and ligament rehabilitation. In: DUBAI INTERNATIONAL EQUINE SYMPOSIUM,1996. **Proceedings of Dubai ...**, Dubai, 1996, p. 417-422.

GILLIS, C.L.; MEAGHER, D.M.; POOL, R.R.; STOVER S.M.; CRAYCHEE, T.J.; WILLITS, N.: Ultrasonographically detected changes in equine superficial digital flexor tendons during the first months of race training. **Am. Journal. Vet. Residency**, v. 54, n.11, p.1797-1802, 1993.

GOODSHIP A.E.; BIRCH, H.L.; WILSON A.M.: The pathology and repair of tendon and ligament injury. **Vet. Clinics of North Am. Equine Pract.**, v. 10, n. 2, p. 323-349, 1994.

GOODSHIP A.E; BIRCH, H.L. The pathophysiology of the flexor tendon in the equine athlete. In: DUBAI INTERNATIONAL EQUINE SYMPOSIUM,1996 **Proceedings of Dubai ...**, Dubai, 1996, p.83-108.

HENNINGER, R., BRAMLAGE, L. R., BERTONE, A. L. Effects of tendon splitting on experimentally induced acute equine tendinitis. **Vet. Surg.** v. 20, p. 338, 1992.

HENRY, G. A., PATTON,C. S., GOBLE, D. O. Ultrasonographic evaluation of iatrogenic injuries of the accessory (carpal check) ligament and superficial digital flexor tendon. **Vet. Radiol.**, v.27, p.132-40, 1986.

HERTHEL, D.J. Suspensory desmitis therapies equine In: ACVS VETERINARY SYMPOSIUM, 2002, **Proceedings of ACVS...**, San Diego, 2002, p.165-167.

HORI, Y.; RULIFSON, I.C.; TSAI, B.C.; CAHOY, J.D.; KIM, S.K. Growth inhibitors promote differentiation of insulin-producing tissue from embryonic stem cells. **Proc. Nat. Acad.** [www.pnas.org](http://www.pnas.org), v. 99, n. 25,, p. 16105-16110, 2002.

HUMPHRIES, R.K; EAVES, A.C.; EAVES, C.J. Self-renewal of hematopoietic stem cells during mixed colony formation *in vitro*. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v.78, n.6, p.3629-2633, 1981.

JEFFCOTT L.B. Primary liver cell carcinoma in a young Thoroughbred horse. **Journal of Pathology** v. 97, p. 394-397, 1969.

JONES, W. E. World experts discuss tendons and ligaments **J. Equine. Vet. Sci.**, v.16, p.148 - 55, 1996.

KATHELEEN P.F. Bone marrow evaluation..In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Shalm's. Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lippencott Williams and Wilkins, 2000, cap.5, p.29-32.

LEVENBERG, S.; HUANG, N.F.; ROGERS, A.B.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; LANGER, R. Differentiation of human embryonic stem cells on three-dimensional polymer scaffolds. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v.10, n.22, 2003.

LI, A.; POULIOT, N.; REDVERS, R.; KAUR, P. Extensive tissue-regenerative capacity of neonatal human keratinocyte stem cells and their progeny. **J. Clin. Invest.** v.113, n.3, p.390-400, 2004.

MARR, C.M.; MCMILLAN, I.; BOYD, J.S.; WRIGHT, N.G.; MURRAY, M.: Ultrasonographic and histopathological findings in equine superficial digital flexor tendon injury. **Equine vet. Journal**, v. 25, n.1, p. 23-29, 1993.

McILWRAITH, C.W. Disease of joints, tendons, ligaments, and related structures. In: STASHAK, T.S. **Adams' lameness in horses**. 4 ed. Pennsylvania: Lea & Febiger, 1987. p.449.

MONTENEGRO, M.R.; FRANCO, M. **Patologia**: processos gerais 3.ed. Rio de Janeiro: Atheneu 1995. p. 263

MORRIS D.D.; WHITLOCK R.H. Relapsing idiopathic thrombocytopenia in a horse. **Equine Vet J.** v. 15, p.73-75, 1983.

MUSCHLER, G.F.; MIDURA, R.J.; NAKAMOTO, C. Practical modeling concepts for connective tissue stem cell and progenitor compartment kinetics **J. Biomed and Biotechnol.** v.3, p.170-193, 2003.

NELL, T.; BERGAN, J.; HOEIJMARKERS, M.; VAN LAAR, P.; HORSPOOL, L.J.I. Comparasion of vedaprofen and meloxicam in dogs with musculoskeletal pain and inflammation. **J. Small An. Pract.** v.43, p.208-212, 2002.

NEURINGER, I.P.; RANDELL, S.H. Stem cells and repair of lung injuries. **Respir. Res.** v. 5, n. 6, 2004

NGO, M.B.S. Gene expression of transforming growth factor beta-1 in rabbit zone II flexor tendon wound healing: evidence for dual mechanisms of repair. **Plast. Reconstr. Surg.** Baltimore, v.100, p.1260-1267, 1997.

OIKAWA, M; KASASHIMA, Y. The Japanese Experience with Tendonitis in Racehorses. **J. Equine Science.**, v.13, n.2, p. 41-56, 2002.

PASSEGUÉ, E.; JAMIESON, C.H.M.; AILLES, L.E.; WEISSMAN, I.L. Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? **Proc. Nat. Acad. Sci. USA** v. 100, n. 1, p. 11842-11849, 2003.

PATTERSON-KANE, J.C.; WILSON A.M.; FIRTH, E.C.; PARRY, D.A.D.; GOODSHIP, A.E.: Comparison of collagen fibril populations in the superficial digital flexor tendons of exercised and no exercised Thoroughbreds. **Equine Vet. Journal** ., v. 29, n.2, p. 121-125, 1997.

PATTERSON-KANE, J.C.; WILSON A.M.; FIRTH, E.C.; PARRY, D.A.D.; GOODSHIP, A.E. Exercise-related alterations in crimp morphology in the central regions of superficial digital flexor tendons from young Thoroughbreds: a controlled study. **Equine Vet. J.** v.30, n.1, p. 61-64, 1998.

PEACOCK , E. E., MADDEN, J. W. Some studies on the effects of beta aminopropionitrile in patients with injured flexor tendons. **Surgery**, v.66, p.215-23, 1969.

PEACOCK, E. E. **Wound repair**. Philadelphia, WB Saunders, 1984. 230p.

PERIN, E.C.; DOHMAN, F.R.; BOROJEVIC, R.; SILVA, S.A.; SOUSA, M.D.; MESQUITA, C.T.; ROSSI, M.I.D.; CARVALHO, A.C.; DUTRA, H.S.; DOHMAN, H.J.F.; SILVA, G.V.; BELÉM, L.; VIVACQUA, R.; RANGEL, F.O.D.; ESPORCATTE, R.; GENG, Y.J.; VAUGHN, W.K.; ASSAD, J.A.R.; MESQUITA, E.T.; WILLERSON, J.T. Transendocardial, autologous bone Marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure **Circulation**, v. 107 p. 2294-2302, 2003.

POOL, R. R. Pathologic changes in tendinitis of athletic horses. In: DUBAI INTERNATIONAL EQUINE SIMPOSIUM, 1996, **Dubai Proceedings ...** Dubai: Neyenesch Printers., 1996. p.109-17.

RANTANEN, N.W.; HAUSER, M.L.; GENOVESE, R.L. Superficial digital flexor tendinitis; diagnosis using real-time ultrasound imaging. **J. Equine Vet. Sci.** v.5, n.2, p.115-119, 1985.

REEDING, W.R.; BOOTH, L.C.; POOL, R.R. The effects of polysulfated glycosaminoglycan on the healing of collagenase-induced tendinitis of equine superficial digital flexor tendon. In: REEF, V.b. **Equine Diagnostic Ultrasound**. Baltimore: William e Wilkins, 1998.

REEF, V.B. **Equine diagnostic ultrasound**. Pennsylvania: W.B. Saunders Company, 1998.

RICHARDSON, L. The use of mesenchymal stem cells in the treatment of equine tendon injuries. Department of Veterinary Clinical Sciences, **The Royal Veterinary College**, 2005. (apostila)

ROONEY, J.R.; GENOVESE, R.L. A survey and analysis of bowed tendon in Thoroughbred racehorses. **J. Equine Vet. Sci.**, v.1, p.49-53, 1981.

ROSE, R.J.; HODGSON D.R. **Manual of equine practice**. 2.ed. Philadelphia: W.B. Saunders. 1993. p.330.

SISSON, S.; Grossman, J.D. **Anatomía de los animales domésticos**. 12. ed. Barcelona: Salvat Editores, 1975.

SMITH, R.K.W.; WEBBON, P.M.: The physiology of normal tendon and ligament. In: DUBAI INTERNATIONAL EQUINE SYMPOSIUM, 1996 **Proceedings of Dubai ...**, Dubai, 1996. p. 55-81.

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

SOARES, M.B.P; SANTOS, R.R Ética das manipulações genéticas: proposta para um código de conduta. **Parcerias Estratég.** n.16, p.153-161, 2002.

- SPEIRS, V.C. **Exame clínico de eqüinos**. Porto Alegre:Artmed p. 319 – 321, 1999.
- SPURLOCK, G. H., SPURLOCK, S. L., PARKER, G. A. Evaluation of hylartin V therapy for induced tendonitis in the horse. **J. Equine Vet. Sci.** v.9, p. 242-6, 1989.
- STASHAK, T.S. **Adams' lameness in horses**. 5ed. Pennsylvania: Lea & Febiger, 2002. p.449.
- TABLIN F.; WEISS L. Equine bone marrow. A quantitative analysis of erythroid maturation. **Anat. Rec.** v.213, p.202-206, 1985.
- TENG, Y.D.; LAVIK, E.B.; QU, X.; PARK, K.I.; OUREDNIK, J.; ZURAKOWSKI, D.; LANGER, R.; SNYDER, Y. Functional recovery following traumatic spinal cord injury mediated by a unique polymer scaffold seeded with neural stem cells **Proc. Nat. Acad. Sci. USA** v.99, n.5, p.3024-3029, 2002.
- THOMAS, HS Mending with marrow. **Horse**. p. 53-56, 2003.
- VILARTA, R., VIDAL, B. Anisotropic and biomechanical properties of tendons modified by exercise and denervation: Aggregation and macromolecular order in collagen bundles. **Matrix**, v. 9, p.55-61, 1989.
- WALTHER, A . BAPN. **The Horse**, v.9, p. 31 - 4, 1996.
- WILLIAMS, I. F. Studies on the pathogenesis of equine tendonitis following collagenase injury. **Res. Vet. Sci**, v. 36, p. 326-38, 1984.
- WILLIAMS. I.F. Studies on the pathogenesis of equine tendonitis following collagenase injury. **Res. Vet. Sci.** v. 36, p. 326-328, 1984.
- WILSON, J.H.; ROBINSON, R.A.; JENSEN, R.C. E MCARDLE. Equine soft tissue injuries associated with racing: descriptive statistics from american racetracks. **Dubai International Equine Symposium Proceedings**, p.1-22, 1996.
- WOOD, A.K.W.; SEHGAL, C.M. e POLANSKY, M. Sonographic brightness of the flexor tendons and ligaments in the metacarpal region of horses. **Am. J. Vet. Res.** v.54, n.12, 1993.
- WOOD, A.K.W.; SEHGAL, C.M. e REEF, V.B. Three-dimensional sonographic imaging of the equine superficial digital flexor tendon. **Am J Vet Res**, v.55, n.11, 1994.
- YOUNG R.G.; BUTLER D.L.; W. WEBER, CAPLAN A.I.; GORDON S.L. and FINK D.J. Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair, **J. Orthop. Res.**, v.16, n.4, p.406-413, 1998.

ZALZMAN, M.; GUPTA, S.; GIRI, R.K.; BERKOVICH, I.; SAPPAL, B.S.; KARNIELI, O.; ZERN, M.A.; FLEISCER, N.; EFRAT, S. Reversal of hyperglycemia in mice by using human expandable insuline-producing cells differentiated from fetal liver progenitor cells. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.** v.100, n. 12, p. 7253-7258, 2003.

ZUK, P.A.; ZUH, M., ASHJIAN, P. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Mol. Biol. Cell.** V. 13, p. 4279-4295, 2002.

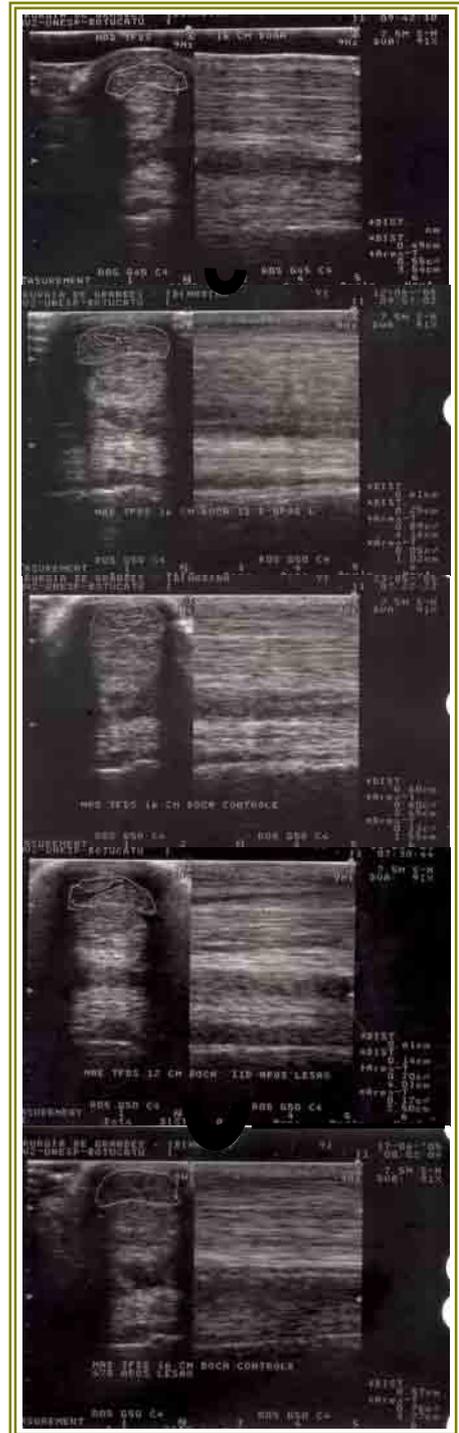
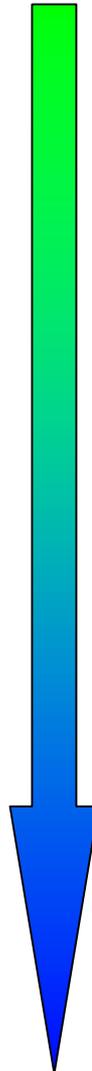
### ANEXOS

**ANEXO 1:** Acompanhamento ultra-sonográfico do animal 1 (MADINA) aos dias zero, 12, 24, 36 e 48 após a indução da lesão.

#### MEMBRO ANTERIOR ESQUERDO (Grupo Tratamento - GA)

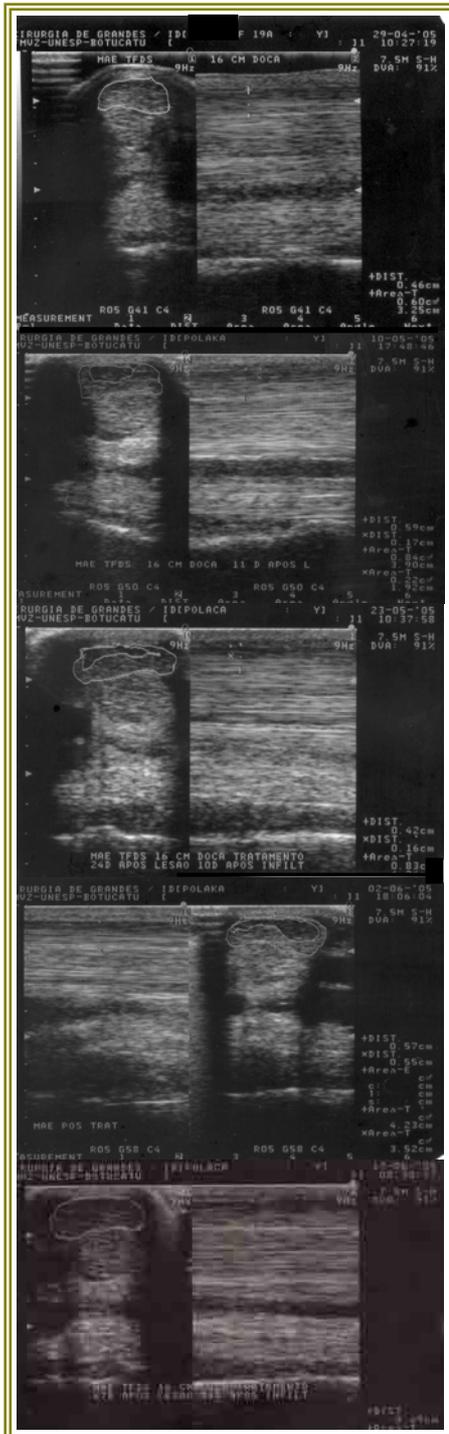
#### MEMBRO ANTERIOR DIREITO (Grupo Controle - GB)

EVOLUÇÃO DA  
LESÃO

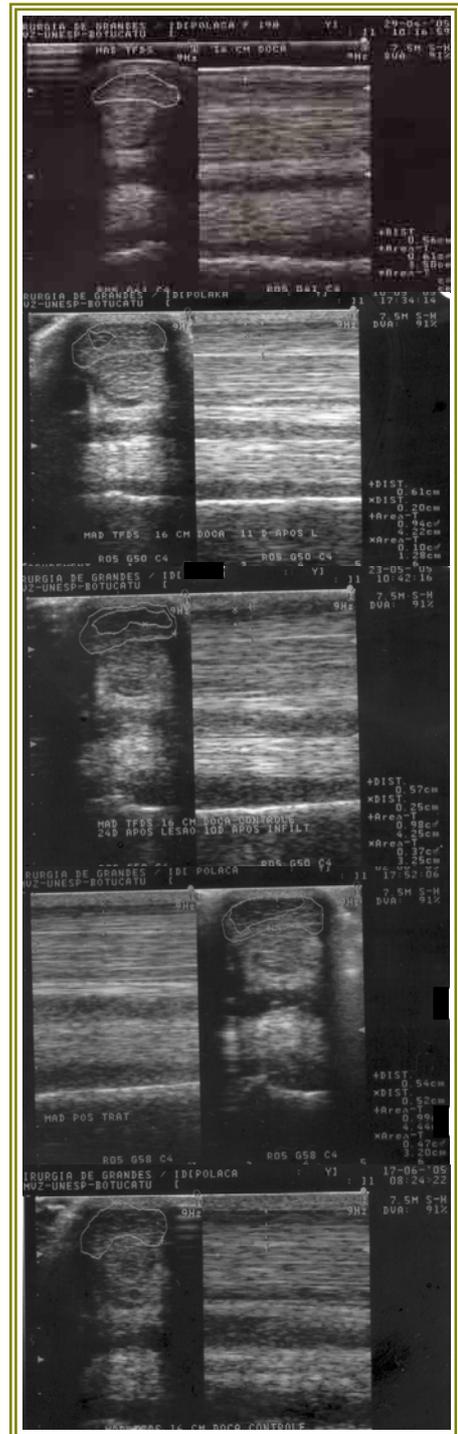


**ANEXO 2:** Acompanhamento ultra-sonográfico do animal 2 (POLACA) aos dias zero, 12, 24, 36 e 48 após a indução da lesão.

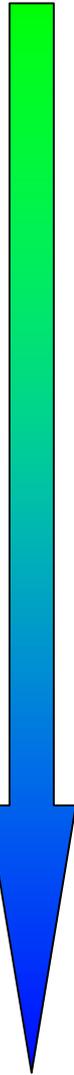
**MEMBRO ANTERIOR ESQUERDO**  
(Grupo Tratamento - GA)



**MEMBRO ANTERIOR DIREITO**  
(Grupo Controle - GB)

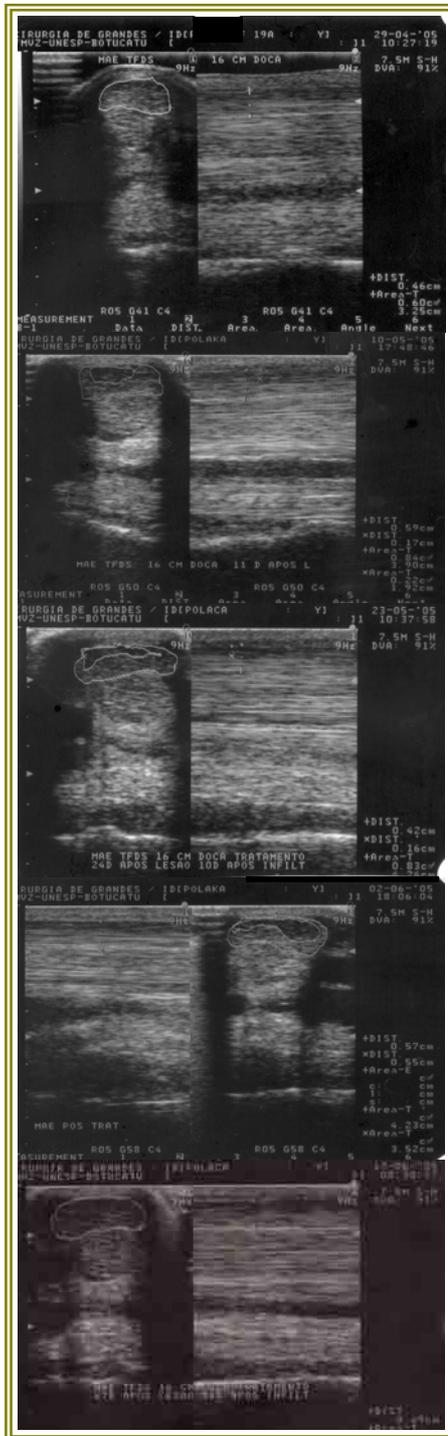


**EVOLUÇÃO DA  
LESÃO**

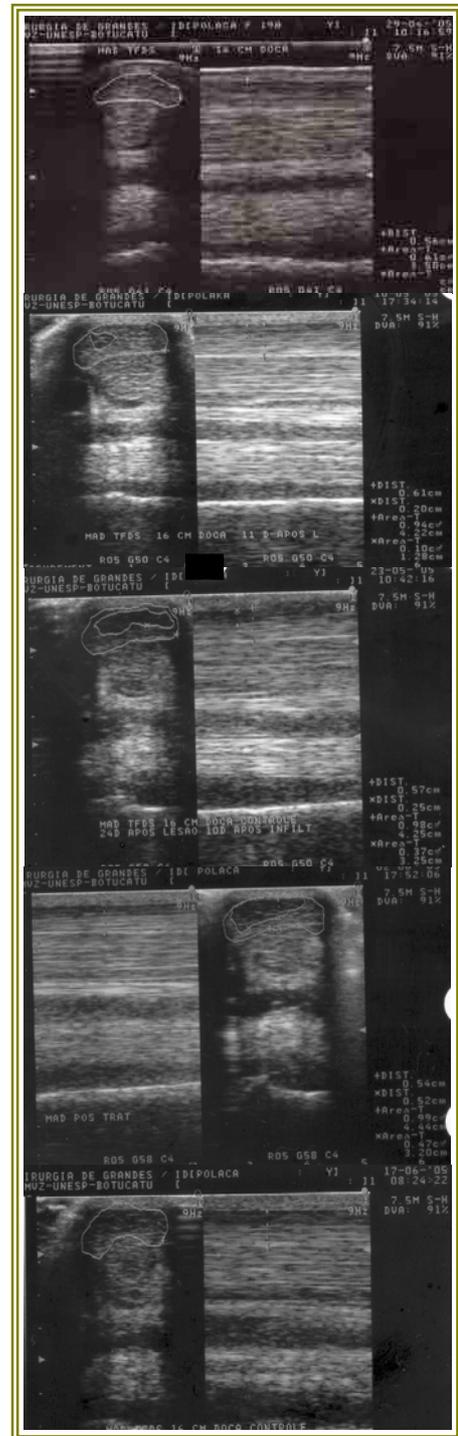


**ANEXO 3:** Acompanhamento ultra-sonográfico do animal 3 (MORENA) aos dias: zero, 12, 24, 36 e 48 após a indução da lesão.

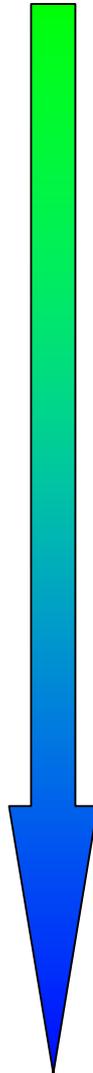
**MEMBRO ANTERIOR ESQUERDO  
(Grupo Tratamento - GA)**



**MEMBRO ANTERIOR DIREITO  
(Grupo Controle - GB)**



**EVOLUÇÃO DA  
LESÃO**

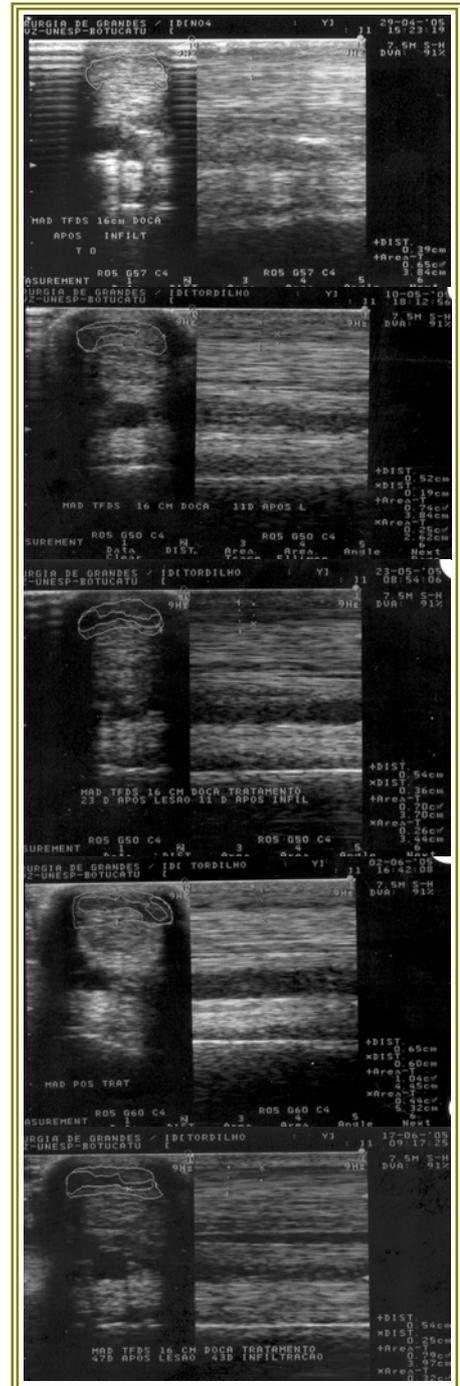
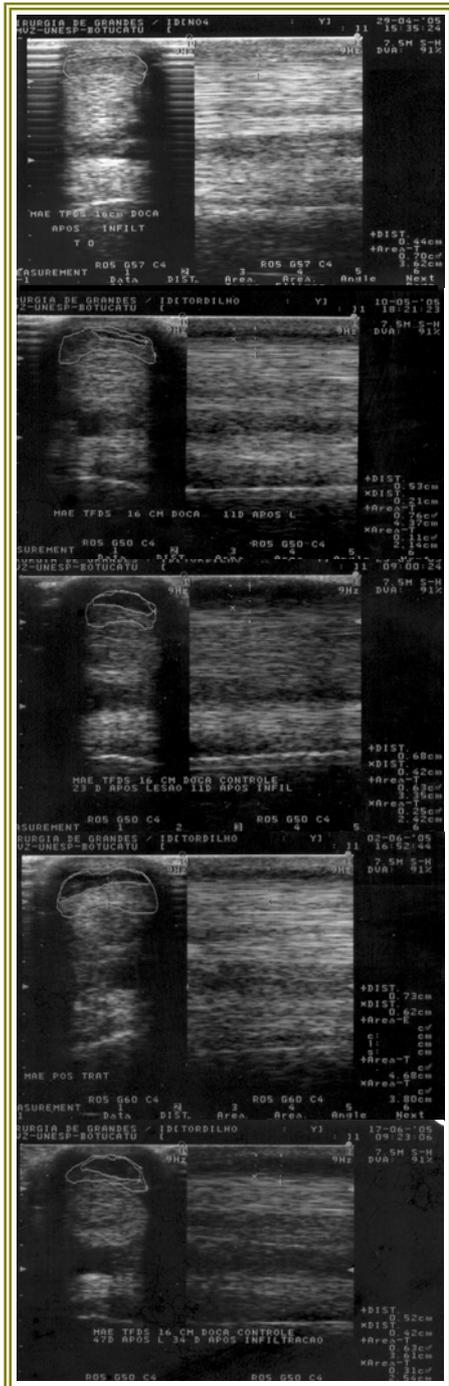


**ANEXO 4:** Acompanhamento ultra-sonográfico do animal 4 (TORDILHO) aos dias: zero, 12, 24, 36 e 48 após a indução da lesão.

**MEMBRO ANTERIOR ESQUERDO**  
(Grupo Tratamento - GA)

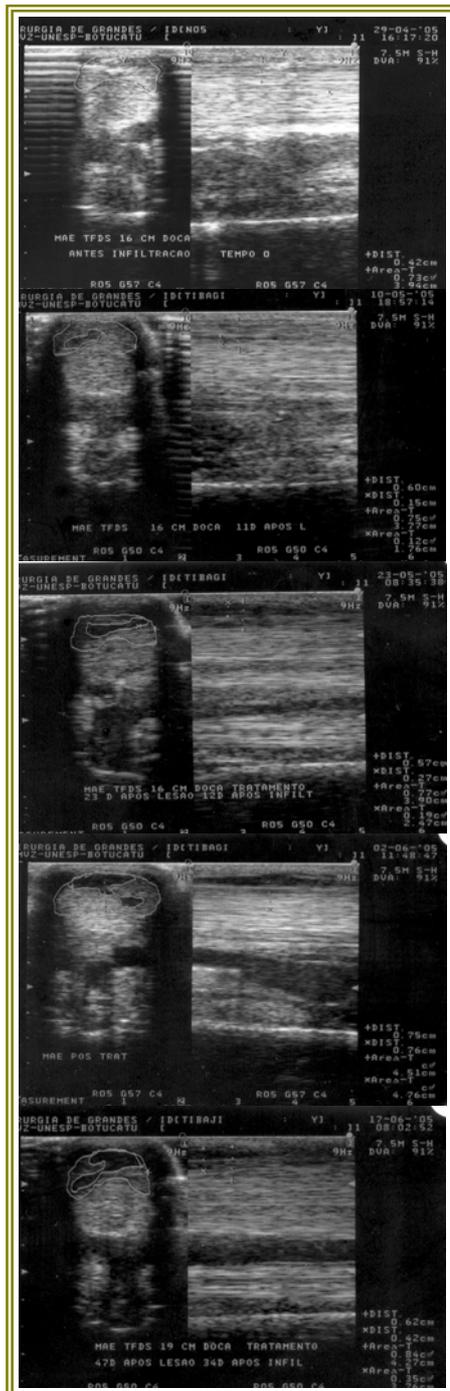
**MEMBRO ANTERIOR DIREITO**  
(Grupo Controle - GB)

**EVOLUÇÃO DA LESÃO**



**ANEXO 5:** Acompanhamento ultra-sonográfico do animal 5 (TIBAGI) aos dias: zero, 12, 24, 36 e 48 após a indução da lesão.

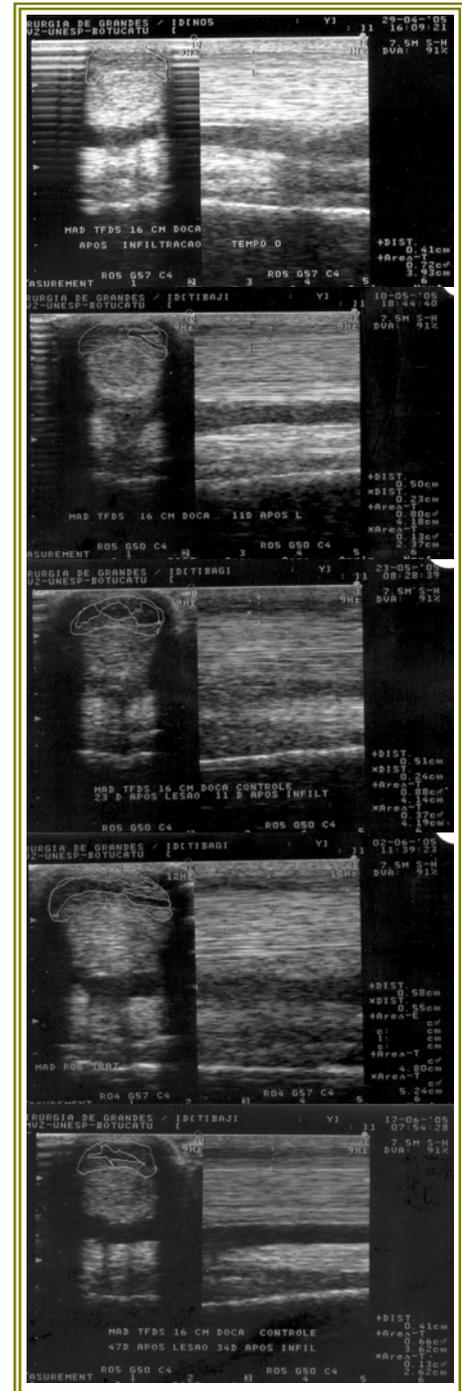
**MEMBRO ANTERIOR ESQUERDO**  
(Grupo Tratamento - GA)



**EVOLUÇÃO DA LESÃO**



**MEMBRO ANTERIOR DIREITO**  
(Grupo Controle - GB)

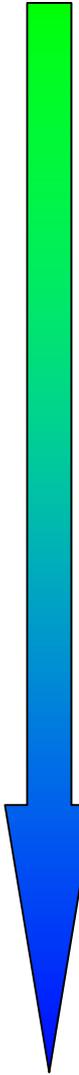
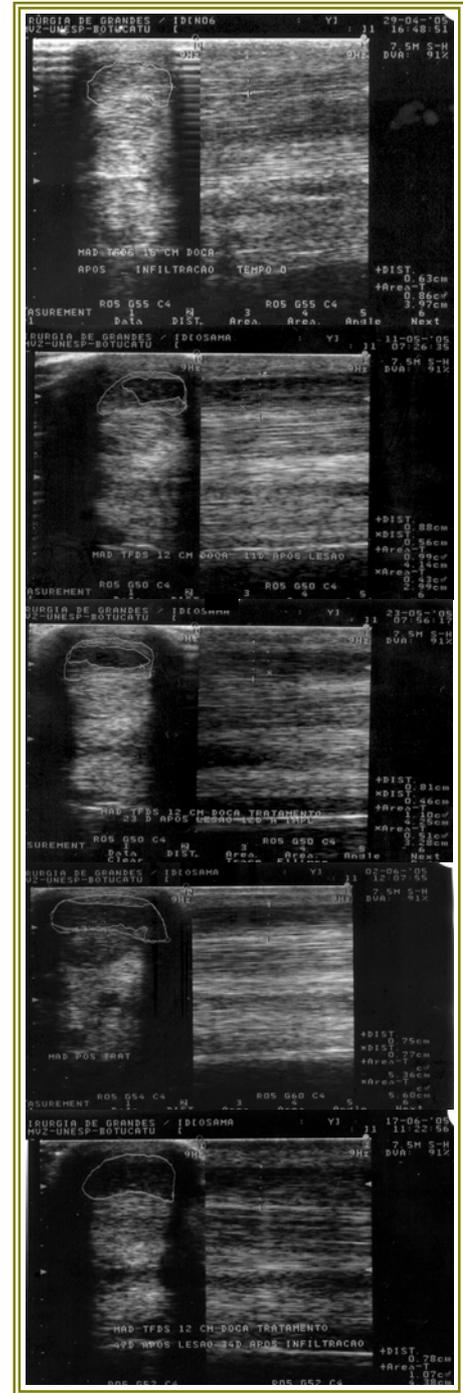
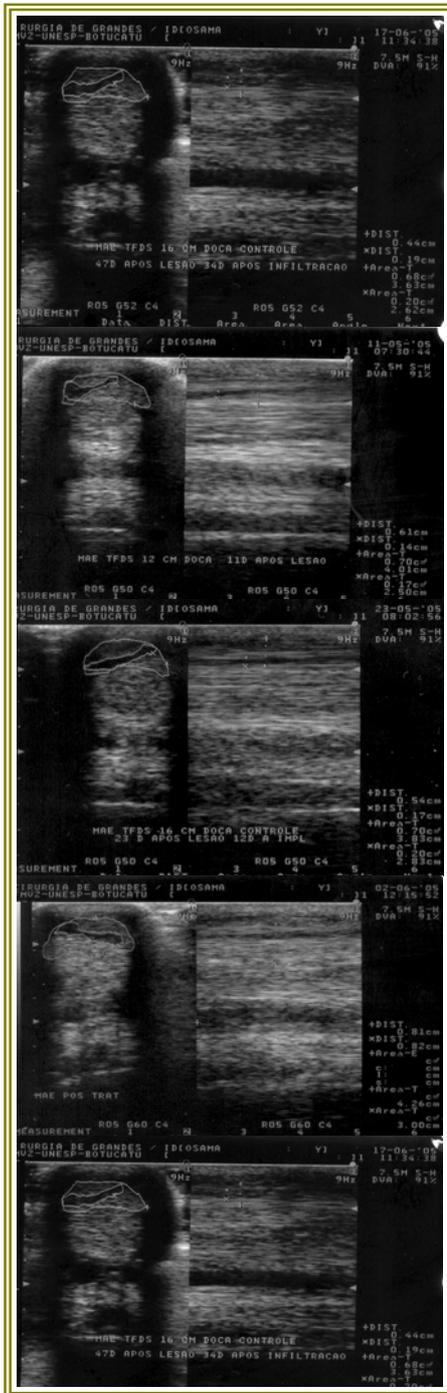


**ANEXO 6:** Acompanhamento ultra-sonográfico do animal 6 (OSAMA) aos dias: zero, 12, 24, 36 e 48 após a indução da lesão

**MEMBRO ANTERIOR ESQUERDO**  
(Grupo Tratamento - GA)

**MEMBRO ANTERIOR DIREITO**  
(Grupo Controle - GB)

**EVOLUÇÃO DA LESÃO**



**ANEXO 7:** Trabalho científico aceito para a publicação na íntegra, pela Revista Brasileira de Ciência Veterinária, UFF, RJ, em 31 de março de 2005.

## **PUNÇÃO ASPIRATIVA DE MEDULA ÓSSEA EM EQUÍNOS ADULTOS, COMO MÉTODO DE OBTENÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO**

### **BONE MARROW ASPIRATION IN ADULT HORSES - A STEM CELL OBTENTION TECHNIQUE**

APB Barreira<sup>1,2</sup>, DTL Bacellar<sup>1</sup>, RG Kiffer<sup>1</sup>, ALG Alves<sup>2</sup>

#### **RESUMO**

Ao final dos anos 90, os avanços médicos têm demonstrado crescente interesse na utilização das células-tronco em terapia de doenças degenerativas e em casos de cicatrização lenta ou de baixa qualidade. A medula óssea é uma fonte destas células precursoras em indivíduos adultos e seu isolamento pode ser realizado através de punção aspirativa. Este estudo tem como objetivo detalhar a técnica de punção aspirativa de medula óssea em eqüinos, que ao ser realizada no esterno do animal em estação, permite a obtenção de células precursoras. Desta forma pode-se fomentar sua pesquisa e aplicação na Medicina Veterinária. O esterno, sítio de escolha para a técnica na espécie eqüina, é usualmente acessado com o animal sob anestesia geral e em decúbito dorsal. Este experimento foi desenvolvido com cinco eqüinos sedados e mantidos em estação, como descrito anteriormente (SMITH *et al.*, 2003). Após a sedação e tricotomia local, as esternebras foram identificadas através da ultrasonografia. Nos locais marcados foram realizadas a antisepsia e a anestesia local. A agulha de biópsia Jamshidi (8 gauge and 15 cm) foi introduzida na 3<sup>a</sup> esternebra e o sangue aspirado com seringa de 20 mL sem anticoagulante. A amostra foi imediatamente utilizada para a realização de esfregaços e submetida a exames laboratoriais, com o objetivo de identificar sua origem, se medula óssea ou sangue periférico. Não foram descritos acidentes como perfurações pleural ou cardíaca, mas em somente duas das cinco amostras foi encontrado material proveniente de medula óssea. Este resultado demonstrou que a técnica é simples e, embora confiável, necessita de coletor treinado, a fim de otimizar resultados. Com o domínio da técnica será possível implementar a terapia celular em eqüinos, tanto em experimentos, quanto nas aplicações clínico-terapêuticas.

**Palavras-chave:** célula-tronco punção aspirativa, medula óssea, eqüino.

#### **ABSTRACT**

In the late 90's, the medical interest has been directed to the stem cells therapy of degenerative diseases as in cases of deficient healing process. In adults, the stem cells are found at bone marrow and their isolation could be accessed by aspiration technique. This study aims to evaluate a simple technique that enables adult horses stem cells collection, allowing further researches of cellular therapy in this species. The sternum is the site of choice for bone marrow aspiration in horses. Usually the animal is submitted to general anesthesia and it is positioned in dorsal recumbence. This experiment was developed with five sedated standing horses, as described before (SMITH *et al.*, 2003). After sedation and clipping, the sternbrae were identified by ultrasonography. The marked sites were scrubbed and local anesthesia done. A Jamshidi biopsy needle (8 gauge and 15 cm) was introduced in the 3<sup>rd</sup> sternbrae and a blood sample was aspirated in a 20 mL syringe with no anticoagulant. Smears were immediately prepared and submitted to laboratory examination to verify its origin. No accidental pleural or cardiac perforation was reported but only two out of five samples were confirmed as bone marrow. This result demonstrates that the technique although reliable, needs to be improved and the collector trained to maximize results. As the knowledge is obtained, the stem cell harvest experiment and clinical approach can be implemented in this species.

**Key word:** stem cell, aspiration, bone marrow, equine

<sup>1</sup> Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Castelo Branco, Av. Brasil, 9.727, CEP:21021-020, RJ, RJ. [balesdent@castelobranco.br](mailto:balesdent@castelobranco.br)

<sup>2</sup> Depto. de Cirurgia, UNESP, Distrito de Rubião Jr., CEP: 18618-000, Botucatu, SP.

## **INTRODUÇÃO**

As pesquisas com células-tronco têm sido desenvolvidas por pesquisadores de todo o mundo por seu potencial uso terapêutico. Estas células podem ser encontradas no embrião, no cordão umbilical e possivelmente na placenta. No indivíduo adulto encontra-se na medula óssea, nos tecidos ou órgãos como células-satélite, e em pequenas quantidades, até no sangue periférico.

Sendo o embrião a melhor fonte para a obtenção de células-tronco, foi gerada uma questão ética e religiosa, amplamente discutida em âmbito nacional e internacional, onde são debatidas a legalidade e as conseqüências da utilização destas células. Recentemente no Brasil, houve a aprovação da lei de biossegurança, pela Câmara do Deputados, permitindo pesquisas com “embriões de descarte” armazenados por um período maior que três anos. Apesar de não haver na Medicina Veterinária este grau de polêmica no envolvimento da manipulação de células embrionárias, faz-se notável a possibilidade e a facilidade de obtenção das mesmas no próprio indivíduo enfermo ou lesado, através de punção de medula óssea.

Até recentemente a técnica de punção aspirativa de medula óssea vinha sendo aplicada mundialmente na realização de transplante de medula, em casos de neoplasia, especialmente em leucemias. Hoje, com o amplo espectro de aplicações das células precursoras, há a necessidade de se estudar detalhadamente as técnicas de obtenção deste material, sua aplicação nas diversas espécies e questionar possíveis variações da mesma.

Este novo caminho deve ser trilhado também por médicos veterinários, pois os experimentos são, em sua maioria, realizados em animais. Além disto, temos que descobrir quais as situações clínicas que demandam a escolha desta nova modalidade terapêutica em animais.

Este estudo tem como objetivo avaliar uma técnica simples de punção aspirativa de medula óssea em esterno de eqüinos, permitindo a obtenção de células-tronco e desta forma, fomentar sua pesquisa e aplicação na Medicina Veterinária.

## **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **A Célula-tronco e as Terapias Celulares**

Recentemente vêm sendo descobertos novos conhecimentos sobre a célula-tronco, que além de possuir a capacidade de auto-renovação, revela amplo potencial de diferenciação em diversas linhagens celulares. Estas células participam do processo de crescimento, remodelação e cicatrização tecidual. Embora o conhecimento do reparo tecidual seja bastante antigo, apenas recentemente os pesquisadores identificaram estas populações celulares (SOARES e SANTOS, 2002; CHEN e GOLDHAMER; 2003; RICHARDSON, 2005).

As células-tronco encontradas em embriões humanos de até 5 a 7 dias, essencialmente indiferenciadas e capazes de formar um novo embrião inteiro, são chamadas totipotentes; aquelas encontradas no embrião mais velho, na placenta e cordão umbilical são pluripotentes, pois podem dar origem a vários tecidos, mas não todos. No entanto, as células-tronco contidas na medula óssea, em sítios específicos de cada tecido adulto e até no sangue periférico, são

denominadas células progenitoras. Elas possuem, em geral, um comprometimento com uma linhagem celular: endoderma, mesoderma ou ectoderma (FAGOT-LARGEAULT, 2004).

As células-tronco são encontradas em populações extremamente pequenas, em indivíduos adultos, variando de uma a sete células tronco em cada 100.000 células e se mantêm em repouso até que sejam quimicamente estimuladas a participar do remodelamento tecidual. Elas são identificadas por combinações de antígenos de superfície, como o CD 34, CD 45 e muitos outros (BALDUÍNO, 2003).

Os marcadores celulares são ativados ou desativados durante o processo de diferenciação, por meio de um comando genético. Se o comando determinar que a célula-tronco deve se transformar numa célula cardíaca, alguns sítios específicos serão ativados e outros desativados. Uma parte das células do organismo, no entanto, permanece em estado indiferenciado e serão as células progenitoras encontradas em organismos adultos (ALBERTS *et al.*, 2004).

Mesmo sendo derivadas de uma mesma linhagem germinativa, cada célula precursora dá origem a diferentes tecidos. As precursoras mesenquimais dão origem ao tecido conjuntivo, ou seja, fibroblastos, miofibroblastos, adipócitos, condrócitos, vasos sanguíneos, dentre outros. As demais linhagens, ectodérmica e endodérmica, dão origem ao parênquima dos diversos órgãos (MONTENEGRO e FRANCO, 1995; NEURINGER e RANDELL, 2004) .

A partir da descoberta do potencial de diferenciação destas células, tem sido explorada sua aplicação terapêutica, sob a forma de implante celular, a chamada de terapia celular ou na bioengenharia voltada para transplantes. Este novo campo de conhecimento é chamado de Medicina Regenerativa (LEVENBER *et al.*, 2003).

Estas células em repouso recebem o estímulo do ambiente para iniciarem a cascata de diferenciação. Este estímulo pode ocorrer durante o processo de cicatrização, pois este envolve uma complexa interação entre células inflamatórias, interleucinas, citocinas, proteínas da matriz extra-celular, e o desenvolvimento de novos capilares, que servem como estímulo (PERIN *et al.* 2003; BRUNO *et al.*, 2004).

Na medicina regenerativa, a otimização do reparo pode ser realizada pelo fornecimento destes elementos celulares requisitados, garantindo a geração de novas células. Também é necessária a produção de estruturas supramoleculares, ou seja, matriz extracelular, que providencie a organização espacial plenamente funcional dos novos tecidos gerados e sua integração sistêmica (LEVENBER *et al.*, 2003).

Contrastando com a utilização padronizada de fármacos, antibióticos ou vacinas, a medicina regenerativa é individual, dirigida especificamente a cada caso atendido, em seu contexto particular.

Atualmente, a aplicação da medicina regenerativa tem sido testada em humanos e em alguns animais em casos de infarto do miocárdio (PERIN *et al.*, 2003); no diabetes tipo I (HORI *et al.*, 2002; ZALZMAN *et al.*, 2003); em casos de lesão de medula espinhal (TENG *et al.*, 2002); em enfermidades pulmonares (NEURINGER e RANDELL, 2004); no tratamento de leucemias (HUMPHRIES, EAVES e EAVES, 1981; PASSEGUÉ, *et al.*, 2003); na reconstituição

de tecido epitelial intensamente comprometido, como em queimados (ALONSO e FUCHS, 2003; LI *et al.*, 2004); nas grandes perdas ósseas ((MUSCHLER, MIDURA e NAKAMOTO, 2003), em disfunções musculares (CHEN e GOLDHAMER, 2003), na recuperação de cartilagem (FORTIER *et al.*, 1998), nas tendopatias (YOUNG *et al.*, 1998; SMITH *et al.*, 2003; THOMAS, 2004) dentre outras enfermidades e lesões.

### **PUNÇÃO ASPIRATIVA DE MEDULA ÓSSEA EM EQUINOS**

As indicações usuais para a punção aspirativa de medula óssea costumavam incluir a presença de uma alteração persistente de sangue periférico, uma neoplasia (leucemia), infecção com potencial envolvimento da medula óssea, a identificação do estágio de linfoma e hipercalcemia de origem não revelada, dentre outras (KATHLEEN, 2001).

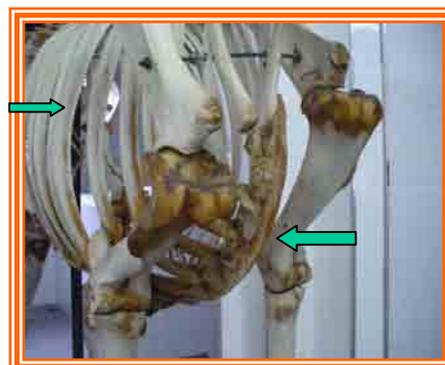
Hoje, as indicações para esta técnica foram ampliadas, tendo em vista a presença de células-tronco na medula óssea, mesmo em organismos adultos.

Os locais possíveis para a punção de medula óssea em animais adultos são os ossos do esterno, costela, pélvis e crânio, e os ossos longos, com úmero, fêmur e tibia, pois nestes locais há uma constante função hematopoiética. A hematopoiese extramedular, como a realizada pelo fígado, pode ser associada a exigências elevadas ou à supressão de medula óssea. O esterno é um local freqüentemente utilizado para se obter amostras de medula óssea em eqüinos, pois a atividade hematopoiética persiste na esternebra através da vida, os ossos não são cobertos por uma grande massa muscular, e a cavidade medular é coberta por uma fina camada de osso, facilitando o acesso a esta região. As desvantagens da punção deste local são a posição desconfortável e perigosa em que o coletor é forçado a assumir na obtenção das amostras e a relativa proximidade dos órgãos vitais, incluindo o coração (SPEIRS, 1999; FORTIER, 2001; THOMAS, 2003).

O esterno é um osso segmentado e mediano, que completa o esqueleto do tórax ventralmente e articula-se com as cartilagens das costelas esternais lateralmente. Ele consiste em um número de seis segmentos ósseos (Figura 1), as esternebrias, unidas por meio de cartilagem no indivíduo jovem. (SISSON, 1975).

Em animais jovens ou de pequeno porte (cães e gatos) a tuberosidade coxal é um local útil para a obtenção de amostras de medula óssea, pois não há órgãos adjacentes, e o osso é acessível abaixo da pele. É difícil obter diagnóstico de amostras deste local em cavalos mais velhos, pela densidade e espessura ósseas da região (JEFFCOTT, 1969).

A medula óssea também pode ser coletada nas costelas de animais de grande porte, pois neste local também é mantida a atividade hematopoiética através da vida, a medula está disponível próxima à superfície do osso, e o coletor se posiciona de forma segura, durante o



**Figura 1:** Esqueleto eqüino, sendo apontadas as possíveis áreas de punção aspirativa de medula óssea.

ato de punção. A única desvantagem fica representada pela pequena superfície da costela, o que dificulta no assentamento da agulha para penetração na superfície do osso. É freqüente o deslizamento da agulha no osso, possibilitando sua penetração nos músculos intercostais e conseqüentemente na caixa torácica (ROSE, 1993).

São recomendadas agulhas especiais para a coleta da medula óssea e dentre elas estão incluídas as agulhas modelo *Rosenthal*, *Illinois sternal*, e *Jamshidi*. A amostra deve ser coletada em solução anti-coagulante, apesar de haver relato de coletas sem o produto, caso os esfregaços sejam preparados com prontidão. Coletas *pos mortem* de medula óssea podem ser inúteis ou distorcidas por mudanças degenerativas ocorridas após 30 minutos da morte, mas o uso de solução albúme tem mostrado resultado em coletas adequadas em até 3 horas depois da morte (TABLIN, 1985).

Contrariando demais descrições da técnica (HERTHEL, 2002 e THOMAS, 2003), onde o eqüino é submetido à anestesia geral e decúbito dorsal, segundo SPIERS, 1999 e SMITH *et al.* (2003) seria possível realizar a punção do esterno do eqüino, com o animal em estação e sedado. Em ambas as situações, a agulha da medula óssea é introduzida através de uma pequena incisão realizada por bisturi. O osso é estabilizado em uma mão e pressão firme e rotação são utilizados para permitir a penetração da agulha no osso cortical. Uma vez firmemente assentado no osso, o mandril é removido e uma seringa de 10 a 20 mL, com ou sem anticoagulante, é utilizada para a aspiração. A agulha da coleta deve ser deixada no local da seringa e o mandril recolocado enquanto os esfregaços são preparados. Uma vez que material suficiente tenha sido obtido, a agulha é removida e um único ponto de sutura no local da incisão de pele pode ser necessário.

O ultra-som pode ser utilizado para a determinação do local de punção (THOMAS, 2003).

### **AMOSTRAS PROVENIENTES DE MEDULA ÓSSEA**

O processo de preparo das lâminas de esfregaço de medula óssea merece cuidadosa atenção, porque mesmo a coleta mais especializada pode ser inútil, caso o esfregaço seja de má qualidade. Caso o anticoagulante não tenha sido utilizado, as lâminas devem ser preparadas imediatamente e quando há anticoagulante na amostra, o esfregaço pode ser realizado até uma hora após a coleta (RUSSEL, SELLON e GRINDEM, 1994; KATHLEEN, 2001).

Múltiplas lâminas devem ser obtidas, dependendo do volume de material obtido, a fim de assegurar a aplicação das técnicas regulares e especiais na amostra. A coagulação impede a apresentação da célula individual e obscurece detalhes celulares. A medula é expelida diretamente numa lâmina de vidro limpa e rotulada. A lâmina é inclinada para permitir que a porção de fluido escorra lâmina abaixo deixando as partículas de medula aderentes (BARTL, 1984; KATHLEEN, 2001).

Se o material da seringa incluir anticoagulante, expeli-lo numa placa Petri é de benefício para a avaliação e seleção das partículas de medula. As partículas de medula são observadas

como fragmentos cinzas, opacos, de formas irregulares que se grudam no fundo da placa quando esse é inclinado. Eles geralmente são distinguíveis de glóbulos de gordura claros, brilhosos e esféricos. As partículas de medula são transferidas para uma lâmina limpa e identificada. As partículas de medula óssea são comprimidas usando-se o método de “squash”. Esta tática resulta numa cadeia de esfregaços que fornecem morfologia e apresentação aceitáveis após a coloração. Pressão excessiva pode resultar em distorção ou ruptura das células (RUSSEL, SELTON e GRINDEM, 1994; KATHLEEN, 2001).

Elas devem ser rapidamente secas ao ar para uma melhor manutenção da morfologia celular. Vários pigmentos, como o de Romanowsky ou hematoxilina e eosina, podem ser utilizados na avaliação de rotina da medula óssea aspirada. A concentração dos corantes precisa ser aumentada quando comparada à concentração utilizada para corar esfregaços de sangue periférico, sendo esta concentração dependente da celularidade do aspirado de medula óssea e da espessura da preparação dos esfregaços (BARTL, 1984; RUSSEL, SELTON e GRINDEM, 1994; KATHLEEN, 2001).

### **COMPLICAÇÕES DA PUNÇÃO**

A contenção correta e tranquilização dos eqüinos minimiza as possíveis complicações relacionadas ao procedimento. O preparo cirúrgico do local de punção, o uso de instrumentos esterilizados, luvas e técnicas ante-sépticas minimizam o risco de infecções iatrogênicas. Se o paciente tem anomalias de coagulação, como a trombocitopenia ou coagulação intravascular disseminada pode ocorrer hemorragia. O controle da hemorragia deve ser realizado por pressão direta no local da biópsia por três a cinco minutos. Caso a condição do paciente seja severamente complicada, uma transfusão de sangue é realizada. Quando o esterno ou a aproximação costal é utilizada, o clínico deve ser cuidadoso ao introduzir a agulha diretamente na esternobra ou costela, para evitar a entrada na cavidade torácica. O risco de pneumotórax, hemorragia incontrolada ou laceração cardíaca pode ser diminuído pelo uso da vigilância e monitoria da agulha durante o procedimento (MORRIS, 1983).

## **3. MATERIAS E MÉTODOS**

### **3.1. População e amostras**

Dos animais:

Foram escolhidos aleatoriamente 5 animais da raça Mangalarga Marchador, dentre uma população de um haras da região serrana do estado do Rio de Janeiro, no Município de Miguel Pereira, sendo submetidos à semelhante manejo alimentar, condições sanitárias e de exercício. Os animais apresentavam idade de 4 a 10 anos, eram vacinados e vermifugados, além de não possuírem enfermidades ou alterações morfológicas.

### **3.2. Exame ultra-sonográfico**

Os animais sofreram tricotomia na região esternal, desde a região mais cranial do manúbrio, até a cartilagem xifóide. Para execução do exame sonográfico foi utilizado o

equipamento portátil da marca GE modelo Logic  $\alpha$ -100, provido de transdutor linear convexo de 5 MHz. A varredura foi executada obliquamente à linha média do esterno, permitindo a localização da 3ª e 4ª esternebra e em seguida, com caneta marcadora definiu-se o local de punção.

### 3.3. Punção Aspirativa

Após a localização das esternebbras através do exame ultra-sonográfico iniciou-se a anti-sepsia local de região do esterno marcado, utilizado um sabão antimicrobiano (Biocid®), sendo posteriormente lavado com soro fisiológico e gaze esteril.

A sedação foi realizada com romifidina na dosagem de 40mcg/Kg P.V., por via intravenosa, sendo mantido o animal em estação no brete. O bloqueio anestésico foi realizado com cloridrato de lidocaína a 2%, sem vasoconstritor, sendo feito um infiltrado subcutâneo, intra-muscular e próximo ao perióstio, sobre o local marcado anteriormente. Em seguida, foi realizada uma pequena incisão com bisturi nº 11, através da pele e subcutâneo, permitindo a introdução de agulha, modelo Jamshid (8 de calibre, 15 cm de comprimento), na musculatura por uma profundidade de 4-6cm até chegar na superfície da esternebra. Após sentir-se a superfície óssea na extremidade da agulha faz



**Figura 2:** Técnica de punção aspirativa de medula óssea no externo.

uma pressão sobre a mesma, a fim de permitir sua penetração por mais 4-5 cm até a agulha ficar firme (Figura 2). Dentro da medula óssea, uma vez bem fixa a agulha, realiza-se a aspiração nas células da medula óssea com auxílio de uma seringa de 20 mL sem anti-coagulante. Cada amostra obtida foi utilizada para realização de 5 esfregaços, que foram encaminhados ao laboratório para confirmação da origem do material, se de medula óssea ou não.

### 3.4. Análise da amostra

No laboratório de Patologia Clínica da Universidade Castelo Branco, foram analisadas as amostras, para confirmação da obtenção de células de medula óssea. As amostras foram coradas pelo método de Romanowsky e as populações celulares avaliadas morfológicamente. A presença apenas células sangüíneas periféricas sugeriram a presença de sangue periférico, enquanto que a presença de células precursoras hematopoiéticas confirmavam a origem medular da amostra.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A sedação adotada se mostrou eficiente, quando o animal é posicionado em brete, na contenção para tal procedimento.

Observou-se que a técnica da punção de medula óssea em esterno de eqüinos mantidos em estação, como descrito por THOMAS em 2003 é viável, apesar do desconforto causado ao coletor, devido à posição em relação ao animal e a força em sentido ventro-dorsal necessária para a penetração da agulha. A viabilidade da realização desta técnica deve ser ressaltada neste projeto, uma vez que os demais artigos publicados sobre a punção de medula óssea em eqüinos, desenvolvidos HERTHEL (2002) e SMITH (2003), a descrevem com animais mantidos em decúbito dorsal e sob anestesia geral.

Apesar do tamanho da agulha e da extensa penetração no tecido ósseo, não foi observada manifestação de dor, sugerindo a eficácia do bloqueio anestésico aliado à sedação. Para uma avaliação adequada na mensuração da dor, seria necessário monitorar a frequência cardíaca do animal.

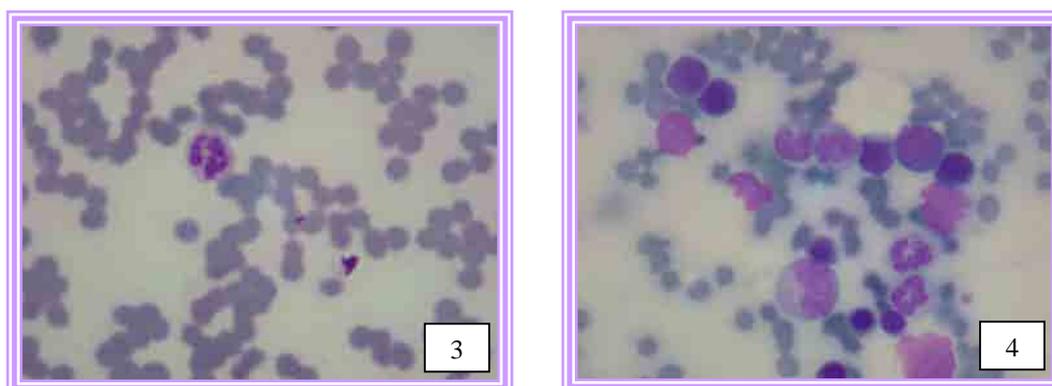
A punção realizada no animal mais jovem do grupo (animal 2), com 3 anos de idade, apresentou maior facilidade de penetração da agulha, possivelmente devido à mineralização incompleta de seu esqueleto, facilitando a técnica de punção, devido à menor força exercida pelo coletor. Apesar da facilidade de penetração da agulha, a amostra foi obtida após inúmeros bombeamentos, sendo obtido 1,5 mL de sangue.

No animal mais idoso, de 9 anos de idade (animal 1), a penetração da agulha revelou um maior grau de dificuldade, explicada pela mineralização já completa de seu esqueleto. Desta forma, a técnica de punção de medula óssea torna-se mais difícil, devido à maior força exercida, mas a amostra foi mais abundante (5 mL). Os demais animais apresentaram resistência intermediária na penetração da agulha e as amostras obtidas continham em média 0,5 mL.

Apesar das particularidades descritas, coletou-se quantidade significativa de sangue, entre 0,5 a 5,0 mL, dos 5 animais submetidos à punção de apenas um local. Esta amostra foi suficiente para a realização dos esfregaços deste projeto, porém caso a amostra fosse submetida à cultura para expansão da população de células-tronco, como realizada por SMITH (2003), onde era necessária uma alíquota de 1,8 mL, talvez devesse ser considerada a punção de diversos sítios.

A aparência macroscópica das amostras obtidas em 3 dos 5 animais era semelhante, sendo caracterizada por sangue de coloração levemente clara, com gotículas de gordura e pela presença de pequenos grânulos acinzentados, como descrito por CAR e BLUE (2000). Apesar desta aparência, em apenas duas das cinco amostras foi confirmada a origem medular. As demais amostras apresentavam coloração mais escura e a ausência de gordura ou grânulos, e ao serem avaliada pela microscopia, confirmou-se a presença de apenas sangue periférico (Figura 3).

A análise microscópica teve apenas a função de identificar as células características de medula óssea, através da análise de sua morfologia (Figura 4). Uma vez confirmada a origem medular da amostra, considera-se a presença de células tronco dentre sua população.



**Figura 3:** Sangue periférico, composto por células maduras (a esq.). **Figura 4:** Sangue de medula óssea, com células imaturas (à dir.).

## CONCLUSÃO

Baseado na obtenção de material de medula óssea em dois dos cinco animais puncionados neste trabalho, pode-se confirmar a viabilidade desta técnica com animal em estação, ressaltando seu baixo custo e menor risco ao animal. Ao divulgar esta técnica simplificada, acredita-se tornar a medicina regenerativa acessível aos profissionais localizados a campo. Apesar da viabilidade, deve ser relatada a dificuldade de posicionamento do coletor ao realizar a punção de medula óssea e a falta de representatividade da amostra em relação à população equina como um todo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula** 4a ed. Porto Alegre: Artmed, 2004 cap. 22.
- ALONSO, L.; FUCHS, E.; Stem Cells of the skin epithelium [www.pnas.org](http://www.pnas.org) v. 100, n. 01, p. 11830-11835, 2003.
- BALDUÍNO, A. Células-tronco em terapias celulares, uma atualidade. In: **II Fórum em Medicina Veterinária** da Universidade Castelo Branco, Rio de Janeiro, 2003.
- BARTL, R.; FRISCH, B. E Multiparameter studies on 650 bone marrow biopsy cores. Diagnostic value of combined utilization of imprints, cryostat, and plastic sections in medical practice. **Bibl Haematol** v. 50, p. 1-16, 1984.
- CAR, B.D.; BLUE, J.T. In **Schalm's Veterinary Hematology** 4 th ed. Philadelphia: Lea e Febiger, 1986.
- CHEN, JCJ e GOLDHAMER, D.J. Skeletal muscle stem cells. **Reproductive Biology and Endocrinology**. [http:// www.rbej.com/content/1/1/101](http://www.rbej.com/content/1/1/101). 2003
- FORTIER, A.L.; NIXON, A.J.; WILLIAMS, J.; CABLE, C.S. Isolation and chondrocytic differentiation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **AVRJ**. v. 59, n.9, p. 1182-1187, 1998.

HERTHEL, D.J. Suspensory desmitis therapies equine Proceedings of **ACVS Veterinary Symposium**, San Diego, California. Outubro, 2002.

HORI, Y.; RULIFSON, I.C.; TSAI, B.C.; CAHOY, J.D.; KIM, S.K. Growth inhibitors promote differentiation of insulin-producing tissue from embryonic stem cells. [www.pnas.org](http://www.pnas.org) v. 99, n. 25, p. 16105-16110, 2002.

HUMPHRIES, R.K; EAVES, A.C.; EAVES, C.J. Self-renewal of hematopoietic stem cells during mixed colony formation *in vitro*. **Proceedings of National Academy of Science USA** v. 78, n. 6, p. 3629-2633, 1981.

JEFFCOTT L.B. Primary liver cell carcinoma in a young Thoroughbred horse. **J Parthol** v. 97, p. 394-397, 1969.

KATHELEEN P.F. Bone marrow evaluation..In: **SHALM'S. Veterinary Hematology**. Cap. 5, p. 29-32, 2000.

LEVENBERG, S.; HUANG, N.F.; ROGERS, A.B.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; LANGER, R. Differentiation of human embryonic stem cells on three-dimensional polymer scaffolds [www.pnad.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1725463100](http://www.pnad.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1725463100) v. 10, n. 22, outubro, 2003.

LI, A.; POULIOT, N.; REDVERS, R.; KAUR, P. Extensive tissue-regenerative capacity of neonatal human keratinocyte stem cells and their progeny. **The Journal of Clinical Investigation** v. 113, n. 3, p. 390-400, 2004.

MONTENEGRO, M.R.; FRANCO, M. **Patologia – Processos Gerais** 3<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Atheneu 1995. p. 263

MORRIS D.D.; WHITLOCK R.H. Relapsing idiopathic thrombocytopenia in a horse. **Equine Vet J.** v. 15, p.73-75, 1983.

MUSCHLER, G.F.; MIDURA, R.J.; NAKAMOTO, C. Practical modeling concepts for connective tissue stem cell and progenitor compartment kinetics **Journal of Biomedicine and Biotechnology** v. 3, 2003. p. 170-193

NEURINGER, I.P.; RANDELL, S.H. Stem cells and repair of lung injuries. **Respiratory Research** v. 5, n. 6, 2004. ([http\\respiratory-research.com/content/5/1/6](http://respiratory-research.com/content/5/1/6))

PASSEGUÉ, E.; JAMIESON, C.H.M.; AILLES, L.E.; WEISSMAN, I.L. Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? **Proceedings of National Academy of Science USA** v. 100, n. 1, p. 11842-11849, 2003.

PERIN, E.C.; DOHMAN, F.R.; BOROJEVIC, R.; SILVA, S.A.; SOUSA, M.D.; MESQUITA, C.T.; ROSSI, M.I.D.; CARVALHO, A.C.; DUTRA, H.S.; DOHMAN, H.J.F.; SILVA, G.V.; BELÉM, L.; VIVACQUA, R.; RANGEL, F.O.D.; ESPORCATE, R.; GENG, Y.J.; VAUGHN, W.K.; ASSAD, J.A.R.; MESQUITA, E.T.; WILLERSON, J.T. Transendocardial, autologous bone Marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure **Circulation** v. 107 p. 2294-2302, 2003.

RICHARDSON, L. Department of Veterinary Clinical Sciences, The Royal Veterinary College. **Dissertação não publicada**. 2005

ROSE, R.J.; HODGSON D.R. **Manual of Equine Practice**. 2a ed. Philadelphia: W.B. Saunders. P. 330, 1993.

RUSSEL, K.E.; SELLON, D.C.; GRINDEM, C.B. Bone Marrow in horses: indications, sample handling and complications. **The Compendium** v. 16, n. 10, p. 1359 –1366, 1994.

SISSON, S. e Grossman, J.D.: **Anatomía de los animales domésticos**. 12º ed. Barcelona: Salvat Editores, 1975.

SMITH. R. K. W. , KORDA M. , BLUNN G. W. and A. E.GOODSHIP, Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. **Equine Veterinary Journal**, London, p. 9-102, 1.2003.

SOARES, M.B.P; SANTOS, R.R Ética das manipulações genéticas: proposta para um código de conduta. **Parcerias Estratégicas** n. 16, outubro, 2002 p. 153-161.

SPEIRS, V.C. **Exame Clínico de Equinos**. 1ª ed. Porto Alegre: Artmed p. 319 – 321, 1999.

TABLIN F.; WEISS L. Equine bone marrow. A quantitative analysis of erytroid maturation. **Anat Rec.** v. 213, p. 202-206, 1985.

TENG, Y.D.; LAVIK, E.B.; QU, X.; PARK, K.I.; OUREDNIK, J.; ZURAKOWSKI, D.; LANGER, R.; SNYDER, Y. Functional recovery following traumatic spinal cord injury mediated by a unique polymer scaffold seeded with neural stem cells **Proceedings of National Academy of Science USA** v. 99, n. 5, P. 3024-3029, 2002.

THOMAS, HS Mending with marrow. **The Horse**. Dez., p. 53-56, 2004.

YOUNG R.G.; BUTLER D.L.; W. WEBER, CAPLAN A.I.; GORDON S.L. and FINK D.J. Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for achilles tendon repair, **Journal of Orthopaedic Research**, v.16, n.4, p.406-413, 1998.

ZALZMAN, M.; GUPTA, S.; GIRI, R.K.; BERKOVICH, I.; SAPPAL, B.S.; KARNIELI, O.; ZERN, M.A.; FLEISCHER, N.; EFRAT, S. Reversal of hyperglycemia in mice by using human expandable insuline-producing cells differentiated from fetal liver progenitor cells. **Proceedings of National Academy of Science USA** v. 100, n. 12, p. 7253-7258, 2003.

**ANEXO 8:** Trabalho científico aceito para apresentação oral no Congresso do World Equine Veterinarian Association em 24 de agosto de 2005.

### **BONE MARROW ASPIRATION AND ISOLATION OF MONONUCLEAR CELLS IN ADULT HORSES**

Barreira, A.P.B.<sup>1,2</sup>, Bacelar, D.T.L.<sup>1</sup>, Saito, M.E.<sup>2</sup>, Kohayagawa, A.<sup>2</sup>, Menarim, B.C.<sup>2</sup>, Vieira, M.E.M.<sup>2</sup>, Alves, A.L.G.<sup>\*2</sup>

<sup>1</sup> Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Castelo Branco, Av. Brasil, 9.727, CEP: 21021-020, RJ, RJ, Brasil. <sup>1</sup> [balesdent@castelobranco.br](mailto:balesdent@castelobranco.br)

<sup>2</sup> Depto. de Cirurgia, UNESP, Botucatu, Distrito de Rubião Jr, Botucatu; CEP:18618-000, SP, Brasil

[anaalves@fmvz.unesp.br](mailto:anaalves@fmvz.unesp.br)

#### **ABSTRACT**

In the late 90's, the medical interest has been directed to the stem cells therapy of degenerative diseases and in cases of deficient healing process. These cells are involved in the growth, remodeling and healing process (RICHARDSON, 2004). During human embryonic development until 5 to 7 days, cells of the inner mass of the blastocyst retain the capability to regenerate an entire individual, and are therefore totipotent. The stem cells of an older embryo, fetus or blood cord are called pluripotent, because of the compromise with selected groups of tissues (endoderm, ectoderm or mesoderm) (MUSCHLER *et al.*, 2003). In adults, the stem cells are found at bone marrow and their isolation could be accessed by aspiration technique. The sternum is the site of choice for bone marrow aspiration in horses (FREEMAN, 2000). This study aims to evaluate a simple technique that enables adult horses stem cells collection, allowing further researches of cellular therapy in this species. Usually the animal is submitted to general anesthesia (FREEMAN, 2000; HERTHEL, 2002; THOMAS, 2003) and positioned in dorsal recumbence. This experiment was developed with ten sedated standing horses, as described before (SMITH *et al.*, 2003). After sedation with xylazin 10% and clipping, the sternbrae were identified by ultrasonography. The marked sites were scrubbed and local anesthesia done. A Jamshidi biopsy needle (8 gauge and 15 cm) was introduced in the 5<sup>th</sup> sternbra by a firm pressure and back-and-forth rotations until penetrate to cortical bone. Once firmly seated within the bone, the stylet is removed and a 20 mL syringe, preloaded with 5000 UI of heparin, was attached for aspiration. Strong negative pressure was applied until few drops of material were visible. The first sample was expelled into a Petri dish to verify the presence of spicules, confirming bone marrow origin. After that, a 5 mL heparinized syringe is attached and five aliquots of approximately 3 mL were taken from each animal. The samples were conditioned in ice and immediately transfer to the laboratory. Bone marrow can be separated into its constituent parts by density centrifugation, usually over Ficoll Hypaque as describe by SMITH *et al.*, 2003, PERIN *et al.*, 2003 and SAITO, 2003. The samples were initially filtered through a IV transfusion set<sup>3</sup> to remove cell aggregates and then diluted in PBS. The filtered

<sup>3</sup> Embramed Equipo, São Paulo, SP, Brasil.

was layered gently onto Ficoll Hypaque d=1,077<sup>4</sup> (Sigma Chemical Co.) and centrifugated at 500g for 30 minutes at room temperature, so that a buffy layer, rich in bone marrow mononuclear cells, is formed in between the plasma and Ficoll erythrocyte residue. This layer was removed and washed twice in PBS by centrifugation (at 500g for 10 min.). Smears were immediately prepared and submitted to Romanowsky stain to verify the presence of hematopoietic precursor cells, suggesting the presence of mesenchymal cells. The use of mesenchymal stem cells in musculoskeletal injury have provided some promising results (YOUNG *et al*, 1998; HERTHEL, 2002; SMITH *et al*, 2003). Cytochemical or immunologic markers can be applied for accurate identification of cell types. The identification of human bone marrow mesenchymal cells were found to be positive for the surface antigens STRO-1, SH2, SH3, CD29, CD44, CD71, CD90, CD120a and CD 120 among others, but negative for CD14, CD34 e CD45, some of the markers for the haematopoietic cell lineage (RICHARDSON, 2004). However, as yet, no antigen markers have been identified for equine mesenchymal cells, suggesting the need of further studies in this species. No accidental pleural or cardiac perforation was reported in the bone marrow aspiration, demonstrating that the technique is reliable, but collector needs to be trained to maximize results. As the knowledge is obtained, the stem cell harvest experiment and clinical approach can be implemented in this species.

**Key word:** stem cell, mononuclear, mesenchymal, aspiration, bone marrow, equine

#### **ASPIRACIÓN DE LA MÉDULA Y AISLAMIENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES EN CABALLOS DEL ADULTO**

Barreira, A.P.B.<sup>1,2</sup>, Bacelar, D.T.L.<sup>1</sup>, Saito, M.E.<sup>2</sup>, Kohayagawa, A.<sup>2</sup>, Menarim, B.C.<sup>2</sup>, Vieira, M.E.M.<sup>2</sup>, Alves, A.L.G. \*<sup>2</sup>

#### **RESUMO**

Al final de los años 90, los avances en medicina han demostrado un interés cada vez mayor en la utilización de las células tronco en la terapia de enfermedades degenerativas en los casos de cicatrización lenta o de baja calidad. Estas células están implicadas en el crecimiento, el remodelar y proceso curativo (RICHARDSON, 2004). Durante el desarrollo embrionario humano hasta 5 a 7 días, las células de la masa interna del blastocyst conservan la capacidad para regenerar a un individuo entero, y sea por lo tanto totipotente. Las células de vástago de un embrión más viejo, fetus or blood cord are called pluripotent, because of the compromise with selected groups of tissues (endoderm, ectoderm or mesoderm) (MUSCHLER *et al.*, 2003). La médula ósea es una fuente de este tipo de células precursoras en individuos adultos y su aislamiento puede ser realizado a través de punción aspirativa. El esternón es el lugar de elección para esta técnica en los equinos (FREEMAN, 2000). Este estudio apunta evaluar una técnica simple que permita la colección de las células de vástago de los caballos del adulto, el permitir investiga más lejos de terapia celular en esta especie. El animal se

---

<sup>4</sup> Sigma Chemical Co., St. Louis, MO., USA

somete generalmente a la anestesia general (HERTHEL, 2002; THOMAS, 2003; FREEMAN, 2000) y colocado en recumbence dorsal. Este experimento fue desarrollado con diez caballos derechos dados un sedativo, según lo descrito antes (SMITH et al., 2003). Después de la sedación con el xylazin el 10% y el acortar, los sternbrae fueron identificados por ultrasonography. Los sitios marcados fueron fregados y la anestesia local fue hecha. Una aguja de la biopsia de Jamshidi (8 calibre y 15 centímetros) fue introducida en el 5<sup>to</sup> sternbra por una presión firme y detra's-y-adelante rotaciones hasta penetra al hueso cortical. Asentado una vez firmemente dentro del hueso, se quita el stylet y una jeringuilla de 20 mL, cargado con 5000 UI del heparin, was attached for aspiration. La presión negativa fuerte fue aplicada hasta que pocas gotas del material eran visibles. La primera muestra fue expelida en a Petri plato para verificar la presencia de spicules, origen de la médula que confirma. Después de eso, se une una jeringuilla heparinized 5 mL y cinco partes alícuotas de aproximadamente 3 mL fueron tomadas de cada animal. Las muestras fueron condicionadas en hielo e inmediatamente transferencia al laboratorio. La primera muestra fue expelida en a Romanowsky máchese para verificar la presencia de los precursores de las células hematopoietic e sugerir la presencia de células mesenchymal. El uso de las células de vástago mesenchymal en lesión musculoeskeletal ha proporcionado algunos resultados prometedores (YOUNG *et al*, 1998; HERTHEL, 2002; SMITH *et al*, 2003). La primera muestra fue expelida en un citoquímico o los marcadores inmunológicos se pueden solicitar la identificación exacta de los tipos de la célula. La identificación de las células mesenchymal humanas de la médula es encontrada para ser positiva para los antígenos superficiales STRO-1, SH2, SH3, CD29, CD44, CD71, CD90, CD120a y CD 120 entre otros, pero negativa para CD14, CD34 e CD45, algunos de los marcadores para el linaje haematopoietic de la célula (RICHARDSON, 2004). Sin embargo, hasta ahora, no se ha identificado ningunos marcadores del antígeno para las células mesenchymal equinas, sugerir la necesidad de otros estudios en esta especie. Este resultado demostró que la técnica de punción aspirativa en la medula ósea es simple, pero necesita de un técnico entrenado para su realización, con el fin de optimizar los resultados. Con el dominio de la técnica será posible usar la terapia celular en equinos, tanto en experimentos como en las aplicaciones clínico-terapéuticas.

**Palabras claves:** célula tronco, punción aspirativa, medula ósea, equino.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

HERTHEL, D.J. Suspensory desmitis therapies equine. **Proceedings of ACVS Veterinary Symposium**, San Diego, California. Outubro, 2002.

FREEMAN, K.P. Bone marrow evaluation..In: **SHALM'S. Veterinary Hematology**. Cap. 5, p. 29-32, 2000.

MUSCHLER, G.F.; MIDURA, R.J.; NAKAMOTO, C. Practical modeling concepts for connective tissue stem cell and progenitor compartment kinetics **Journal of Biomedicine and Biotechnology** v. 3, 2003. p. 170-193

PERIN, E.C.; DOHMAN, F.R.; BOROJEVIC, R.; SILVA, S.A.; SOUSA, M.D.; MESQUITA, C.T.; ROSSI, M.I.D.; CARVALHO, A.C.; DUTRA, H.S.; DOHMAN, H.J.F.; SILVA, G.V.; BELÉM, L.; VIVACQUA, R.; RANGEL, F.O.D.; ESPORCATE, R.; GENG, Y.J.; VAUGHN, W.K.; ASSAD, J.A.R.; MESQUITA, E.T.; WILLERSON, J.T. Transendocardial, autologous bone Marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure **Circulation** v. 107 p. 2294-2302, 2003.

RICHARDSON, L. Department of Veterinary Clinical Sciences, The Royal Veterinary College. **Dissertação não publicada**. 2005

SAITO, M.E. Isolation and identification of *Ehrlichia canis* in canine peripheral blood monocyte cultures. **Master dissertation** Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

SMITH. R. K. W., KORDA M., BLUNN G. W. and A. E.GOODSHIP. Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. **Equine Veterinary Journal**. London, p. 9-102, 1.2003.

THOMAS, HS Mending with marrow. **The Horse**. Dez., p. 53-56, 2004.

YOUNG R.G.; BUTLER D.L.; W. WEBER, CAPLAN A.I.; GORDON S.L. and FINK D.J. Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for achilles tendon repair, **Journal of Orthopaedic Research**, v.16, n.4, p.406-413, 1998.