

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**IMPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS AUTÓLOGAS, ASSOCIADAS AO
PLASMA RICO EM PLAQUETAS EM TENDINITES
EXPERIMENTAIS DE EQUINOS**

ARMANDO DE MATTOS CARVALHO

Botucatu – SP

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**IMPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS
AUTÓLOGAS, ASSOCIADAS AO PLASMA RICO EM
PLAQUETAS EM TENDINITES EXPERIMENTAIS DE
EQUINOS**

ARMANDO DE MATTOS CARVALHO

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

Orientadora:

Prof^a Dr^a Ana Liz Garcia Alves

Co-orientador:

Prof. Dr. Carlos Alberto Hussni

Botucatu – SP

2012

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

Carvalho, Armando de Mattos.

Implante de células-tronco mesenquimais autólogas, associadas ao plasma rico em plaquetas em tendinites experimentais de equinos / Armando de Mattos Carvalho. – Botucatu [s.n.], 2012

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Ana Liz Garcia Alves

Coorientador: Carlos Alberto Hussni

Capes: 50501003

1. Equino – Doenças. 2. Tendões flexores – Ferimentos e lesões. 3. Claudicação em equino. 4. Células-tronco. 5. Colagenases. 6. Tecidos (Anatomia e fisiologia) – Regeneração.

Palavras-chave: AdCTMs; Cavalos; Lesão tendínea; PRP; Terapia.

Nome do autor: Armando de Mattos Carvalho

Título: IMPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS AUTÓLOGAS, ASSOCIADAS AO PLASMA RICO EM PLAQUETAS EM TENDINITES EXPERIMENTAIS DE EQUINOS

COMISSÃO EXAMINADORA

Profª Drª Ana Liz Garcia Alves

Presidente e Orientadora

Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária

FMVZ – UNESP-Botucatu

Prof. Dr. Alexandre Secorun Borges

Membro

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ – UNESP-Botucatu

Profª Drª Elenice Deffune

Membro

Departamento de Urologia

Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP-Botucatu

Profª Drª Anna Paula Balesdent Barreira

Membro

Instituto Brasileiro de Veterinária

Faculdade de Jaguariúna, IBVET

Prof. Dr. Rafael Resende Faleiros

Membro

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias

Universidade Federal de Minas Gerais

Data da defesa: 23 de novembro de 2012

DEDICATÓRIA

Em primeiro lugar a **Deus** por me proporcionar saúde, paz e inteligência. Tenho plena convicção que é graças a sua vontade que continuo respirando e tendo forças para buscar a tão sonhada felicidade, tanto pessoa quanto profissional.

Aos meus pais, **Luis Carlos Assef Carvalho**, e **Luzia Albertina de Mattos Carvalho** que sempre apoiaram a minha opção profissional, estimularam a dar continuidade aos estudos, me educaram, enfim me ensinaram a ser o ser humano que sou. Sou eternamente grato a vocês...

A todos os meus **familiares** pelos ótimos momentos vivenciados juntos.

A minha namorada **Mel**, por sua compreensão e estímulo durante o curso de doutorado. Sem dúvida alguma a sua presença em minha vida torna todos os obstáculos mais fáceis de serem superados

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer inicialmente a Deus, por tudo de bom que ele deu em minha vida: saúde; família; paz; alegria; amizades; etc.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Ana Liz Garcia Alves, pessoa no qual tenho grande admiração tanto pessoalmente quanto profissionalmente. Muito obrigado pela confiança, amizade, me corrigir em momentos oportunos e pela oportunidade do desenvolvimento do curso de doutorado com sua orientação.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Carlos Alberto Hussni, o qual conheci melhor durante o curso de doutorado e aprendi a admirar, muito obrigado por compartilhar todo seu conhecimento e me estimular nos momentos difíceis.

À Prof^a Dr^a Elenice Deffune, pelo apoio ao desenvolvimento do experimento no laboratório de Engenharia Celular no Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu, sua ajuda e seu exemplo foram de extrema valia não só para a realização do doutorado, mas para eu tornar um cidadão cada vez melhor.

À Dr^a Marjorie Assis Golim do laboratório de Citometria de Fluxo no Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu, por mais uma vez sua grande colaboração.

Ao professor Prof. Dr. Alexandre Secorun Borges o qual tornou possível e mais acessível o conhecimento frente à biologia molecular desenvolvida no doutorado.

À Prof^a Dr^a Renée Laufer Amorim, pela importante cooperação, para a realização da avaliação histopatológica e imunoistoquímica.

Aos pós-graduandos Ana Lucia Miluzzi Yamada, Luis Emiliano Cisneros Álvarez, Peres Ramos Badial, Luciana Leal Jorge, Carlos Eduardo (Cadu), Luiz Henrique Lima de Mattos, Juliana de Moura Alonso, Dietrich Pizzigatti, Leandro Maia, Natália Pereira Freitas por serem sempre atenciosos e prestativos durante a realização do experimento. Não diferente, os alunos de iniciação científica Cynthia P. Vendruscolo, Mariana da Conceição, Diana Leocata Queiroz, Caio Lunes de Barros que sempre auxiliaram nos cuidados com os animais e no desenvolvimento do doutorado.

Aos professores Dr. Celso Antonio Rodrigues, Dr. Marcos Jun Watanabe, Dr. Francisco José Teixeira Neto por sua ajuda durante todo o projeto de doutorado. Aos residentes Daniel, Camila, Marina e Pablo sempre dispostos a auxiliar no desenvolvimento do projeto. Aos funcionários Jairo e Clotilde, sempre atenciosos e dispostos a ajudar.

Aos cavalos, animais pelo qual sinto intenso carinho, respeito, e admiração, muito obrigado por fazerem parte deste estudo e da minha vida.

À FAPESP, pela concessão da Bolsa de Doutorado (2009/10670-8) e pelo Auxílio Pesquisa (2010/03567-3).

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

- Tabela 1 - Média da expressão da superfície das AdCTMs em estudos prévios, obtidos pela expressão das proteínas na análise por citometria de fluxo.....29
- Tabela 2 - Valor médio da expressão dos marcadores utilizados na análise da superfície das AdCTMs pela citometria de fluxo na 1ª passagem (P1), 2ª passagem P2), e 3ª passagem (P3).....29

CAPÍTULO 3

- Tabela 1 - Média da avaliação clínica realizada nos diferentes momentos. Resultados do teste de sensibilidade local a palpação (escore 0-3), aumento de temperatura (escore 0-3), perimetria da região médio do metacarpo (circunferência em cm) e exame de claudicação (escore 0-5).....40
- Tabela 2 - Mediana da avaliação ultrassonográfica realizada nos diferentes momentos. Resultado da área da lesão (AL), área do tendão (AT), porcentagem da área da lesão pela área do tendão (%AL/AT) e ecogenicidade (ECO) (escore 0-4).....40

CAPÍTULO 4

- Tabela 1 - Três categorias de análise e seus respectivos escores para a avaliação dos sinais do Power Doppler.....62
- Tabela 2 - Sistema de escore histológico e imuno-histoquímico utilizado para a graduação da reparação tendínea em equinos.....63
- Tabela Suplementar 2 - Mediana da expressão gênica entre os diferentes grupos relativa à expressão gênica obtida nos tendões saudáveis.....67

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

- Figura 1 - Análise imunofenotípica das CTMs derivadas do tecido adiposo equino. Histograma representando a citometria de fluxo realizada nas CTMs na 1ª passagem utilizando os seguintes marcadores: CD44, CD90, CD105 e MHC Classe II.....30
- Figura 2 - (a) Imagem das AdCTMs (100X), 14 dias após a diferenciação em adipócitos. As gotículas de lipídeos foram detectadas (marcação em Oil red-O). (b) Imagem das AdCTMs (20X), 14 após a diferenciação osteogênica. Depósito de cálcio corado em vermelho nas células diferenciadas (marcação em Alizarin Red). (c) Imagem das AdCTMs (10X), 21 dias após a diferenciação em condrócitos. A deposição extracelular de glicosaminoglicanos é corada em azul (marcação em Alcian Blue).....30

CAPÍTULO 4

- Figura1 - Cronograma do tempo. US, ultrassom.....64
- Figura 2 - Medidas ultrassonográficas. (A) Relação da área da lesão entre o grupo tratado e grupo controle entre os diferentes momentos. (B) Relação do porcentual da área da lesão na seção transversal entre os diferentes grupos entre os diferentes momentos.....64
- Figura 3 - Imagem ultrassonográfica transversal e longitudinal. As imagens foram feitas 12 cm distal ao osso acessório do carpo, seis semanas após a terapia. A) Grupo controle: imagem de lesão tendínea com maior área de lesão se comparado ao tendão do grupo tratado (área do tendão na seção transversal = 81 mm², área da lesão na seção transversal = 17 mm², porcentual da área da lesão na seção transversal = 20%). B) Grupo tratado: tendinite do TFDS demonstrada pela imagem ultrassonográfica hipoeecóica (área do tendão na seção transversal = 92

mm², área da lesão na seção transversal = 6 mm², porcentual da área da lesão na seção transversal = 7%).....65

Figura 4 - Imagem transversal da avaliação ultrassonográfica Power Doppler transversal. As imagens foram feitas 12 cm distal ao osso acessório do carpo, seis semanas após a terapia. A) Grupo tratado: área do vaso = 3 mm², intensidade do sinal = 2, número de vasos = 1. B) Grupo controle: área do vaso = 1 mm², intensidade do sinal = 1, número de vasos = 1.....66

Figura 5 - Imagem histopatológica do tendão flexor digital superficial. As figuras mostram cortes histopatológicos com objetiva de 20x coradas com Hematoxilina & Eosina (H&E). A) Grupo Tratado: tendão tratado com a associação de CTMs derivadas do tecido adiposo e concentrado de plaquetas. B) Grupo Controle: tendão tratado com PBS.....66

Figura Suplementar 1 - Imagem imunoistoquímica do tendão flexor digital superficial. A) Imunoistoquímica para colágeno III, grupo tratado, objetiva 40X. B) Imunoistoquímica para colágeno tipo III, grupo controle, objetiva de 40X. C) Imunoistoquímica para fator VIII, grupo tratado, objetiva de 20X. D) Imunoistoquímica para fator VII, grupo controle, objetiva de 20X.....67

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	vii
CAPÍTULO 1	
1 INTRODUÇÃO.....	02
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	04
2.1 Estrutura e função do tendão.....	04
2.2 Tendinite e tratamentos gerais.....	05
2.3 Células tronco	08
2.4 Células tronco mesenquimais (CTMs).....	09
2.5 Células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (AdCTMs).	11
2.6 Plasma Rico em Plaquetas (PRP).....	12
2.7 Uso da AdCTMs e do PRP na terapia da tendinite equina.....	13
CAPÍTULO 2	
Artigo Científico nas normas, submetido no periódico “Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia”: Caracterização das células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo equino.....	16
CAPÍTULO 3	
Artigo Científico nas normas e a ser submetido ao periódico “Ciência Rural”: Novo modelo de indução de tendinite equina - avaliação clínica e ultrassonográfica.....	32

CAPÍTULO 4

Artigo Científico nas normas e a ser submetido ao periódico “Stem Cell Research & Therapy”: Terapia da tendinite equina utilizando associação das células tronco mesenquimais e concentrado de plaquetas.....	42
---	----

CAPÍTULO 5

3 DISCUSSÃO GERAL.....	69
4 CONCLUSÕES GERAIS.....	76
5 BIBLIOGRAFIA.....	77

CARVALHO, A.M. Implante de células-tronco mesenquimais autólogas, associadas ao plasma rico em plaquetas em tendinites experimentais de equinos. Botucatu, 2012, 89p. Tese (Doutorado), UNESP, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

RESUMO

A lesão do tendão flexor digital superficial (TFDS) é uma importante causa de claudicação em equinos. Embora existam diversos tratamentos descritos, poucos são eficazes na melhora significativa da qualidade da matriz extracelular. Recentemente, diversos experimentos vêm focando no potencial terapêutico das células-tronco mesenquimais (CTMs) e do plasma rico em plaquetas (PRP) em casos de lesões de difícil cicatrização. O objetivo geral deste estudo foi a obtenção, cultivo e caracterização das células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (AdCTMS), a adoção de uma nova técnica de indução de lesão tendínea utilizando colagenase em gel e a avaliação da reparação tendínea após terapia com a associação terapêutica de AdCTMs e PRP através da análise clínica, ultrassonográfica, histopatológica, imunoistoquímica (colágeno tipo III e fator VIII) e da expressão gênica (COL1A1, COL3A1, TNC, TNMD, SCX). Foi possível isolar e cultivar as AdCTMs, concluir sua caracterização através da diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica, além da confirmação da expressão destas células aos marcadores CD44, CD90 e CD105 na citometria de fluxo. A indução da lesão do TFDS foi realizada com sucesso, sendo observado na avaliação clínica e ultrassonográfica o desenvolvimento de tendinite focal similar a lesão de ocorrência natural. O uso das AdCTMs associadas ao PRP demonstrou ser viável e resultou na prevenção da progressão da área da lesão no grupo tratado na avaliação ultrassonográfica, maior fluxo sanguíneo do grupo tratado na avaliação com Power Doppler, e melhora da organização cicatricial, com diminuição do infiltrado inflamatório na avaliação histopatológica. Não foram observadas diferenças entre os grupos quanto à avaliação imunoistoquímica e quanto à expressão dos genes testados. Pode-se concluir baseado nos resultados observados: (1) que as AdCTMs foram adequadamente processadas e caracterizadas com as metodologias empregadas; (2) a indução da lesão tendínea com colagenase em gel resultou na formação de lesão focal similar a tendinite de ocorrência natural, sendo possível seu uso em futuros estudos sobre

avaliação da reparação tendínea e; (3) a associação de AdCTMs e PRP para a terapia da tendinite equina mostrou ser viável, com melhora do escore histopatológico no grupo tratado, e não progressão da área da lesão na avaliação ultrassonográfica. Mais estudos devem ser realizados na tentativa de melhorar a caracterização das AdCTMs, aprimorar as metodologias de indução da lesão tendínea, e tentar esclarecer o modo de ação da terapia adotada quanto a diminuição da inflamação, aumento da vascularização, e prevenção da progressão da área da lesão tendínea.

Palavras-chave: lesão tendínea; terapia; cavalo; AdCTMs; PRP.

CARVALHO, A.M. **Autologous implant of mesenchymal stem cells associated with platelet-rich plasma in experimental equine tendinitis**. Botucatu, 2012. 89p. Thesis (Doctorate) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Superficial digital flexor tendon (SDFT) lesion is an important cause of lameness in horses. Although there are many treatments described, few are effective in maintain the quality of the extracellular matrix. Recently several studies have focused on the therapeutic potential of mesenchymal stem cells (MSCs) and platelet-rich plasma (PRP) in some damage tissues. The aim of this study was to perform the isolation, cultivation and characterization of mesenchymal stem cells derived from adipose tissue (AdMSCs), the adoption of a new tendon lesion induction technique using collagenase in gel, and evaluation of tendon repair after treatment with the AdMSCs and PRP association by clinical, ultrasonographic, histopathological, immunohistochemical (collagen type III and factor VIII) and gene expression (COL1A1, COL3A1, TNC, TNMD, SCX) analysis. It was possible to isolate, cultivate and perform the characterization of AdMSCs by adipogenic, osteogenic, chondrogenic differentiation, and to confirm the expression of CD44, CD90 and CD105 cell markers on flow cytometry. The SDFT injury induction was successful observed in clinical and ultrasonographic evaluation, with development of focal lesion similar to naturally occurring. The use of AdMSCs and PRP association proved to be feasible and resulted in preventing the progression of the lesion area in the treated group on ultrasound evaluation, increased blood flow on the Power Doppler evaluation and decreased inflammatory infiltrate and improved the organization on histopathological evaluation. No differences were observed between the groups regarding the immunohistochemistry evaluation and the expression of the tested genes. It can be concluded based on the results observed: (1) that the AdMSCs were properly processed and characterized with the methods employed; (2) tendon injury induction with collagenase gel resulted in focal lesions similar to naturally occurring tendinitis, being possible its use on evaluation of future studies of tendon repair; (3) the AdMSCs and PRP association

for equine tendinitis therapy proved feasible, with improvement of histopathological scores in the treated group, and no progression of the lesion area in ultrasonographic evaluation. More studies should be conducted in attempt to improve the characterization of AdMSCs, enhance methodologies for tendon injury induction, and attempt to clarify the function of adopted therapy as decreased inflammation, increased vascularity, and prevention of the progression of the area tendon injury.

Key words: tendon lesion; therapy; horse; AdMSCs; PRP.

Capítulo 1

1 Introdução

A tendinite consiste em uma importante causa de claudicação e diminuição de desempenho em equinos devido a sua grande incidência, longo período de reabilitação e alta taxa de reincidência (BARREIRA et al., 2008). Existe uma ampla variação na taxa de recidiva da tendinite reportada em cavalos de corrida National Hunt, variando entre 24% (AVELLA et al., 2009) e 56% (DYSON 2004).

As recidivas estão relacionadas à ausência do processo regenerativo do tecido tendíneo e à produção de uma matriz de fibras colágenas de menor diâmetro e qualidade inferior, com um reduzido número de ligações cruzadas (WOO et al., 1999). Terapias que visam à regeneração de um tecido tendíneo hígido devem proporcionar a redução das taxas de recidivas quando comparadas às técnicas empregadas para a formação do tecido de reparação (GUEST et al., 2008).

As terapias comumente empregadas na tendinite equina têm como objetivo a diminuição do processo inflamatório, a melhora da qualidade do tecido de reparação e a redução do tempo de cicatrização, resultando na restauração morfológica e funcional do tendão, próximos ao original, reduzindo o índice de recidivas e diminuindo os prejuízos com essa enfermidade.

A medicina regenerativa é o processo de criação de tecidos funcionais para a reparação ou substituição de um tecido lesado devido a problemas como idade, enfermidades, lesões ou doenças congênitas. Esta é amparada na utilização de três componentes básicos: células tronco, fatores de crescimento (liberados pelas células progenitoras e pelo concentrado de plaquetas quando implantados) e uma estrutura de base que promove a proteção mecânica denominada arcabouço ou "scaffold" (KOCH et al., 2009).

Com o advento da medicina regenerativa, vários grupos de pesquisadores têm estudado o seu uso terapêutico em doenças ortopédicas na espécie equina, como por exemplo, tendinites, desmites, doenças articulares e fraturas. Existem descritos diversos estudos que utilizam essa nova tecnologia terapêutica na tendinite equina, como o uso de células mononucleares derivadas da medula óssea (BARREIRA et al., 2008; LACITIGNOLA et al., 2008; OLIVEIRA et al.,

2011), células tronco mesenquimais (CTMs) derivadas da medula óssea (SMITH et al., 2003; CROVACE et al., 2007; LACITIGNOLA et al., 2008), fração das células nucleadas derivadas do tecido adiposo (NIXON et al., 2008), CTMs derivadas do tecido adiposo (DE MATTOS CARVALHO et al., 2011) e o plasma rico em plaquetas (PRP) (BOSCH et al., 2009; MAIA et al., 2009).

Diversas formas de terapias para tendinite equina já estão disponíveis no mercado, mesmo sem serem completamente avaliadas quanto a sua real eficácia e segurança, em função da pressão exercida pelo marketing empresarial (NIXON et al., 2012).

Para a obtenção de melhores resultados clínicos na terapia da tendinite equina envolvendo o uso de células tronco e PRP é necessário melhorar a técnica de indução de lesões tendíneas para a adequada interpretação da ação terapêutica, padronização da técnica de processamento do PRP, e maior compreensão quanto a diferenciação e caracterização das CTMs. Embora o emprego da medicina regenerativa através do uso das CTMs, PRP ou a associação de ambas já seja uma realidade, os resultados de estudos clínicos e experimentais ainda estão distantes da regeneração tendínea (DEL BUE et al., 2008; MAIA et al., 2009; DE MATTOS CARVALHO et al., 2011).

Nesse contexto, o objetivo geral deste trabalho foi o isolamento, cultivo e a caracterização das células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (AdCTMs) equino, assim como a avaliação de um novo método de indução de tendinite experimental, utilizando a colagenase em gel, além de testar a eficácia da associação das AdCTMs com o PRP na terapia da tendinite experimentalmente induzida em equinos

2 Revisão de literatura

2.1 Estrutura e função do tendão

Os tendões têm como função transferir a força biomecânica dos músculos para os ossos gerando a movimentação do esqueleto, promovendo o suporte esquelético, e aumentando a eficiência da locomoção através do armazenamento e liberação de energia (SMITH et al., 2005; DAHLGREN, 2007).

O tendão é composto de um tecido conjuntivo denso fibroso caracterizado por uma precisa organização de fibroblastos esparsos, fixados em uma MEC rica em colágeno altamente organizado. A complexa hierarquia estrutural permite a sua deformação plástica em resposta à cargas de alta tensão. As fibras de colágeno são organizadas paralelamente em feixes ao longo das linhas de tensão. Fibroblastos fusiformes são organizados longitudinalmente entre os feixes de fibrilas de colágeno (DAHLGREN, 2007).

Os tenócitos são uma população de células contidas no tendão. São altamente diferenciados e possuem um potencial limitado para replicação são igualmente responsáveis pela síntese e manutenção da MEC através da produção de moléculas da matriz como o colágeno, proteoglicanos e enzimas responsáveis pela degradação tendínea como as metaloproteinases.(THORPE et al., 2010). A MEC é uma rede tridimensional constituída principalmente por colágeno tipo I, tipo III e tipo V, além de proteoglicanos, elastina e fibronectina (VIOLINI et al., 2009). Existem diversos estudos que aferem a concentração destas substâncias na MEC como a: elastina, que tem pelo menos de 1% a 2% do peso seco do tendão e apresenta importante contribuição para a elasticidade desse tecido (GOODSHIP et al., 1994); proteoglicanos, que abrangem menos de 5% do peso seco do tendão, entretanto, têm um importante papel na interação célula-célula e célula-matriz extracelular, assim como o controle da produção das fibrilas de colágeno e seu diâmetro, e a homeostase tendínea (BIRCH et al., 1998). Finalmente, o colágeno compõe mais de 80% do peso seco do tendão (WOO et al., 2006), sendo que 95% desse consiste em colágeno tipo I (RILEY, 2005).

Dentre os diferentes tipos de colágeno, o colágeno tipo III é o segundo mais abundante e pode ser encontrado ao redor das fibras do tipo I e no endotendão. Em animais mais idosos é observado um aumento na sua quantidade, especialmente na área central do tendão, localizado no terço médio da região metacarpiana (GOODSHIP et al., 1994; SMITH et al., 2005; ALVES, 2008). Traços de colágeno do tipo II, V e VI foram detectados em tendões normais (GOODSHIP et al., 1994; SMITH et al., 2005). Os diâmetros das fibras colágenas visualizadas em cortes transversais apresentam-se uniformes durante a fase inicial de desenvolvimento, mas com o avançar da idade é notado um padrão bi ou tri-modal (GOODSHIP et al., 1994). Na tendinite, é observada a tendência ao aumento da quantidade de fibras de menor diâmetro (SMITH et al., 2005). 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, do epitendão e endotendão. Áreas avasculares são encontradas em regiões submetidas às forças compressivas e de tensão, sendo seu aumento observado com a idade (SMITH et al., 2005).

2.2 Tendinite e tratamentos gerais

A lesão tendínea possui uma alta incidência entre as enfermidades musculoesqueléticas que acometem os equinos de diferentes modalidades esportivas, entretanto os animais de corrida são os mais acometidos (THORPE et al., 2010). Alguns tendões são mais predispostos a desenvolver tendinite quando comparado à outros, e a maioria das lesões tendíneas ocorrem nos membros torácicos, acometendo o tendão flexor digital superficial (TFDS) (O'MEARA et al., 2010).

Atualmente, acredita-se que a lesão tendínea seja precedida por mudanças degenerativas da matriz extracelular (MEC) e não simplesmente por um único evento de sobrecarga (BIRCH et al., 1998). A reparação tendínea é lenta e inadequada, o tecido lesado é substituído por um tecido de cicatrização mais frágil que o tecido original, por isso há uma grande taxa de recorrência.

Em geral, os objetivos das terapias são: diminuição da inflamação, melhora da qualidade do tecido cicatricial e redução do tempo de cicatrização, resultando na restauração da morfologia e da função tendínea mais próximos possível ao original, reduzindo o índice de recidivas e diminuindo os prejuízos.

A terapia inicial para uma tendinite aguda é, frequentemente, a mesma independentemente do tipo e gravidade da lesão e visa à redução da inflamação. Embora a resposta inflamatória seja importante no processo de reparação, a diminuição de sua magnitude reduz os efeitos deletérios que a inflamação causa nas fibras colágenas e matriz adjacente. A terapia com anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) é recomendada durante os primeiros dez dias e seu uso é de extrema importância para a redução do dano tecidual. Os AINEs tópicos, como o diclofenaco sódico, podem ser úteis como adjuvantes da terapia sistêmica e reduzem os riscos dos efeitos tóxicos dos AINEs sistêmicos (DAHLGREN, 2008). A fenilbutazona é indicada até a fase subaguda. O flunixin meglumine, ou o meloxicam podem ser utilizados nos primeiros dias após a lesão, já que possuem uma ação mais rápida (GENOVESE, 1998). Apesar do benefício destes fármacos, o uso prolongado deve ser evitado, pois possuem um grande potencial na indução de úlceras gástricas, lesões renais e demais efeitos colaterais já que (HENNINGER, 1992) estes fármacos possuem ação inibidora da prostaglandina sintetase (ciclo-oxigenase).

A utilização da terapia de frio deve ser realizada principalmente na fase inicial, através da aplicação tópica de gelo, ducha ou massagens frias, com o objetivo de reduzir a resposta inflamatória inicial (devido ao efeito vasoconstritor do frio) (REEF, 2001), sendo realizada diversas vezes ao dia, com duração de 20-30 minutos cada aplicação.

A área afetada deve receber uma bandagem temporária, que ao promover uma compressão uniforme, minimiza o edema, além da capacidade de diminuir ou neutralizar as forças biomecânicas da estrutura afetada (REEF, 2001). A bandagem pode ser trocada diariamente ou posteriormente à aplicação da terapia a frio (DALGREN, 2008).

O uso de hialuronato de sódio e glicosaminoglicanos polisulfatados injetados no local da lesão têm sido sugeridos como um modo de promover

melhor reparação tendínea. No entanto, Ross e Dyson (2003) contrariam esta idéia ao mostrar que nenhum destes tratamentos traz maiores benefícios do que a abordagem conservativa.

Manipulações farmacológicas empregadas durante o processo cicatricial vêm sendo testadas com o uso de fatores de crescimento e fumarato de beta-aminopropionitrila (FBAPN). Essa última substância tem como função inibir a lisil-oxidase, uma das enzimas responsáveis por promover as ligações cruzadas de colágeno. Assim, prevenindo a ocorrência dessas ligações no estágio inicial da cicatrização (30-90 dias), iríamos ter como consequência uma melhor organização da deposição do colágeno, quando empregado em conjunto com a fisioterapia. (ALVES et al., 2001). Porém, apenas 45-50% dos animais tratados com FBAPN retornam à atividade atlética de máxima intensidade (REEF et al., 2001), o que questiona a eficácia do uso de FBAPN no tratamento de tendinites em equinos.

A terapia por ondas de choque extracorpóreo, “*shock wave*” tem demonstrado resultados positivos no tratamento da tendinite equina (KERSH et al., 2006). A maior evidência de sua ação clínica é a analgesia induzida nos nervos sensoriais. Entretanto, acredita-se que os efeitos do *shock wave* possam ser deletérios, não sendo apropriados para o uso na tendinite aguda (SMITH, 2008).

Algumas técnicas cirúrgicas são igualmente indicadas para o tratamento de tendinites em situações específicas, como o “*splitting*” tendíneo, o qual promove a drenagem do hematoma intra-tendíneo e a desmotomia do anular, realizada em tendinites do TFDS, quando esta acomete o terço distal da região metacarpiana (OIKAWA et al., 2002; ALVES et al., 2002). Em 1998, Bramlage descreveu a desmotomia do acessório do TFDS, relatando o alongamento do músculo flexor digital superficial e de seu tendão, aumentando o limite elástico, com consequente aumento das taxas de retorno às corridas e diminuição de recidivas. Porém, sua eficácia é controversa, sendo relatado o possível aumento do risco da instalação de desmíte do ligamento suspensor do boleto (REEF, 1998).

Os tratamentos convencionais para tendinite são, em sua maior proporção, clínicos e cirúrgicos, entretanto, os animais tratados dificilmente apresentam uma cicatrização de qualidade que possibilite o retorno às competições com

desempenho similar ao anterior da lesão, além de resultar em alta taxa de recidiva (MARFE et al., 2012). Baseado nos resultados das terapias convencionais, novas metodologias terapêuticas são estudadas em busca de melhores resultados. O uso de células tronco, plasma rico em plaquetas (PRP) e a associação destas são os principais exemplos de abordagens terapêuticas que tem sido estudadas e aplicadas no tratamento da tendinite equina. Existem relatos de estudos clínicos que demonstraram diminuição significativa na taxa de reincidência de tendinites após períodos de pelo menos dois anos de acompanhamento de animais tratados através da terapia celular quando comparados aos tratados através de terapia convencional, com reincidência de 27% e 56% respectivamente (GODWIN et al., 2012).

2.3 Células tronco

Também conhecidas como células mãe ou células estaminais, são células que possuem a capacidade de dividir-se, dando origem a células semelhantes as progenitoras e de diferenciar-se em outros tipos celulares. Teoricamente, estas células podem ser implantadas e então recuperadas do tecido implantado após determinado período, quando elas deverão sofrer diferenciação semelhante a do tecido alvo. Entretanto ainda não foi provado que estas células realmente sofram uma diferenciação in vivo, transformando-se em células idênticas às células do local implantado (KOCH et al., 2008).

As células tronco podem ser classificadas quanto ao seu potencial de diferenciação, como por exemplo, ao número de tecidos no qual a célula pode se diferenciar. Elas são divididas em quatro categorias: totipotente, pluripotente, multipotente e unipotente (CALLIHAN et al., 2011).

Células tronco totipotentes são capazes de originar todos os tecidos fetais, incluindo as membranas embrionárias (exemplo: óvulo fecundado, célula híbrida obtida por transferência de núcleo somático). Células tronco pluripotentes, também conhecidas como células embrionárias, são capazes de originar todos os tecidos de um indivíduo adulto, ou seja, originam tecidos de todos os tipos embrionários (ectoderma, mesoderma, endoderma). Células tronco multipotentes

são capazes de originar somente um ou mais tipos celulares da mesma linhagem germinativa (exemplo: CTMs derivadas da medula óssea podem diferenciar-se em células ósseas, adiposas e cartilagem).

As células tronco unipotente são capazes de originar somente um tipo de célula. Finalmente, existem as células tronco de pluripotência induzida (semelhante à células embrionárias), que são células adultas reprogramadas geneticamente através da inserção de fragmentos de DNA capazes de ativar genes normalmente funcionais nas células embrionárias (YU et al., 2007). Vale ressaltar que a utilização das definições dos termos em debate assim como a classificação das células tronco estão evoluindo conforme a melhor compreensão da ação e funcionamento destas células (CALLIHAN et al., 2011).

O conceito de plasticidade das células tronco ou habilidade de transdiferenciação celular que consiste na capacidade destas células diferenciar-se em outro tipo celular e voltar a ser uma célula indiferenciada ou então, voltar novamente a diferenciar-se em outro tipo celular é controverso, já que quando uma população de células progenitoras começa a diferenciar-se em uma linhagem celular específica, a progênie destas células torna-se unipotente, ou seja, não volta a diferenciar-se e nem a ser uma célula indiferenciada (KOCH et al., 2008).

As células tronco adultas podem ser divididas baseadas em seu potencial de diferenciação em dois grandes grupos (Marion and Mao, 2006), células tronco hematopoiéticas (CTHs) e as CTMs. As CTH são as células precursoras da células da linhagem sanguínea, ou seja, diferenciam-se em linfócitos, eosinófilos, basófilos, neutrófilos e hemácias .

2.4 Células tronco mesenquimais (CTMs)

As CTMs também conhecidas como células estromais multipotentes ou células progenitoras mesenquimais (DOMINICI et al., 2006) foram inicialmente descritas por Friedenstein e colaboradores (1966), a partir de células mononucleares da medula óssea de camundongos, que as denominaram de células formadoras de colônias fibroblásticas.

Durante os últimos anos, na medicina veterinária, houve um aumento no interesse em entender a biologia das CTMs. Esse interesse surge a partir do potencial terapêutico desse tipo celular, especialmente quanto ao reparo de feridas, engenharia tecidual. As fontes de CTMs utilizadas com finalidade terapêutica na espécie equina são a medula óssea (SMITH et al., 2003) e tecido adiposo (NIXON et al., 2008), embora também já tenha sido realizado o isolamento dessas células do sangue periférico (KOERNER et al., 2006), sangue da veia umbilical (KOCH et al., 2007) e da matriz do cordão umbilical (HOYNOWSKI et al., 2007).

Enquanto o mecanismo exato que guia a distribuição das CTMs ao tecido a ser reparado é desconhecido, já é sabido que estas células secretam moléculas bioativas, as quais têm atividades regenerativas, como a secreção de fatores bioativos. Esses fatores bioativos têm a capacidade de inibir a formação de tecido cicatricial, suprimir a apoptose, estimular a angiogênese e melhorar a mitose das células progenitoras do tecido intrínseco. Esta ação “pró-regenerativa” das CTMs devido à ação de moléculas bioativas tem sido referida como “atividade trófica”, (NÖTH et al., 2010). Já existem dados científicos que confirmam que as CTMs liberam diversos fatores de crescimento no local implantado, dentre eles o VEGF (fator de crescimento vascular endotelial), HGF (fator de crescimento do hepatócito) e IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina) (WANG et al., 2006).

Igualmente existe a descrição da ação imunomodulatória das CTMs, já que essas células parecem ser hipo-imunogênicas, além de exercer uma ação de supressão significativa nas células T e nas células dendríticas, principalmente quanto à supressão da rejeição alogênica, e em alguns casos, na modulação do sistema imunológico (CAPPLAN & DENNIS, 2006). Na espécie equina existem estudos terapêuticos com o implante autólogo (material do próprio animal) e alogênico (material de outro animal) das CTMs derivadas da medula óssea no tendão, e demonstram que não houve reação inflamatória do animal implantado quanto às células progenitoras de outros animais (GUEST et al., 2008).

Atualmente existem dificuldades para a completa caracterização das CTMs da espécie equina, embora existam trabalhos demonstrando o isolamento das

CTMs e cultivo destas células seguido da comprovação de seu potencial de diferenciação (VIDAL et al., 2006, MAMBELLI et al., 2009), a maioria dos marcadores de superfície utilizados na citometria de fluxo para a caracterização imunofenotípica das CTMs ainda não foi desenvolvido especificamente para a espécie equina e, há a evidência de que alguns marcadores disponíveis para outras espécies não apresentam reação cruzada com as CTMs do equino (TAYLOR et al., 2007). Um exemplo desta ausência de reação interespecies foi demonstrado em estudo realizado em 2009 por Mambelli e colaboradores, onde não houve expressão entre o marcador humano CD29 e as CTMs derivadas do tecido adiposo da espécie equina. Entretanto, de Mattos Carvalho e colaboradores (2009) realizaram a caracterização imunofenotípica das CTMs derivadas do tecido adiposo utilizando o anticorpo monoclonal mouse-anti rat CD90 e o marcador específico da espécie equina mouse-anti horse CD44, comprovando, assim, que as células progenitoras derivadas do tecido adiposo isoladas nesse experimento realmente eram CTMs.

2.5 Células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (AdCTMs)

O tecido adiposo é derivado do folheto germinativo mesodermal, similar a medula óssea, e contém um estroma de suporte que pode ser facilmente isolado. Essa fração vascular estromal (FVE) do tecido adiposo ou células mononucleares do tecido adiposo consistem de uma mistura heterogênea de células, incluindo células endoteliais, células do músculo liso, CTMs, fibroblastos, mastócitos e pré-adipócitos (ZUK et al., 2001).

As células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (AdCTMs) são de fácil isolamento, porém requerem procedimento cirúrgico, o qual é realizado na região da base da cauda do animal em estação. Sua principal vantagem é que a FVE apresenta maior concentração de CTMs que as células mononucleares derivadas da medula óssea, no caso do uso sem o cultivo laboratorial, entretanto, apresentam potencial reduzido de diferenciação osteogênica e condrogênica quando comparadas com as células medulares (VIDAL et al., 2007, KISIDAY et al., 2008, COLLEONI et al., 2009).

2.6 Plasma Rico em Plaquetas (PRP)

As plaquetas ou trombócitos são pequenos fragmentos citoplasmáticos, de dois a três micrômetros de diâmetro, derivados dos megacariócitos multinucleados provindos da medula óssea. Quando presentes no sangue periférico, estas têm como principal ação a hemostasia, já que contêm diversas proteínas, citocinas e outros fatores bioativos que também iniciam e regulam o aspecto básico da reparação tecidual (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

O plasma rico em plaquetas (PRP) também conhecido como concentrado de plaquetas (CP) precisa apresentar concentração mínima de 200×10^3 plaquetas/ μL para receber esta denominação (BOSWELL et al., 2012). Este tem ganhado popularidade na medicina veterinária, e tem sido utilizado para a reparação em diversas enfermidades do sistema musculoesquelético, como tendinite, desmites e defeitos condrais. O CP é um exemplo de fonte autógena de fácil aquisição e de baixo custo que tem sido estudada desde 1970, se acredita que o PRP tenha atividade regenerativa devido ao aumento local da concentração de fatores de crescimento, que podem estimular o processo de cicatrização em nível celular, estimulando o recrutamento, proliferação e diferenciação das células envolvidas na regeneração tecidual. Além disso, estimulam a vascularização local aumentando o fluxo sanguíneo e conseqüentemente incrementando os nutrientes necessários para a reparação tecidual (BOSWELL et al., 2012) .

O PRP possui o potencial de estimular a reparação devido à grande liberação de fatores de crescimento e citocinas dos grânulos α contidos nas plaquetas durante a sua ativação (degranulação dos grânulos α). As principais citocinas liberadas pelas plaquetas incluem o fator de crescimento β transformante (TGF- β), fator de crescimento derivado da plaqueta (PDGF), fator de crescimento fibroblástico (FGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), VEGF e IGF-1. Todos estes fatores de crescimento atuam em conjunto em diferentes alvos (células ou tecidos) e resultam no recrutamento, diferenciação e migração celular, além do crescimento de novos vasos sanguíneos, estimulação da síntese de colágeno e granulação tecidual (FOSTER et al., 2009). Também existem os fatores bioativos contidos nos grânulos α das plaquetas, como a serotonina, histamina, dopamina, cálcio e adenosina. Todos estes “falsos” fatores de

crescimento possuem efeitos fundamentais em todo o aspecto biológico da reparação tecidual, como a serotonina e histamina que aumentam a permeabilidade capilar, o que possibilita que as células inflamatórias tenham maior acesso a área lesada, ativando os macrófagos (FOSTER et al., 2009).

Para a correta liberação dos fatores de crescimento dos grânulos α , é necessária a ativação das plaquetas, que pode ser realizada através do uso trombina bovina, trombina autóloga ou então pelo colágeno tipo I (FUFA et al., 2008). Entretanto há evidências da ativação *in situ* das plaquetas devido ao estímulo dos componentes presentes no ambiente em que foram injetadas (BOSWELL et al., 2012), e também há o relato de melhora clínica na reparação tendínea após a terapia da tendinite equina com o PRP não ativado (BOSCH et al., 2010).

Apesar da popularidade clínica do PRP, não há padronização da técnica de preparação ou administração na medicina veterinária ou na humana, por isso existem diversos métodos tanto na avaliação clínica quanto na experimental (TEXTOR et al., 2012).

Inicialmente o PRP era obtido através de máquinas de plasmaferese e a trombina bovina era utilizada para sua ativação, entretanto atualmente, já existem aparelhos específicos para sua obtenção, como o SmartPReP2 System (Harvest Technologies, Plymouth, MA), que tornam simples a obtenção do PRP, porém o método ainda é oneroso (SCHNABEL et al., 2007).

Existe a descrição de alguns protocolos de dupla centrifugação para a obtenção do PRP equino. Um recente estudo demonstrou a concentração de plaquetas obtidas de diferentes protocolos pré-estabelecidos para equinos, demonstrando ser possível obter PRP com concentração média de 360×10^3 plaquetas/ μ L (VENDRUSCULO et al., 2012).

2.7 Uso da AdCTMs e do PRP na terapia da tendinite equina

Existem poucos estudos relatando o uso das AdCTMs na terapia da tendinite equina, e, entre estes, há descrição da aplicação das células

mononucleares derivadas do tecido adiposo para o tratamento da tendinite experimental com evidente melhora histopatológica da organização tendínea (NIXON et al., 2008). De Mattos Carvalho e colaboradores (2011) fizeram o uso das AdCTMs para o tratamento da tendinite experimental equina e observaram a melhora histológica da organização tendínea e aumento da velocidade da reparação tecidual.

Diversos estudos já foram realizados utilizando o PRP para a terapia da tendinite equina com resultados favoráveis (SCHNABEL et al., 2007, ARGUELLES et al., 2008, CARMONA et al., 2009, MAIA et al., 2009, BOSCH et al., 2010, BOSCH et al., 2011), entretanto os protocolos de obtenção do CP são distintos, e conseqüentemente acarretam na diferente concentração de plaquetas e de fatores de crescimento dificultando a correta compreensão quanto a efetividade e o mecanismo de ação da terapia instituída.

Há apenas a descrição de um estudo demonstrando a associação terapêutica das AdCTMs alogênicas com o PRP autólogo (DEL BUE et al., 2008), que evidencia melhora de 14 dos 16 animais tratados, com completa recuperação clínica e retorno a atividade física normal.

Capítulo 2

Artigo Científico submetido ao periódico “Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia” (sob as normas vigentes)

Caracterização das células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo equino

Characterization of mesenchymal stem cells derived from equine adipose tissue

A.M. Carvalho^{1,*}, A.L.M. Yamada¹, M.A. Golim², L.E.C. Álvarez², L.L. Jorge¹, M.L. Conceição¹, E. Deffune³, C.A. Hussni¹, A.L.G. Alves¹

¹Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu.

²Hemocentro, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, Botucatu.

³Departamento de Radiologia e Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu.

*E-mail: armandodvm@gmail.com

Resumo

O uso das células tronco tem demonstrado resultados promissores quando utilizados no tratamento da tendinite e da osteoartrite dos equínos. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi caracterizar as células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (AdCTMs) em cavalos, através da: (1) Avaliação da capacidade das células progenitoras para realizar a diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica; e (2) Análise por citometria de fluxo, utilizando os marcadores *stemness* relacionados: CD44, CD90, CD105 e MHC de Classe II. Cinco cavalos sem raça definida, de dois a quatro anos de idade foram utilizados para a coleta de tecido adiposo da base da cauda. Após o isolamento e cultivo

das AdCTMs, a caracterização imunofenotípica foi realizada através da citometria de fluxo. Houve alta expressão dos marcadores CD44, CD90 e CD105, e não houve expressão do MHC Classe II. A diferenciação foi confirmada pela coloração específica: adipogênica (Oil Red O), osteogênico (Alizarin Red), e condrogênico (Alcian Blue). As AdCTMs são células progenitoras adultas que apresentam um emprego promissor para a engenharia tecidual na medicina veterinária.

Palavras-chave: caracterização imunofenotípica, diferenciação, equino, tecido adiposo, célula tronco mesenquimal.

Abstract

Stem cell therapy has shown promising results in tendinitis and osteoarthritis in equine medicine. The purposes of this work was to characterize the adipose-derived mesenchymal stem cells (AdMSCs) in horses through (1) assessment of the capacity of progenitor cells to perform adipogenic, osteogenic and chondrogenic differentiation; and (2) through flow cytometry analysis using the stemness related markers: CD44, CD90, CD105 and MHC Class II. Five mixed-breed horses, aged 2-4 year-old were used to collect adipose tissue from the base of the tail. After isolation and culture of AdMSCs, immunophenotypic characterization was performed by flow cytometry. There were a high expression of CD44, CD90 and CD105, and no expression of MHC Class II markers. The tri-lineage differentiation was confirmed by specific staining: adipogenic (Oil Red O), osteogenic (Alizarin Red), and chondrogenic (Alcian Blue). The equine AdMSCs are a promising type of adult progenitor cells for tissue engineering in veterinary medicine.

Keywords: immunophenotypic characterization, differentiation, equine, adipose tissue, mesenchymal stem cell.

Introdução

O uso clínico da terapia celular e da engenharia tecidual tem se desenvolvido rapidamente na medicina veterinária. A relativa abundância e a facilidade de acessar o tecido adiposo tem despertado um grande interesse por parte dos pesquisadores na utilização deste tecido como fonte de células tronco mesenquimais (CTMs). São observados resultados positivos envolvendo a utilização das células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (AdCTMs) em desordens como a tendinite (Del Bue *et al.*, 2008; De Mattos Carvalho *et al.*, 2011).

Tradicionalmente o processo de isolamento da fração das células nucleares do tecido adiposo é baseado na digestão pela colagenase, seguida de uma série de centrifugações para o isolamento das células específicas. Esta fração celular é chamada de fração vascular estromal (FVE). A FVE é uma população celular heterogênea que inclui as células endoteliais e epiteliais, fibroblastos, mastócitos, pré-adipócitos e CTMs (Zuk *et al.*, 2001). A quantidade de CTMs presentes na FVE parece estar relacionada com a quantidade de tecido coletado. Entretanto, há uma considerável variação de animal para animal (Vidal and Lopez, 2011). A separação do AdCTMs equino a partir da FVE é baseada no princípio da adesão que estas células tem ao plástico, permitindo assim o isolamento e caracterização de uma população celular homogênea para posterior utilização terapêutica (Pascucci *et al.*, 2011).

Diversos estudos tem reportado a caracterização das AdCTMs de cavalos por diversos métodos, sendo os mais comuns a diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica das células progenitoras (Vidal *et al.*, 2007, 2008; Kisiday *et al.*, 2008; Mambelli *et al.*, 2009; Colleoni *et al.*, 2009; Toupadakis *et al.*, 2010; Ahern *et al.*, 2011; Schwarz *et al.*, 2011, 2011). Apenas cinco dos estudos recentes tem reportado a análise da superfície dos antígenos das AdCTMs pela citometria (de Mattos Carvalho *et al.*, 2009;

Braun *et al.*, 2010; Pascucci *et al.*, 2011; Raabe *et al.*, 2011; Ranera *et al.*, 2011). Os resultados destes estudos estão demonstrados na Tabela 01.

As avaliações dos resultados destes estudos prévios demonstram que o marcador CD90 é o único utilizado em todos os experimentos, desconsiderando o uso de outros marcadores. Também foi demonstrado que o marcador CD90 é expresso em mais de 90% das AdCTMs de equinos. Entretanto, apesar destas vantagens, não há anticorpo CD90 espécie específico para uso em cavalos. Além disso, CD90 também é expresso em fibroblastos (Sorrel and Caplan, 2009), que possui características morfológicas semelhantes as das células tronco quando mantido em cultura. Ao contrário do antígeno CD34, que é utilizado como marcador único na imunosseleção das células tronco hematopoiéticas (Krause *et al.*, 1996), um único anticorpo para a caracterização positiva das CTMs ainda não foi desenvolvido. Por isso, é interessante utilizar a associação de múltiplos marcadores para realizar a análise pela citometria de fluxo e proceder a diferenciação em trilhaagem, caracterizando as AdCTMs. No entanto, a identificação de um ou mais marcadores que identificam positivamente as CTMs tem se mostrado desafiador por duas razões principais: (1) porque há diferenças na expressão dos marcadores de superfície interespecies; e (2) porque há mudança da imunofenotipagem putativa das CTMs com o passar do tempo (Stewart and Stewart, 2011).

De Schauwer e colaboradores (2011) propuseram a padronização de um protocolo para assegurar a correta caracterização das CTMs de equinos. As células isoladas devem ser aderentes ao plástico quando mantidas em condições padrões de cultura. A diferenciação em trilhaagem *in vitro* deve ser confirmada utilizando as condições de cultivo padrão. Somado a isso, as CTMs de equinos devem expressar CD29, CD44 e CD90 e não devem expressar CD14, CD79 e MHC-II.

Baseado neste novo contexto, o objetivo deste trabalho foi caracterizar as AdCTMs em cavalos através da: (1) confirmação da capacidade das células progenitoras em realizar a diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica; e (2) através da análise em citometria de fluxo utilizando os marcadores *stemness* relacionados: CD44, CD90, CD105 e MHC-II.

Materiais e Métodos

O protocolo experimental foi aprovado pelo comitê de ética e comportamento animal da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade Estadual Paulista, Brasil, e foi conduzida conforme o guia internacional de uso e cuidado de animais experimentais. Cinco equinos (um macho e quatro fêmeas) sem raça definida, com idade entre dois a quatro anos, foram utilizados.

Para a coleta do tecido adiposo, os equinos foram sedados com xilazina (0.7 mg/kg, i.v.) e submetidos à anestesia local com cloridrato de lidocaína a 2% associado à epinefrina. Uma incisão de aproximadamente 8 cm de extensão foi realizada paralela e a aproximadamente 15 cm lateral à linha da coluna. Aproximadamente 2 gramas de tecido adiposo foram coletados e armazenados em um tubo tipo Falcon de 50 mL estéril com meio RPMI-1640 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). A pele foi suturada com fio de nylon usando um padrão de sutura simples separado.

Para realizar o isolamento da FVE, o tecido adiposo foi submetido a sucessivas lavagens com PBS seguido da separação mecânica utilizando lamina de bisturi no. 15 e a ação enzimática de solução de colagenase tipo I a 0.02% (Gibco, Grand Island, NY, USA) em meio RPMI-1640, permanecendo em estufa umidificada a 37°C, 5% CO₂ durante 12 horas. A solução resultante foi neutralizada com meio Knockout DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco, Grand Island, NY, USA) contendo 10% Soro Fetal

Bovino (SFB), seguido da centrifugação a 260 g, durante 10 minutos. O sobrenadante foi completamente aspirado, então adicionou-se novamente PBS para homogeneização e nova centrifugação.

A FVE foi depositada em duas placas de cultivo celular de 75 cm² que foram mantidas em incubadora a 37°C e 5.0% CO₂, usando o meio Knockout DMEM com 10% SFB. O meio foi substituído a cada dois dias até que ocorresse a confluência mínima de 70% na placa de cultura. Então, a tripsinização foi realizada. Cinquenta microlitros foram coletados e transferidos para um tubo de hemólise para a contagem celular. As células foram quantificadas em hemocítmetro, para o cálculo da viabilidade celular utilizando o teste de exclusão com Azul de Trypan (Gibco, Grand Island, NY, USA).

O volume remanescente foi transferido em igual volume para duas placas de cultura de 75 cm² que foram incubadas em estufa a 37°C e 5.0% CO₂. A cultura celular foi mantida até a terceira passagem para amostras de dois equinos e até segunda passagem para os outros animais momento em que a caracterização das CTMs foi realizada.

As células progenitoras foram diferenciadas nas linhagens adipogênicas, osteogênicas e condrogênica demonstrando sua multipotencialidade. Foram seguidas as recomendações necessárias para garantir a correta caracterização das CTMs de equinos (De Schauwer *et al.*, 2011). Todas as diferenciações foram realizadas em triplicata para cada animal, sendo que uma amostra adicional por animal foi mantida em meio de cultura basal durante 14 dias (como controle da diferenciação adipogênica e osteogênica) e por 21 dias (como controle da diferenciação condrogênica).

Para a diferenciação adipogênica, as células provenientes da segunda passagem foram incubadas a uma densidade de 20.000 cells/cm² em uma placa de cultura de 24 poços e cultivadas em meio de cultura adipogênico durante 14 dias. O meio de cultura (STEMPRO[®], Gibco, Grand Island, NY, USA) foi trocado a cada três dias. Posteriormente

as células foram fixadas com solução de formaldeído a 10% durante 10 minutos, seguido de lavagens com PBS sendo coradas com *Oil Red O* (Gibco, Grand Island, NY, USA).

Para realizar a caracterização osteogênica das AdCTMs, as células progenitoras da segunda passagem foram incubadas a uma densidade de 20,000 cells/cm² em placa de cultura de 24 poços e mantidas em condições osteogênicas durante 14 dias, o meio (STEMPRO[®], Gibco, Grand Island, NY, USA) foi trocado a cada três dias. As células foram fixadas em solução de formaldeído 10% durante 10 minutos, seguido de lavagens com água estéril sendo corada com *Alizarin Red* (Gibco, Grand Island, NY, USA).

A condrogênese foi induzida em um pellet de micromassa preparado com 1×10^6 células alocadas em um tubo cônico de 15 mL de polipropileno. O pellet foi cultivado a 37°C com 5% CO₂ em 2 mL de meio de cultivo condrogênico (STEMPRO[®], Gibco, Grand Island, NY, USA), o meio foi trocado a cada três dias. Após o período de três semanas de incubação, o pellet foi fixado em solução de formaldeído 10% durante 24 horas a temperatura ambiente, este foi parafinizado e posteriormente cortado em seções de 5 µm, sendo corado com hematoxilina para a histologia geral e com *Alcian blue* para detectar os proteoglicanos sulfatados.

A seleção dos anticorpos foi parcialmente baseado em estudo prévio sobre o conhecimento das pesquisas em CTMs de equinos. As células progenitoras devem expressar os marcadores CD29, CD44, e CD90 e não expressar os marcadores CD14, CD79, e MHC-II (De Schauwer *et al.*, 2011). A citometria de fluxo foi realizada no aparelho FACSCalibur (BD, San Jose, CA, USA), da primeira até a terceira passagem, utilizando o anticorpo monoclonal *mouse anti-rat* CD90-FITC (Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA) e *mouse anti-human* CD105-FITC mAb (AbD Serotec, Kidlington, Oxford, UK) para avaliar a expressão interespecies. O anticorpo monoclonal específico

mouse anti-horse CD44 (AbD Serotec, Kidlington, Oxford, UK) e *mouse anti-horse* MHC Class II (AbD Serotec, Kidlington, Oxford, UK), foram marcados com o anticorpo monoclonal secundário *goat anti-mouse* IgG-FITC (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) (Fig. 1.).

Resultados

Em média, 2 gramas de tecido adiposo foram coletados para o isolamento das AdCTMs. A incisão de pele cicatrizou sem complicações. As colônias das células semelhantes a fibroblastos foram observadas em todos os cultivos após um dia do isolamento e plaqueamento. O cultivo celular foi mantido até a terceira passagem utilizando amostras de dois animais e até segunda passagem dos outros animais. A capacidade das AdCTMs de diferenciação em trilineagem foi confirmada utilizando os meios de diferenciação comercial para humanos (Gibco, Grand Island, NY, USA) (Fig. 2).

A coloração com *Oil red O* marcou as gotículas de lipídeos dentro das células sobre o meio de indução adipogênico. A diferenciação osteogênica foi confirmada com a coloração em *Alizarin Red* das células diferenciadas, onde o depósito de cálcio formado durante a diferenciação osteogênica foi corado em vermelho. As culturas controles não exibiram diferenciação. O potencial condrogênico foi avaliado utilizando o sistema de cultura em forma de pellet. As células submetidas à diferenciação condrogênica mostraram-se coradas em azul após marcação com *Alcian blue* devido a presença dos proteoglicanos sulfatados produzidos na matriz extracelular condral durante a diferenciação em cartilagem.

A análise pela citometria de fluxo revelou a expressão pelo CD90 e CD105 em todas as passagens testadas (1^a a 3^a passagens), determinando a reação cruzada interespecie entre o rato e o equino, e entre humano e equino, respectivamente. O CD44 também reagiu

com as CTMs em todas as passagens. Como esperado, não houve reação do marcador MHC Classe II nas CTMs (Tab. 2).

Discussão

A técnica de recuperação da FVE do tecido adiposo seguido do isolamento e expansão das CTMs em cultura em nosso estudo foi similar à técnica descrita anteriormente (Vidal *et al.*, 2007). Nossos resultados confirmaram a aderência das CTMs em cultura em menos de 48 horas (Schäffler and Büchler, 2007).

O potencial de diferenciação dentro das várias linhagens mesenquimais é um componente integral do fenótipo das CTMs. A capacidade de diferenciação na trilinearagem é possível devido à adequada caracterização *in vitro* e dos ensaios fenotípicos apropriados para a diferenciação osteogênica, condrogênica e adipogênica (Stewart and Stewart, 2011).

A inequívoca imunofenotipagem das CTMs de equinos é impedida pela ausência de um marcador específico e pela limitada disponibilidade de anticorpos monoclonais específicos de equinos. Até o momento existem apenas os seguintes anticorpos específicos para equinos: CD13; CD44; e MHC-II (De Schauwer *et al.*, 2011). Por isso realizamos a caracterização imunofenotípica das células isoladas utilizando os marcadores espécie específico CD44 e MHC Class II assim como os marcadores de outras espécies como CD90 e CD105. Nós não utilizamos o marcador *horse anti-mouse* CD13, devido à falta da expressão desses pelas AdCTMs equinas, descrita em trabalhos prévios (de Mattos Carvalho *et al.*, 2009 and Radcliffe *et al.*, 2010).

Os dados de nosso experimento demonstraram compatibilidade com os resultados de outros estudos (Tab. 1), confirmando os requerimentos propostos por De Schauwer e colaboradores (2011) para a apropriada caracterização das CTMs de equinos. Entretanto, apesar de nossos resultados e dos resultados de outros autores (Braun *et al.*, 2010; Pascucci

et al., 2011; Raabe *et al.*, 2011; Ranera *et al.*, 2011), novas pesquisas sobre o assunto devem ser conduzidas, em busca de novos marcadores, a fim de aprimorar os protocolos para a caracterização das CTMs de equinos. Também é importante determinar se há algum imunofenótipo destas células que resultem na aplicação clínica, com resultados superiores, para que estes possam ser utilizados na seleção de uma população celular desejada (Stewart e Stewart, 2011).

Conclusão

O presente estudo demonstrou a diferenciação em trilhaagem e a caracterização imunofenotípica de superfície das AdCTMs de equinos utilizando os marcadores CD44, CD90, CD105 e MHC Classe II, classificando estas células como um grupo promissor de células progenitoras, que podem ser utilizadas na terapia celular em equinos. Estes achados também irão aperfeiçoar a definição do fenótipo das AdCTMs em futuros estudos relacionados à caracterização destas células.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) processo 2009/10670-8 e 2010/03567-3.

Referências

AHERN, B.J.; SCHAER, T.P.; TERKHORN, S.P. *et al.* Evaluation of equine peripheral blood apheresis product, bone marrow, and adipose tissue as sources of mesenchymal stem cells and their differentiation potential. *Am. J. Vet. Res.* v.72, p.127-133, 2011.

BRAUN, J.; HACK, A.; WEIS-KLEMM, M. *et al.* Evaluation of the osteogenic and chondrogenic differentiation capacities of equine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Am. J. Vet. Res.* v.71, p.1228-1236, 2010.

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

DEL BUE, M.; RICCÒ, S.; RAMONI, R. *et al.* Equine adipose-tissue derived mesenchymal stem cells and platelet concentrates: their association in vitro and in vivo. *Vet. Res. Commun.* v.32, p.51-55, 2008.

DE MATTOS CARVALHO, A.; ALVES, A.L.G.; GOLIM, M.A. *et al.* Isolation and immunophenotypic characterization of mesenchymal stem cells derived from equine species adipose tissue. *Vet. Immunol. Immunopathol.* v.132, p.303-306, 2009.

DE MATTOS CARVALHO, A.; ALVES, A.L.G.; OLIVEIRA, P.G.G. *et al.* Use of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells for Experimental Tendinitis Therapy in Equines. *J. Equine Vet. Sci.* v.31, p.26-34, 2011.

DE SCHAUWER, C.; MEYER, E.; VAN DE WALLE, G.R. *et al.* Markers of stemness in equine mesenchymal stem cells: a plea for uniformity. *Theriogenology* v.75, p.1431-1443, 2011.

KISIDAY, J.D.; KOPESKY, P.W.; EVANS, C.H. *et al.* Evaluation of Adult Equine Bone Marrow and Adipose-Derived Progenitor Cell Chondrogenesis in Hydrogel Cultures. *J. Orthop. Res.* v.26, p.322-331, 2008.

KRAUSE, D.S.; FACKLER, M.J.; CIVIN, C.I. *et al.* CD34: Structure, biology and clinical utility. *Blood* v.87, p.1-13, 1996.

MAMBELLI, L.I.; SANTOS, E.J.C.; FRAZÃO, P.J.R. *et al.* Characterization of equine adipose tissue-derived progenitor cells before and after cryopreservation. *Tissue Eng. Part C: Methods* v.15, p.87-94, 2009.

PASCUCCI, L.; CURINA, G.; MERCATI, F. *et al.* Flow cytometric characterization of culture expanded multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) from horse adipose tissue: Towards the definition of minimal stemness criteria. *Vet. Immunol. Immunopathol.* v.144, p.499–506, 2011.

RAABE, O., SHELL, K., WÜRTZ, A. *et al.* Further insights into the characterization of equine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Vet. Res. Commun.* v.35, p.355-365, 2011.

RADCLIFFE, C.H.; FLAMINIO, M.J.B.F.; FORTIER, L.A. Temporal analysis of equine bone marrow aspirate during establishment of putative mesenchymal progenitor cell populations. *Stem Cells Dev.* v.19, p.269-81,2010.

RANERA, B.; LYAHYAI, J.; ROMERO, A. *et al.* Immunophenotype and gene expression profiles of cell surface markers of mesenchymal stem cells derived from equine bone marrow and adipose tissue. *Vet. Immunol. Immunopathol.* v.144, p.147-154, 2011.

SCHWARZ, C., LEICHT, U., DROSSE, I. *et al.* Characterization of adipose-derived equine and canine mesenchymal stem cells after incubation in agarose-hydrogel. *Vet. Res. Commun.* v.35, p.487-499, 2011.

SCHWARZ, C.; LEICHT, U.; ROTHE, C., *et al.* Effects of different media on proliferation and differentiation capacity of canine, equine and porcine adipose derived stem cells. *Res. Vet. Sci.*, 2011. doi:10.1016/j.rvsc.2011.08.010

SORREL, J.M.; CAPLAN, A.I. Chapter 4 Fibroblasts – A diverse Population at the Center of it All. *International Review of Cell and Molecular Biology* v.276, p.161- 214, 2009.

STEWART, M.C.; STEWART, A.A. *et al.*. Mesenchymal Stem Cells: Characteristics, Sources, and Mechanisms of Action. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* v.27, p.243–261, 2011.

TOUPADAKIS, C.A.; WONG, A.; GENETOS, D.C. *et al.* Comparison of the osteogenic potential of equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, umbilical cord blood, and umbilical cord tissue. *Am. J. Vet. Res.* v.71, p.1237-1245, 2010.

VIDAL, M.A.; KILROY, G.E.; LOPEZ, M.J. *et al.* Characterization of Equine Adipose Tissue-Derived Stromal Cells: Adipogenic and Osteogenic Capacity and Comparison with Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells. *Vet. Surgery* v.36, p.613-622, 2007.

Vidal, M.A.; Lopez, M.J. Adipogenic Differentiation of Adult Equine Mesenchymal Stromal Cells. *Meth. Mol. Biology* v.702, p.61-75, 2011.

Vidal, M.A.; Robinson, S.O.; Lopez, M.J. Comparison of Chondrogenic Potential in Equine Mesenchymal Stromal Cells Derived from Adipose Tissue and Bone Marrow. *Vet. Surgery* v.37, p.713-724, 2008.

Zuk, P.A.; Zhu, M.; Mizuno, H. Multi-lineage cells from human adipose tissue: implication for cell-based therapies. *Tissue Engineering* v.7, p.211, 2001.

Table 1. Média da expressão da superfície das AdCTMs em estudos prévios, obtidos pela expressão das proteínas na análise por citometria de fluxo

Autor	Marcador										
	CD13	CD14	CD29	CD34	CD44	CD45	CD73	CD90	CD105	CD164	STRO-1
de Mattos Carvalho <i>et al.</i> , 2009	6.31%										
Brahun <i>et al.</i> , 2010*		+		-		±	-	+	+	-	
Pascucci <i>et al.</i> , 2011					79%			93.5%			24.75%
Raabe <i>et al.</i> , 2011								99%			
Ranera <i>et al.</i> , 2011			97.22%	3.07%		0.07%		95.12%			

* Dados mostrando somente expressão evidente (+), expressão fraca (±), e ausência de expressão (-).

Table 2. Valor médio da expressão dos marcadores utilizados na análise da superfície das AdCTMs pela citometria de fluxo na 1^a passagem (P1), 2^a passagem (P2), e 3^a passagem (P3)

	P1	P2	P3
CD44	64.3% ± 17.56	62.29% ± 12.48	41.43% ± 7.17
CD90	90.49% ± 5.01	90.49% ± 5.02	89.29% ± 6.10
CD105	45.85% ± 19.99	46.56% ± 35.30	47.59% ± 18.01
MHC Classe II	1.00% ± 3.43	2.40% ± 1.88	2.87% ± 0.43

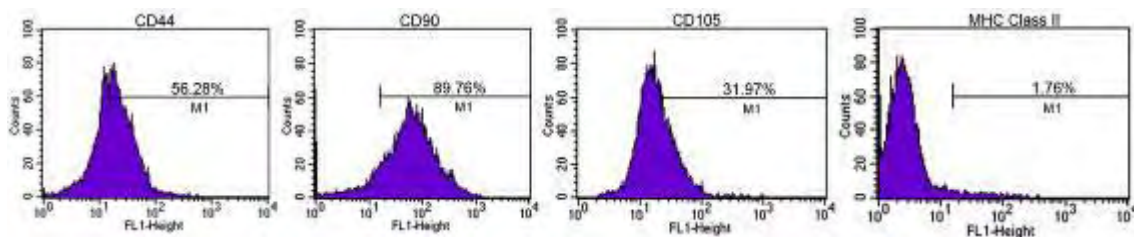


Figura 1. Análise imunofenotípica das CTMs derivadas do tecido adiposo equino. Histograma representando a citometria de fluxo realizada nas CTMs na 1ª passagem utilizando os seguintes marcadores: CD44, CD90, CD105 e MHC Classe II.

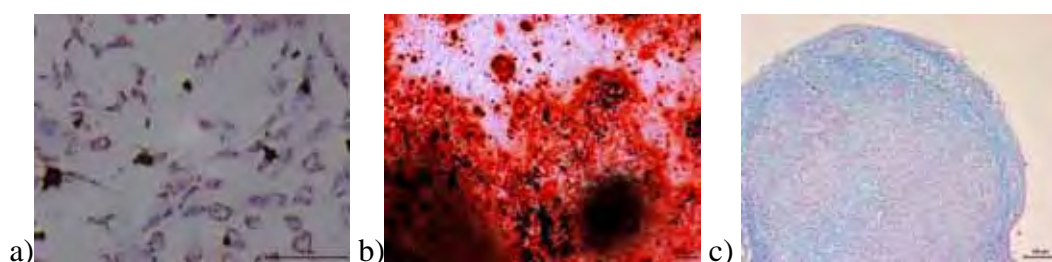


Figura 2. (a) Imagem das AdCTMs (100X), 14 dias após a diferenciação em adipócitos. As gotículas de lipídeos foram detectadas (marcação em *Oil red-O*). (b) Imagem das AdCTMs (20X), 14 após a diferenciação osteogênica. Depósito de cálcio corado em vermelho nas células diferenciadas (marcação em *Alizarin Red*). (c) Imagem das AdCTMs (10X), 21 dias após a diferenciação em condrócitos. A deposição extracelular de glicosaminoglicanos é corada em azul (marcação em *Alcian Blue*).

Capítulo 3

Artigo Científico a ser submetido ao periódico “Ciência Rural” (sob as normas vigentes)

Novo modelo de indução de tendinite equina - avaliação clínica e ultrassonográfica

New model of equine tendinitis induction - clinical and ultrasound evaluation

Ana Liz Garcia Alves^{1,1}, Armando de Mattos Carvalho¹, Ana Lucia Miluzzi Yamada¹, Luis Emiliano Cisneros Álvarez¹, Luciana Leal Jorge¹, Mariana Lopes da Conceição¹, Luiz Henrique Mattos¹, Carlos Alberto Hussni¹

-NOTA-

RESUMO - O objetivo deste estudo foi realizar a avaliação clínica e ultrassonográfica de uma metodologia de indução de tendinite do tendão flexor digital superficial (TFDS) em equinos. Foram utilizados oito equinos adultos, hípidos submetidos a indução de uma lesão realizada com suspensão de colagenase em gel, que foi administrada na região central média do TFDS com o auxílio do aparelho de ultrassom. Os animais foram acompanhados durante 15 dias pós-indução, onde foram realizados exames clínicos e ultrassonográficos. Foi evidenciada claudicação em todos os animais. Na avaliação ultrassonográfica pode ser confirmada a tendinite do TFDS. A técnica adotada para a indução experimental da tendinite em equinos demonstrou ser efetiva e poderá ser utilizada para aperfeiçoar a execução de novos estudos envolvendo o tratamento de tendinites experimentais induzidas.

Palavras-chave: colagenase, gel, lesão, tendão, cavalo.

ABSTRACT - The objective of this study was to evaluate clinically and ultrasonography a tendinitis new induction methodology of superficial digital flexor tendon (SDFT) in horses. Eight adult horses clinically healthy were used. The injury induction was performed with a collagenase suspension in gel, which was administered at the central SDFT medium with the use of ultrasound. The animals were followed for 15 days post-induction, where physical and ultrasound examinations were performed. Lameness was also evidenced in all animals and SFDT lesion could be confirmed by ultrasound analysis. The technique adopted for the experimental induction of tendinitis in horses proved to be effective and may be used to improve the implementation of new studies involving the treatment of experimentally induced tendinitis.

Key words: collagenase, gel, lesion, tendon, horse.

A lesão tendínea ocorre com frequência em cavalos que desenvolvem atividades esportivas diversas, sendo a tendinite do flexor digital superficial (TFDS) dos membros torácicos a enfermidade musculoesquelética mais comum em cavalos de corrida. A dificuldade em obter um método de indução de lesão tendínea similar à tendinite de ocorrência natural deve-se ao fato de que as lesões tendíneas são frequentemente precedidas por mudanças degenerativas na matriz extracelular, e não o resultado de um único evento de sobrecarga. Esta dificuldade metodológica, muitas vezes dificulta a interpretação das evidências experimentais em relação à eficácia do tratamento (WATTS et al., 2012), necessitando o aperfeiçoamento de tecnologias a fim de se otimizar a execução de experimentos que envolvem o tratamento de tendinites induzidas experimentalmente.

Existem diversos modelos experimentais para a indução da lesão tendínea em equinos, incluindo a remoção cirúrgica de um fragmento central do tendão (SCHRAMME et al., 2010), injeção de colagenase (YAMADA et al., 2008) e injeção de gel colagenase (WATTS et al., 2012). A procura de uma técnica que seja mais próxima da lesão tendínea de ocorrência natural motiva o aperfeiçoamento constante dos modelos experimentais já existentes.

Embora o modelo da colagenase apresente vantagens como o desenvolvimento de hiper celularidade, perda da organização da matriz extracelular, aumento da vascularização e ausência de inflamação mediada por células inflamatórias no tendão induzido (DIRKS & WARDEN, 2011), esse modelo também apresenta desvantagens como o fato de as lesões enzimáticas serem muito extensas e irregulares, continuarem expandindo, envolver a superfície do tendão e, ocasionalmente, fracassarem no seu desenvolvimento (BIRCH et al., 1998).

O objetivo deste estudo foi descrever uma metodologia de indução de tendinite equina com a suspensão da colagenase em gel que resultasse em lesões do TFDS mais organizadas e uniformes, compatíveis com a tendinite de ocorrência natural.

Foram utilizados oito equinos (um macho e sete fêmeas) de raça indefinida, idade entre dois e quatro anos, peso médio de 325 Kg, sem evidências de lesões através de exames de claudicação, palpação dos tendões e avaliação ultrassonográfica.

Para a produção do gel foi necessário a obtenção do plasma rico em fibrinogênio (PRF). Para isto, aproximadamente 400 ml de sangue periférico da veia jugular de um dos cavalos utilizados foram coletados assepticamente em bolsa de coleta de amostra (Comploflex®, Fresenius HemoCare Brasil LTDA, Itapeccerica da Serra, SP, Brasil). Esta foi centrifugada a 4°C, a 1200 RPM por 20 minutos, obtendo células vermelhas no

precipitado e no sobrenadante, o plasma. O plasma foi imediatamente congelado a -60°C e mantido durante 24 horas. Posteriormente foi descongelado e mantido a 4°C e centrifugado a 1200 RPM por 20 minutos. Após esta etapa, o sobrenadante obtido foi descartado e a amostra do precipitado remanescente contendo o PRF foi obtida, com concentração de fibrinogênio de 198ng/dl, tal amostra foi congelada a -20°C para uso subsequente.

A indução das lesões foi realizada na região central do TFDS em um membro torácico selecionado aleatoriamente, usando colagenase (Collagenase Type I, Gibco, USA). As injeções foram realizadas com os cavalos sob sedação com 1.0 mg/kg xilazina (Sedazine, Fort Dodge Saúde Animal, Brasil) e anestesia local com lidocaína 2% (Xylestesin, Cristália, Brasil), perineural, circundando os nervos mediano e ulnar (10 ml por local). Também foi realizado um botão anestésico na pele com lidocaína 2% (1.0 ml por local) no local de aplicação da colagenase.

A fim de aperfeiçoar a administração de colagenase, nós angulamos manualmente a agulha do cateter 16G (Catéter Intravenoso, BD Angiocath, Brasil) em 45° e, assim, um defeito colunar das fibras colágenas foi criado ao colocar a agulha modificada longitudinalmente, com auxílio do ultrassom. A agulha foi inserida a partir da superfície palmar do membro através da pele e dos tecidos subcutâneos para o centro do TFDS, iniciando 10 cm distal ao osso acessório do carpo (DOAC) e então avançando distalmente seguindo o eixo longo do centro do TFDS até que a ponta da agulha estivesse em 12 cm DOAC, sendo o gel implantado entre 10-12 cm do DOAC na região média do metacarpiano do TFDS. Para a preparação do gel foi realizado a suspensão da colagenase tipo I (1000 unidades) em 900 μL do PRF previamente obtido, sendo esta solução somente adicionada aos 100 μL de trombina bovina (Thrombin from bovine plasma, Sigma-Aldrich, USA) no momento da indução da lesão.

Logo após o procedimento foram realizadas bandagens nos membros torácicos induzidos e estas foram trocadas diariamente durante os cinco primeiros dias. Também utilizamos fenilbutazona (Equipalazone, Vitalfarma Ltda, Brasil) na dosagem 4.4 mg/kg i.v. no primeiro dia, seguido de administração do medicamento na dose de 2.2 mg/kg por mais cinco dias.

Os cavalos tiveram acompanhamento diário por 15 dias após a indução da lesão. Exames de sensibilidade local à palpação e calor foram classificados e pontuados como: 0: ausência; 1: leve; 2: moderado; 3: severa. Foi realizada a perimetria na porção média do metacarpiano do TFDS. Exames de claudicação foram realizados diariamente e graduados de 0 a 5, segundo STASHAK (2002).

Análises ultrassonográficas foram realizadas antes, durante e após a administração do gel de colagenase nos dias 0, 7, 10 e 14. Os seguintes parâmetros foram mensurados: área da lesão (AL); área do tendão (AT); porcentagem da área lesada no interior do tendão (%AL/AT); ecogenicidade (ECO), graduada de 0 a 4 (GENOVESE et al., 1986). Para a análise estatística foi realizado o teste de Wilcoxon pareado comparando os diferentes escores entre os diversos momentos.

Todos os membros desenvolveram aumento de volume leve e difuso no local, e aumento de temperatura na região palmar média do metacarpo após a indução da lesão tendínea que se resolveram ao longo dos primeiros cinco dias. Nos dias restantes (6-15 dias), havia sensibilidade leve na palpação, porém os membros afetados ainda apresentavam um aumento de volume e calor menos evidentes (Tabela 1).

Ao longo das 24h iniciais após a injeção do gel de colagenase, todos os cavalos desenvolveram claudicação variando entre os escores 1-3 (Tabela 1). Houve diferença estatística significativa no escore de claudicação entre os diferentes momentos. Nenhum

cavalo apresentou sinais de desconforto fisiológico ou claudicação com escore maior que quatro. Estes resultados são compatíveis com os dados relatados após a indução da lesão tendínea utilizando colagenase (YAMADA et al., 2008; WATTS et al., 2012).

A avaliação ultrassonográfica demonstrou a formação de lesões delimitadas e hipoecóicas e mínima reação na região do epitendão. Também houve aumento gradativo estatisticamente significativo da %AL/AT (Tabela 2). A combinação dos dados clínicos e ultrassonográficos demonstram que a metodologia empregada leva ao desenvolvimento de uma lesão focal aguda similar a tendinite de ocorrência natural. Este dado é compatível com o descrito previamente por ALVES (1998), que após a indução da tendinite utilizando colagenase descreveram a formação de lesão compatível às lesões tendíneas provocadas por excesso de exercício.

A análise da avaliação clínica demonstrou evolução progressiva até o décimo dia do experimento, com posterior melhora de todos os sinais clínicos, exceto da perimetria que continuou aumentando. Já a avaliação ultrassonográfica mostrou maior severidade das lesões no décimo quinto dia do experimento, evidenciando a não constante correlação da gravidade da lesão obtida pela avaliação ultrassonográfica com a análise clínica. Este também foi obtido por YAMADA et al. (2009), que demonstrou as vantagens da avaliação tendínea pela ultrassonografia devido a não correlação dos sinais clínicos com a gravidade da lesão.

Acreditamos que as principais vantagens do emprego intratendíneo da colagenase suspensa em gel seja a facilidade de sua administração sem a necessidade da anestesia geral, a criação de lesões tendíneas consistentes e o menor extravasamento da enzima no epitendão, resultando em menor reação inflamatória no peritendão e conseqüentemente menor probabilidade de formação de aderências. As possíveis explicações para a

manutenção do produto no local são o fato da colagenase estar suspensa em gel, e a diminuição da pressão resultante do defeito físico pela inserção da agulha ao longo das fibras tendíneas onde se pretende causar a lesão. A menor pressão no local possibilita que a colagenase permaneça confinada dentro da lesão criada após a retirada da agulha, ao invés de ser forçada a expandir para todas as direções ao longo do endotendão e percorrer o caminho da agulha, evitando assim a formação de reação inflamatória no epitendão (WATTS et al., 2012).

A avaliação clínica e ultrassonográfica realizada no presente experimento confirmaram que a metodologia descrita para a indução de tendinite do TFDS utilizando colagenase suspensa em gel resultou em lesão focal similar a de ocorrência natural com menor comprometimento do epitendão.

Agradecimentos

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo 2010/035673.

Comitê de ética e biossegurança

Aprovado pela Câmara de Ética em Experimentação Animal da FMVZ, UNESP, protocolo número 213/2008.

Referências

ALVES, A.L.G. **Influência da beta-aminopropionitrila associada à atividade física na reparação tendínea de eqüinos após agressão pela colagenase. Análise**

ultrassonográfica e morfológica. 1998. 92f. Tese (Doutorado em Patologia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.

BIRCH, H.L. et al. Macroscopic ‘degeneration’ of equine superficial digital flexor tendon is accompanied by a change in extracellular matrix composition. **Equine Veterinary Journal**, v.30, p.534-539, 1998. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.2042-3306.1998.tb04530.x/pdf>>. Acesso em: 10 set. 2012. doi: 10.1111/j.2042-3306.1998.tb04530.x

DIRKS, R.C.; WARDEN, S.J. Models for the study of tendinopathy. **J Musculoskelet Neuronal Interact**, v.11, p.141-149, 2011. Disponível em: < <http://www.ismni.org/jmni/pdf/44/08DIRKS.pdf>>. Acesso em: 10 de set. 2012.

GENOVESE, R.L. et al. Diagnostic ultrasonography of equine limbs. **Vet Clin North Am Equine Pract**; v.2, p.145-226, 1986. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pub_med/3516322>. Acesso em 10 de set. 2012.

SCHRAMME, M et al. A surgical tendonitis model in horses: Technique, clinical, ultrasonographic and histological characterization. **Vet. Comp. Orthop. Traumatol.**, v.4, p. 231-239, 2010. Disponível em: <<http://www.schattauer.de/de/magazine/uebersicht/zeitschriftenaz/vcot/contents/archive/issue/1097/manuscript/13224.html>>. Acesso em: 10 de set. 2012. doi: <http://dx.doi.org/10.3415/VCOT-09-10-0106>

STASHAK, T.S. **Adam’s lameness in horse.** 4.ed. São Paulo: Roca, 2002. 906p.

WATTS, A.E. et al. A collagenase gel/physical defect model for controlled induction of superficial digital flexor tendonitis. **Equine Veterinary Journal**, v.44, p576-86, 2012. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.2042-3306.2011.00471.x/full>>. Acesso em: 10 de set. 2012. doi: 10.1111/j.2042-3306.2011.00471.x

YAMADA, A.L.M. et al. Comparação de diferentes doses de colagenase em modelo de indução de tendinite para equinos: estudo clínico e ultra-sonográfico. **Ciência Rural**, v.39, n.4, p.1124-1130, 2009. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782009000400025&lng=en&nrm=iso&tlng=pt >. Acesso em: 10 de set. 2012. doi: 10.1590/S0103-84782009005000035

Tabela 1. Média da avaliação clínica realizada nos diferentes momentos. Resultados do teste de sensibilidade local a palpação (escore 0-3), aumento de temperatura (escore 0-3), perimetria da região médio do metacarpo (circunferência em cm) e exame de claudicação (escore 0-5).

	Momento									
	0	1	2	3	4	5	7	10	15	
Sensibilidade (0-3)	0	0,5	1	1	2	2	2	2	1	
Temperatura (0-3)	0	1	1	1	1	2	2	1,5	1	
Perimetria (cm)	17,5	17,8	17,8	17,8	18	18,1	18,4	18,6	18,4	
Claudicação (0-5)	0	1	1,5	2	3	3	3	2,5	2,5	

Tabela 2. Mediana da avaliação ultrassonográfica realizada nos diferentes momentos. Resultado da área da lesão (AL), área do tendão (AT), porcentagem da área da lesão pela área do tendão (%AL/AT) e ecogenicidade (ECO) (escore 0-4).

Momento	AL(mm ²)	AT (mm ²)	% AL/AT	ECO (0-4)
7	5,5	76,5	7*	2
10	8,5	80	10,5*	2
15	9,5	81	12*	3

* Indica que houve diferença estatística significativa em nível de 5% (P<0,05) na coluna entre os diferentes momentos.

Capítulo 4

Artigo Científico a ser submetido ao periódico “Stem Cell Research & Therapy” (sob as normas vigentes)

Terapia da tendinite equina utilizando associação das células tronco mesenquimais e concentrado de plaquetas

Armando de Mattos Carvalho. E-mail: armandodvm@gmail.com. Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista (UNESP).

Peres Ramos Badial. E-mail: peres@fmvz.unesp.br. Departamento de Clínica Veterinária, FMVZ, UNESP.

Luis Emiliano Cisneros Álvarez. E-mail: ventus80@gmail.com. Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ, UNESP.

Ana Lucia Miluzzi Yamada. E-mail: anamyamada@fmvz.unesp.br. Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária, FMVZ, UNESP.

Alexandre Secorun Borges. E-mail: asborges@fmvz.unesp.br. Departamento de Clínica Veterinária, FMVZ, UNESP.

Elenice Deffune. E-mail: ed12@fmb.unesp.br. Hemocentro, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

Carlos Alberto Hussni. E-mail: cahussni@fmvz.unesp.br. Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária, FMVZ, UNESP.

Ana Liz Garcia Alves*. Autor para correspondência: anaalves@fmvz.unesp.br. Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária, FMVZ, UNESP. Rubião Junior, Botucatu 560, São Paulo, Brasil.

Resumo

Introdução: A lesão tendínea é uma importante causa de claudicação e diminuição de desempenho em equinos atletas. Existe a descrição de várias terapias para a tendinite, entretanto nenhuma resulta na completa regeneração tecidual, mesmo após longos períodos de recuperação envolvendo repouso e fisioterapia, a taxa de recidiva é alta.

Métodos: Foi realizada a indução da lesão no tendão flexor digital superficial com gel de colagenase na região média do metacarpo de oito equinos sem raça definida. As lesões foram tratadas após duas semanas com administração intralesional de células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (adCTMs) suspensas em concentrado de plaquetas (CP) no grupo tratado e com PBS no grupo controle. Análises ultrassonográficas seriadas foram realizadas a cada duas semanas. Após 16 semanas da terapia, foi realizada biópsia para análise histopatológica, imunoistoquímica e de expressão gênica (COL1A1, COL3A1, TNC, TNMD, SCX).

Resultados: Houve diferença entre grupos quanto a análise ultrassonográfica e histopatológica, com melhores resultados no grupo tratado com as adCTMs suspensas no CP. Não houve diferença da expressão gênica dos genes testados entre os diferentes tratamentos. Os principais resultados observados no grupo tratado foram a prevenção da evolução da lesão, maior organização das fibras colágenas e diminuição do infiltrado inflamatório na avaliação histopatológica. Não houve progressão da área da lesão e da porcentagem da área da lesão na ultrassonografia e aumento do fluxo sanguíneo mensurado pelo Power Doppler.

Conclusão: O uso das adCTMs associadas ao CP para a terapia da tendinite experimentalmente induzida neste estudo resultou na ação preventiva quanto a progressão da lesão tendínea na análise ultrassonográfica e em maior organização e diminuição da inflamação na avaliação histopatológica. Estes dados demonstram o potencial terapêutico da terapia utilizada na tendinite equina.

Introdução

A lesão tendínea é uma importante causa de claudicação e de diminuição do desempenho dos cavalos atletas, podendo culminar no término precoce da carreira dos animais [1]. As estruturas tendíneas são pouco vascularizadas, relativamente acelulares e têm potencial limitado de regeneração, uma vez que a reparação tendínea é prolongada e resulta na formação de tecido cicatricial biomecanicamente inferior, o tornando mais apto a recorrência da lesão [2].

Normalmente a lesão tendínea requer um considerável período de repouso (seis meses a mais de um ano) para permitir a adequada reparação tecidual. Os tratamentos convencionais para tendinite são basicamente clínicos e cirúrgicos. Entretanto os animais dificilmente apresentam cicatrização com qualidade que possibilite seu retorno as competições com desempenho similar a quando eram saudáveis [3].

A medicina regenerativa vem evoluindo significativamente e já foram descritos anteriormente o uso das células tronco mesenquimais (CTMs) e do implante do concentrado de plaquetas (CP) na terapia da tendinite equina [4-14]. Resultados de estudos clínicos demonstraram diminuição significativa da taxa de reincidência de tendinite após períodos de pelo menos dois anos de acompanhamento de animais tratados com terapia celular quando comparados aos tratados com terapia convencional, com reincidência de 27% e 56% respectivamente [15].

São várias as fontes de CTMs disponíveis, como a medula óssea; tecido adiposo; sangue periférico; sangue e matriz do cordão umbilical; tendão [16]. Dentre as possíveis fontes das CTMs, a medula óssea vem sendo considerada como a mais importante, todavia outras fontes como, por exemplo, o tecido adiposo apresenta características interessantes como maior número de CTMs viáveis com altas taxas de migração e diferenciação celular, tornando-o assim uma conveniente fonte de células progenitoras [17].

O CP é um produto biológico autólogo utilizado na medicina esportiva equina com eficácia clínica aparente. As vantagens desta terapia incluem a coleta minimamente invasiva, processamento rápido, fácil e de baixo custo. A sua eficácia terapêutica é atribuída à liberação de diversos fatores de crescimento diretamente no local injetado [18]. Já há descrição de estudos que demonstram seu potencial na terapia da tendinite equina, como a melhora do escore na avaliação ultrassonográfica de casos clínicos [14], aumento da vascularização local [19] e aumento da atividade metabólica resultando na maturação da reparação tecidual [12].

A suspensão das CTMs ao CP tem sido utilizada com resultados promissores na reparação óssea [20-22]. Há apenas um estudo clínico em equinos, demonstrando que a terapia da tendinite utilizando CTMs suspensas no CP [11], com retorno a atividade atlética de 14 dos 16 animais submetidos à terapia do tendão flexor digital superficial (TFDS).

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito das células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (adCTMs) autólogo associado ao CP autólogo na terapia da tendinite induzida experimentalmente utilizando as análises ultrassonográfica, histopatológica, imunoistoquímica e de expressão gênica.

Material e Métodos

Animais

Foram utilizados oito equinos (sete fêmeas e um macho) sem raça definida, com idade variando entre três a quatro anos e meio. Os animais foram examinados clinicamente e ultrassonograficamente antes do início do experimento para assegurar a não presença de lesão tendínea. Também foi realizado o hemograma completo para a certificação do estado de saúde geral. Todos os animais foram alocados em baias individuais e adaptados com manejo diário durante 21 dias antes do início do experimento. O protocolo foi aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal da universidade (número: 213/2008). Além dos oito equinos utilizados no experimento, foram utilizados mais quatro equinos (dois machos e duas fêmeas, sem raça definida, idade entre três a oito anos) que foram submetidos a eutanásia devido a complicações durante procedimentos cirúrgicos diversos que não comprometessem o TFDS. As amostras foram utilizadas para análise da reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa em tempo real (RT-PCR). Também foi realizada a pesquisa quanto ao histórico de tendinites prévias destes animais, a fim de certificar que os fragmentos que foram coletados vieram de tendões saudáveis.

Delineamento do estudo

O estudo foi constituído de dois grupos escolhidos aleatoriamente, grupo tratado (GT) (tendão tratado com adCTMs, n=4) e grupo controle (GC) (tendão tratado com PBS, n=4). A coleta do tecido adiposo foi realizada três semanas antes da instituição da terapia (semana -3), seguida da indução da lesão tendínea que foi realizada duas semanas antes da instituição do tratamento (semana -2). Foram realizados exames ultrassonográficos a cada duas semanas até o término do experimento. Após 16 semanas da terapia, realizou-se a biópsia do TFDS para a avaliação histopatológica, imunohistoquímica e de expressão gênica (semana 16). Todos os exames realizados no experimento foram executados por avaliadores cegos quanto aos diferentes grupos (Figura 1).

Também foram utilizadas amostras do TFDS de quatro equinos sem histórico de tendinite, grupo saudável (GS) (tendão sem histórico de tendinite, n=4) para a avaliação da expressão gênica entre os GT e GC.

Isolamento e cultivo das células tronco

Para a coleta do tecido adiposo, foi realizada a sedação dos animais com xilazina (0.7mg/kg, i.v.) seguido da tricotomia, antisepsia e injeção subcutânea de 20 mL de cloridrato de lidocaína 2% utilizando um bloqueio anestésico em L invertido. Foi realizada uma incisão de aproximadamente oito cm de comprimento paralelo e aproximadamente 15 cm abaxial à coluna vertebral, possibilitando a visualização de uma camada de gordura entre a pele e a musculatura. Foram coletados cerca de dois gramas de tecido adiposo por animal, o qual foi imediatamente acondicionado em um tubo de 50 mL contendo meio DMEM Knockout.

O tecido adiposo foi lavado com PBS, a fim de remover a contaminação com sangue total, seguido de delicada separação mecânica utilizando bisturi e pinça anatômica. Se adicionaram três mL de solução de colagenase tipo I diluída em meio DMEM Knockout, 2mg/mL e esta foi mantida durante 12 horas em estufa umidificada a 37°C com 5% de CO₂ para a digestão enzimática do tecido adiposo. Após este período, foi adicionado igual volume de DMEM Knockout contendo 10% de SFB para a neutralização da ação enzimática seguida de lavagens com PBS. O pellet celular obtido de cada animal foi diluído em meio DMEM Knockout contendo 10% SFB e transferido para placas de cultivo de 75cm² acondicionadas em estufa. O meio de cultivo foi trocado a cada 48 horas até confluência de 70% da placa de cultivo, onde foi realizada a tripsinização das células seguido do teste de viabilidade celular pela metodologia de exclusão por azul de Trypan e manutenção de seu cultivo até o momento da terapia celular. Antes do implante celular, foi coletada uma alíquota das células (P1) para a realização da caracterização imunofenotípica das células cultivadas. Os marcadores utilizados foram: CD44; CD90; CD105; e MHC Class II de modo semelhante ao previamente descrito [23]. Também foi realizada a diferenciação adipogênica, condrogênica e osteogênica, comprovando o potencial multipotente das células utilizadas (dados não mostrados).

Indução da lesão tendínea

A lesão tendínea foi criada na região média do metacarpo, na porção central do TFDS em um dos membros torácicos do equino que foi escolhido aleatoriamente utilizando colagenase tipo I filtrada estéril (Sigma, St. Louis, MO, EUA). Mil unidades de colagenase foram injetadas em forma de gel em um defeito em forma de coluna de aproximadamente dois cm de comprimento no centro da região de tensão do TFDS, 10 – 12 cm distal ao osso acessório do carpo (DOAC). Para a correta indução da lesão o implante foi guiado por aparelho de ultrassom (My Lab 70 Vet, Esaote, Genova, Itália) utilizando agulha de cateter 16G manualmente curvada de modo estéril em ângulo de 45°, metodologia modificada [24]. Após a indução da lesão foi realizada a bandagem do membro selecionado, que foi mantida por uma semana.

Terapia celular

Duas semanas após a indução da lesão (T= semana 0), as lesões tendíneas foram tratadas conforme seu respectivo grupo com a injeção intra-lesional guiada por ultrassom. No momento do implante, foram utilizadas 10 x 10⁶ adCTMs que foram suspensas em 1 mL de CP autólogo. A obtenção do sangue total e o processamento deste material foram realizados minutos antes do implante celular seguindo protocolo previamente estabelecido [14], entretanto não foi realizada a ativação das plaquetas com cloridrato de cálcio. Foi realizada a contagem do número de plaquetas do sangue total e do CP. Também foram preparadas alíquotas contendo 1 mL de PBS para o implante no grupo controle.

Para a instituição da terapia foi necessária tricotomia local seguida de bloqueio anestésico com dois mililitros de cloridrato de lidocaína 2% no local da inserção da agulha e antisepsia. Os

animais também foram sedados com detomidina (20µg/kg, i.v.) e mantidos durante todo o procedimento em tronco de contenção. Para a administração da terapia utilizada foi utilizado agulha 21 G que foi inserida no centro da lesão do TFDS com o auxílio do ultrassom. Os animais permaneceram confinados em baias individuais durante todo o experimento e os membros selecionados permaneceram com bandagem durante a semana subsequente a terapia.

Avaliação clínica e atividade física

Foram realizadas aferições dos sinais vitais em todos os animais do experimento assim como avaliação de sinais clínicos específicos como presença de sensibilidade local, aumento de temperatura e circunferência da região central do metacarpo. Também foram realizados exames de claudicação diariamente durante todo o experimento, conforme prévia descrição [25].

- Semana 0 – 2: Repouso em baia.
- Semana 3 – 5: caminhada ao passo durante 10 minutos, uma vez ao dia.
- Semana 6 – 8: caminha ao passo durante 10 minutos, duas vezes ao dia.
- Semana 9 – 11: caminhada ao passo durante 20 minutos, uma vez ao dia.
- Semana 12 – 14: caminhada ao passo durante 20 minutos, duas vezes ao dia.
- Semana 13 – 16: caminhada ao passo durante 30 minutos, uma vez ao dia.

Avaliação ultrassonográfica

Foi realizada avaliação ultrassonográfica antes da indução da lesão, bem como antes e após a instituição da terapia (Semana 0) e então a cada 14 dias até o término do experimento (Semana 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 e 16). O exame modo-B em tempo real foi realizado utilizando o aparelho de ultrassom modelo My Lab 70 (Esaote, Genova, Italia) equipado com transdutor linear multi-frequência de 3 a 11 MHz. As regiões tendíneas com lesão que receberam terapia foram também avaliadas por Power Doppler para a avaliação da micro-vascularização tendínea utilizando frequência Doppler de 6,7 MHz, frequência de repetição de pulso (PRF) de 370 HZ e filtro de parede de três.

A determinação da região tendínea a ser tratada para cada animal foi realizada imediatamente antes da instituição da terapia, ou seja, duas semanas após a indução da lesão. Utilizou-se como critério a maior área da lesão na seção transversal ao longo dos aproximadamente dois cm de lesão.

Utilizando ultrassonografia modo-B foram realizadas imagens longitudinais nas quais foi avaliado o paralelismo das fibras; e transversais, onde foi aferida tanto a área do tendão na seção transversal como a área da lesão na seção transversal. Também foi calculado o percentual da área da lesão na seção transversal (área da lesão/área do tendão X 100).

Para a avaliação utilizando o Power Doppler foi realizada uma adaptação do escore utilizado para a avaliação da vascularização óssea [26] (Tabela 1). Esta classificação em escore foi utilizada para a pontuação das três imagens obtidas dos vídeos da avaliação com Power Doppler, que

evidenciaram o maior fluxo sanguíneo possível. Fez-se a média do escore obtido para cada animal em cada momento, e estes dados foram comparados entre os diferentes grupos.

Biópsia tendínea

A biópsia foi realizada exatamente no foco da lesão após 16 semanas da instituição da terapia. Para isso os animais foram submetidos à anestesia geral inalatória, com medicação pré-anestésica com xilazina 10% (1.1mg/kg, IV), indução com diazepam (0.15mg/kg, IV) e cetamina (Dopalen, Vetbrands, Paulínia, São Paulo, Brasil) (2.2mg/kg, IV) para a indução e manutenção em plano cirúrgico com anestesia inalatória com isofluorano (Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, Itapira, São Paulo, Brasil) vaporizado em 100% de oxigênio.

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados com os animais em decúbito lateral direito onde uma incisão de aproximadamente cinco centímetros de comprimento foi realizada no exato ponto da lesão (11-12 cm DOAC) sobre a pele e o tecido subcutâneo, até a identificação da lesão no TFDS. De modo geral a biópsia foi realizada na porção central do TFDS, envolvendo a área total da lesão tendínea. Após a correta identificação da área lesada, uma amostra de aproximadamente 0.5 cm³ do TFDS foi coletada e adequadamente armazenada para posterior avaliação histopatológica, imunoistoquímica (solução de formol tamponado 10%) e RTPCR (congelado em nitrogênio líquido). Foi realizada sutura simples contínua do paratendão utilizando vicryl 2-0 seguido da sutura da pele em pontos simples separado com fio de nylon. Após o procedimento cirúrgico, foi aplicada bandagem compressiva na região do metacarpo, esta foi trocada a cada 24 horas para o curativo da ferida e mantida até a retirada dos pontos após duas semanas da cirurgia. No pós-operatório imediato todos os animais foram medicados com anti-inflamatório não esteroide, fenilbutazona (4.4mg/kg, IV) no primeiro dia, e este mesmo fármaco foi continuado nos quatro dias seguintes (2.2mg/kg, PO q24h).

Avaliação histopatológica

Foram realizados cortes histológicos longitudinais do bloco de parafina que foi processado pelo método convencional de parafinização. Os cortes foram corados em hematoxilina e eosina (H&E) e tricrômico de masson e examinados em microscópio óptico com o avaliador cego quanto ao grupo experimental. Para cada análise foram realizados dois cortes histológicos. Para a análise histopatológica foi realizada a avaliação baseada em escores, todos os parâmetros do tendão foram marcados do escore 1 (normal) ao 4 (alterações severas) quanto ao: formato do tenócitos, densidade dos tenócitos, hemorragia, neovascularização, infiltrado celular inflamatório, linearidade das fibras colágenas, uniformidade das fibras colágenas e espessura do epitendão. Esta avaliação foi baseada em prévios artigos sobre reparação tendínea [4, 25].

Avaliação imunoistoquímica

Cortes de 5µm de espessura foram obtidos dos blocos de parafina, e estendidos em lâminas histológicas *Immunoslides* (EasyPath, São Paulo, SP, Brasil). Para a incubação com os anticorpos primários colágenos tipo III e fator VIII, o material foi desparafinado com banhos sucessivos em xilol, três passagens em álcool absoluto seguido da solução alcoólica em concentração decrescente (95% e 85%), e a recuperação antigênica foi realizada através da digestão enzimática com pepsina 2% (pH 1,8), ficando 10 minutos em estufa a 60°C e outros 50 minutos em estufa a 37°C. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com peróxido de hidrogênio (3%) em metanol, durante 20 minutos, seguido de 10 lavagens com água destilada. Após o bloqueio de peroxidase, seguiu-se o bloqueio de ligações inespecíficas com leite em pó a 3%, por 1 hora em estufa a 27°C, posteriormente as lâminas foram lavadas com solução TRIS. A incubação dos anticorpos primários foi feita por 18 horas (overnight) a 6°C, utilizando-se anticorpos policlonais anti-bovino para colágeno tipo III (purified rabbit anti-bovine type III collagen, Novotec, Saint Martin La Garenne, France) e Fator VIII (...). As diluições foram 1:1000 e 1:2000 respectivamente. O anticorpo secundário utilizado foi o EnVision (Dako, Carpinteria, CA, USA), incubado a temperatura ambiente por 1 hora. O material foi então incubado com DAB (Dako, Carpinteria, CA, USA) como cromógeno, com diluição de uma gota por mililitro. A contra-coloração foi feita com hematoxilina.

Para a determinação da expressão dos marcadores utilizados, foram avaliados cinco campos de cada fragmento com graduação em escore variando entre um e quatro conforme a intensidade e abundância da marcação (Tabela 2).

Isolamento do RNA e RTPCR

O RNA total celular foi purificado de amostras de tecido tendíneo utilizando colunas do QIAshredder (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA) e RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA) e a pureza e qualidade relativa foram determinados pela espectrofotometria (Nanodrop® 1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific™, Wilmington, DE, USA). Todas as amostras de RNA purificadas foram tratadas com RQ1 RNeasy-Free DNase (Promega, Madison, WI, USA) para eliminar o DNA genômico das amostras. A primeira vertente do cDNA foi sintetizado utilizando o SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA).

A quantificação relativa dos tendões do GT e GC comparados aos tendões do GS foi realizada utilizando o método de Ct comparativo ($2^{-\Delta\Delta CT}$ método) para o processamento relativo dos dados do PCR em tempo real [27] com o 7500 Fast Real Time PCR Systems (Applied Biosystems™, Foster City, CA, USA). A definição dos primers de equinos para colágeno tipo I (COL1A1) e colágeno tipo III (COL3A1), tenascin-C (TNC), tenomodulin (TNMD), scleraxis (SCX), 18S e β -actin foram designados conforme descrição prévia [25, 28]. COL1A1, COL3A1, TNC, TNMD e SCX foram utilizados como genes alvo enquanto os genes 18S e β -actin foram utilizados como genes de referência.

Cada reação de RTPCR foi feita em triplicata com um total de 20µL cada, contendo 0.3µM de primer *forward* e *reverse*, 0.15µM de cada probe, contendo 2µL do cDNA modelo, 10µL do qPCR master mix e 6.5 µL de água livre de nuclease. Adicionalmente, um controle “*no template*” foi incluído em cada placa. As condições do PCR foram: desnaturação inicial a 95°C durante 10

minutos e 40 ciclos a 95°C durante 15 segundos e 60°C durante 1 minuto. A análise dos dados foi realizada com a normalização do valor amplificado de cada gene alvo com a média aritmética do CT de seu controle endógeno correspondente. Uma amostra do GS foi selecionada para a calibração e foi utilizada em cada placa. A expressão gênica dos genes alvos do GT e do GC foi calculada relativamente ao GS.

Análise estatística

Para a avaliação ultrassonográfica o modelo de medidas repetidas (PROC MIXED, SAS Institute, 2009) foi usado para comparar a percentagem média de lesão ou área média de lesão entre os grupos experimentais e momentos. O momento inicial (semana 0), também foi utilizado como referência para a comparação com os diferentes momentos dentro de cada grupo. Um termo de interação entre tratamento e momento foi incluído para testar a hipótese de que a diferença entre tratamentos foi dependente do momento avaliado. O método de Tukey foi usado para ajustar os valores-P resultantes de comparações múltiplas. Uma estrutura de covariância auto-regressiva foi usada para modelar as medidas repetidas dentro do mesmo animal. Para a comparação do escore de ecogenicidade mediano entre os tratamentos de cada momento estudado, foi realizado o teste de Wilcoxon (PROC NPAR1WAY, SAS Institute, 2009).

Para a avaliação histopatológica foi utilizado o teste de Wilcoxon (PROC NPAR1WAY, SAS Institute, 2009) comparando a soma média dos escores entre os diferentes grupos. Para a avaliação imunoistoquímica, o teste de Wilcoxon (PROC NPAR1WAY, SAS Institute, 2009) foi utilizado para a comparação do escore mediano entre os diferentes tratamentos. Para a avaliação estatística da expressão gênica dos genes COL1A1, COL3A1, TNC, TNMD, SCX entre o GT e o GC, foi utilizado o teste de Wilcoxon (PROC NPAR1WAY, SAS Institute, 2009), o mesmo teste foi utilizado para a comparação da concentração de RNA obtido entre os diferentes grupos testados.

Resultados

Animais

Um dos animais do grupo controle morreu por causa não relacionada ao estudo durante a execução do experimento, acarretando na diminuição do número de animais em nosso experimento.

Isolamento e cultivo das adCTMs

Cerca de dois gramas de tecido adiposo foram coletados nos animais selecionados e não houve problemas relacionados à cicatrização da ferida localizada na garupa dos animais. O tempo de cultivo celular de três semanas foi o suficiente para a expansão das 10×10^6 adCTMs necessárias para a instituição da terapia celular, na primeira passagem (P1), após cinco dias de cultivo o número de células tronco viáveis variou entre 3×10^6 a 6×10^6 (média de $4 \pm 2 \times 10^6$), com

viabilidade celular $\geq 96\%$ em todas as amostras. Após 21 dias de cultivo celular, o número de células viáveis variou entre 14×10^6 e 22×10^6 (média de $16 \pm 6 \times 10^6$), com viabilidade celular $\geq 98\%$.

Terapia celular e avaliação clínica

O implante das 10×10^6 adCTMs equino suspenso no concentrado de plaquetas assim como a aplicação intralesional do PBS foi realizado com sucesso em todos os animais. A concentração de plaquetas do sangue total utilizado variou de 110×10^3 plaquetas/ μL a 171×10^3 plaquetas/ μL (média de $121 \pm 31 \times 10^3$ plaquetas/ μL). Já o concentrado de plaquetas autólogo utilizado para a suspensão das CTMs derivadas do tecido adiposo foi obtido com sucesso em todas as amostras, com variação entre 305×10^3 plaquetas/ μL a 377×10^3 plaquetas/ μL (média de $321 \pm 56 \times 10^3/\mu\text{L}$).

Não houve alteração dos parâmetros clínicos em nenhum dos os animais utilizados durante a execução do experimento e não houve diferença quanto à sensibilidade, temperatura, circunferência da região central do metacarpo e claudicação entre os diferentes grupos experimentais.

Avaliação ultrassonográfica

Resultados da modelagem estatística indicaram que houve diferença da área da lesão na seção transversal e da porcentagem da área da lesão na seção transversal entre os tratamentos, que foi dependente do momento analisado ($P = 0,02$ e $0,002$ para as interações entre tratamento e momento, respectivamente). Entretanto, quando as comparações entre tratamentos foram realizadas dentro de cada momento, não houve diferenças significantes (Figura 2). Embora não significantes estatisticamente, a interpretação do gráfico demonstra a manutenção, seguido da diminuição da área da lesão da seção transversal e do percentual da área da lesão na seção transversal no GT, enquanto que no GC houve aumento da área da lesão na seção transversal e do percentual da área da lesão na seção transversal nas semanas 2, 4 e 6 (Figura 3) seguida de sua diminuição posterior. Em diferente análise dos dados, comparando o momento da instituição da terapia (semana 0) da área da lesão na seção transversal e do percentual da área da lesão na seção transversal do GT e do GC com sua respectiva evolução entre os diferentes momentos, observamos que o GC apresentou diferença estatística da semana 4 (área da seção transversal da lesão, $P = 0,0002$; área relativa da lesão na seção transversal, $P = 0,0003$) e semana 6 (área da seção transversal da lesão, $P = 0,001$; área relativa da lesão na seção transversal, $P = 0,022$) com o momento da terapia, enquanto o GT não esboçou diferença (Figura 2).

Não foi observada diferença estatística entre os tratamentos quanto à soma dos escores utilizados para a avaliação do Power Doppler ($P = 0,097$), entretanto houve diferença quando foi realizada a comparação individual entre os diferentes momentos analisados, evidenciando maior fluxo sanguíneo no GT em relação ao GC na semana 6 ($P = 0,05$) (Figura 4).

Avaliação histopatológica

Os cortes histopatológicos longitudinais corados com HE e tricrômio de masson foram analisados e classificados de acordo com os escores pré-estabelecidos. Pela metodologia de análise utilizada, o tendão normal teria que obter a soma de escore oito, enquanto que o tendão com danos histopatológicos de severidade máxima teriam escore 32. A média \pm desvio padrão da soma do escore dados ao GT ($14,75 \pm 2,98$) foi significativamente menor ($P = 0,049$) que a soma do escore dado ao GC ($22,66 \pm 2,51$). De modo geral, o GT apresentou melhores resultados do escore para as respectivas variáveis se comparado ao GC, incluindo linearidade das fibras colágenas ($P = 0,04$), uniformidade das fibras colágenas ($P = 0,06$) e densidade das células tendíneas ($P = 0,06$). Dentre as análises das variáveis individuais utilizadas para a avaliação histopatológica, a presença do infiltrado de células inflamatórias foi o que mais divergiu entre os grupos ($P = 0,03$), com o grupo tratado (média = $2 \pm 2,0$) apresentando melhores resultados comparado ao grupo controle (média = $3,66 \pm 0,57$) (Figura 5).

Avaliação imunoistoquímica

A distribuição e intensidade da marcação do Colágeno tipo III e Fator VIII foram pontuadas no corte longitudinal e não foi possível observar diferença significativa do escore dado para a marcação do Colágeno tipo III e Fator VIII entre os diferentes grupos (Arquivo Adicional 1, Figura Suplementar 1).

Isolamento do RNA e RTPCR

Foi possível obter RNA de boa qualidade em todas as amostras tendíneas de todos os grupos (dados não mostrados), com concentração mediana variando entre $54,74 \pm 161,85$ ng/ μ L no GT, $132,4 \pm 90,1$ ng/ μ L no GC e $67,35 \pm 31,05$ ng/ μ L no GS. Quanto à avaliação da expressão gênica, não houve diferença de expressão entre os genes anabólicos (COL1A1, COL3A1, TNC) entre os diferentes grupos, entretanto houve tendência estatística ($P=0,08$) de maior expressão de COL3A1 no grupo controle. Também não houve diferença da expressão dos genes fenotípicos (SCX, TNMD) entre os diferentes grupos (Arquivo Adicional 2, Tabela Suplementar 1).

Discussão

A terapia instituída resultou em melhor organização das fibras colágenas e diminuição do infiltrado inflamatório na avaliação histopatológica, não progressão da lesão (área da lesão) na avaliação ultrassonográfica, assim como também aumento do número e intensidade de sinais detectados pelo exame de Power Doppler, evidenciando a presença de maior fluxo sanguíneo na área tratada do GT. A terapia utilizada não implicou na diferença da expressão gênica dos genes testados entre os grupos.

Diferentes formas de indução de lesão tendínea são possíveis. Estas são basicamente divididas em métodos físicos e enzimáticos, como o uso de colagenase [4, 5, 8, 13], gel de colagenase [24, 25] e indução cirúrgica [29]. Embora existam vários estudos sobre o assunto, ainda não existe o consenso de qual é a melhor técnica de indução [30]. Sabe-se que o uso da colagenase para a indução da tendinite não resulta na formação de lesão tendínea idêntica a resultante da etiopatogenia de uma lesão de ocorrência natural, entretanto, esta metodologia apresenta vantagens como o desenvolvimento de hiper celularidade, perda da organização da matriz extracelular (MEC), aumento da vascularização e ausência de inflamação mediada por células inflamatórias no tendão induzido [31]. Os resultados obtidos quanto à indução da lesão tendínea utilizando gel de colagenase estão de acordo com os relatados previamente [24], pois foi possível a criação de lesões consistentes, e houve menor extravasamento da enzima para o epitendão.

Embora seja considerado um procedimento invasivo, a coleta do tecido adiposo demonstrou ser uma técnica relativamente simples [4, 5, 23] e nenhuma complicação no pós-operatório foi notada nos animais. O isolamento da fração vascular estromal seguido do cultivo das AdMSCs até sua expansão em número suficiente ($\approx 10 \times 10^6$ CTMs) para a implementação da terapia celular foi executado com sucesso durante as três semanas utilizadas neste experimento. Embora não tenha sido realizada a quantificação da duplicação celular das AdCTMs no presente experimento, os dados obtidos vem de encontro com o previamente descrito que relata o rápido crescimento destas células quando mantidas em cultura, possibilitando a maior concentração de células progenitoras em menor tempo [17, 32].

Alguns estudos que utilizam as CTMs derivadas da medula óssea para a terapia da tendinite equina aproveitam a punção da medula e também isolam o sobrenadante medular para suspensão das células tronco no momento da terapia. Há relato de efeito benéfico deste tipo de associação terapêutica, devido à melhora do efeito terapêutico das células progenitoras com os efeitos estimulantes trazidos pelo sobrenadante da medula [33]. Além do sobrenadante da medula óssea [15, 34], também há descrição da suspensão das células progenitoras em PBS [3, 4, 13], meio de cultura celular [25], soro autólogo [5, 10], plasma [6] e plasma rico em plaquetas [11]. No presente estudo optamos em fazer a suspensão das células tronco ao CP com o intuito de associar os efeitos terapêuticos das CTMs derivadas do tecido adiposo aos fatores de crescimento que são liberados pelas plaquetas após sua ativação. A metodologia de dupla centrifugação utilizada para obtenção do CP utilizada no presente estudo demonstrou ser eficaz, possibilitando a aquisição do CP com número médio de plaquetas maior que nos estudos previamente descritos [14, 35].

Embora não tenha sido realizada a ativação do CP neste estudo, há evidências clínicas da melhora na reparação tendínea após a terapia da tendinite equina com o uso do CP não ativados [12]. O resultado positivo do uso do CP não ativado pode ser explicado pela a ativação *in situ* das plaquetas seguida da liberação de fatores de crescimento que ocorrem devido ao estímulo dos componentes presentes no ambiente local (colágeno) [36]. Existem diversas possibilidades para a ativação das plaquetas, um recente estudo em equinos demonstrou que entre diversos tipos de ativadores de plaquetas testados, o CaCl_2 foi o que mais concentrou fatores de crescimento.

Entretanto optamos por não fazer a ativação exógena do concentrado de plaquetas prévia à terapia tendínea devido à incerteza quanto à segurança do seu uso *in vivo* [18].

A terapia adotada neste estudo seguida do repouso com posterior aumento gradual da atividade física mostrou ser viável, não houve nenhum episódio de claudicação ou sensibilidade tendínea após a instituição da fisioterapia. Acredita-se que a atividade física aplicada de modo correto e gradual pode resultar na diminuição no tempo da recuperação tendínea [11].

Os resultados da avaliação clínica estão de acordo com os resultados obtidos em estudos prévios: não houve diferença entre os diferentes grupos quanto à sensibilidade, e circunferência da região média do metacarpo [5]; também não houve diferença quanto ao grau de claudicação [25]. A avaliação ultrassonográfica demonstrou melhora do GT em relação ao GC quanto à área da lesão na seção transversal e do percentual da área da lesão na seção transversal. Este resultado é compatível com prévios estudos utilizando CTMs para a terapia da tendinite equina [8, 10, 37]. A ausência de significância estatística na avaliação da área da lesão na seção transversal e do percentual da área da lesão na seção transversal do efeito dos tratamentos nos momentos específicos pode ser justificada pela correção dos valores P resultante do teste de Tukey e pela redução acidental do tamanho da amostra no GC.

A interpretação da evolução da área da lesão na seção transversal e do percentual da área da lesão na seção transversal do GT e do GC no momento da terapia (semana 0) com os respectivos momentos seguintes, demonstra diferença estatística entre os grupos nas semanas quatro e seis. Este resultado demonstrou que a terapia utilizada neste estudo teve ação preventiva quanto à progressão da lesão, já que o GT não apresentou aumento da área da lesão na seção transversal e do percentual da área da lesão na seção transversal (Figura 2).

Esta não progressão da lesão pode ser explicada principalmente devido à ação anti-inflamatória e imunomoduladora atribuída à terapia instituída [38, 39]. Acreditamos que o momento do emprego da terapia pode ter contribuído para a obtenção destes dados, pois a ação preventiva quanto à progressão da lesão tendínea no GT pode ser mais bem evidenciada na avaliação ultrassonográfica devido à lesão tendínea ainda não ter se desenvolvido por completo. Certamente se a terapia tivesse sido realizada após quatro semanas da indução da lesão, não encontraríamos esta ação preventiva, já que a lesão já teria atingido o seu tamanho máximo. Esta afirmação é baseada em recente estudo que utilizou técnica similar a indução da lesão tendínea com gel de colagenase utilizada, e que demonstrou que é após quatro semanas da indução que ocorre a máxima área da seção transversal da lesão e máxima área relativa da lesão na seção transversal do TFDS [24].

Há apenas um estudo descrevendo a avaliação do fluxo sanguíneo tendíneo utilizando Power Doppler em equinos após terapia com AdCTMs (dado não publicado). Também há descrição do uso da ultrassonografia Color Doppler para avaliação da vascularização da tendinite equina [40] e após terapia da tendinite com CP [19]. Embora o Power Doppler não esboce informações como a velocidade e sentido do fluxo sanguíneo como a ultrassonografia Color Doppler, o primeiro possui maior sensibilidade quanto à presença, e ao volume de sangue, possibilitando a visualização de vasos menores [26]. Os resultados quanto à avaliação da vascularização obtidos no presente estudo, indicam que após seis semanas da instituição da

terapia, houve maior fluxo sanguíneo no grupo tratado em relação ao grupo controle ($P = 0,05$), indicando que se a biópsia tivesse sido realizada neste mesmo momento haveria maior probabilidade de encontrar maior número de vasos no grupo tratado em relação ao grupo controle tanto na avaliação histopatológica quanto na avaliação imunoistoquímica utilizando o Fator VIII. Os tendões flexores digitais saudáveis demonstram uma visualização mínima de vasos na avaliação com Color Doppler. A hipervascularização é uma evolução esperada durante o processo de reparação tecidual, entretanto há diminuição da vascularização com o progresso da reparação tendínea [40].

A avaliação morfológica semi-quantitativa demonstrou a melhora histopatológica do grupo tratado em relação ao grupo controle baseado na soma cumulativa das pontuações histológicas ($P = 0,049$) assim como a diminuição do infiltrado inflamatório e melhora da organização da MEC, dados estes que são compatíveis com os relatados em estudos anteriores [4, 5, 13]. Também foi possível observar a melhor linearidade e uniformidade das fibras colágenas do grupo tratado em relação ao grupo controle.

Fazendo-se a combinação da análise dos dados histopatológicos com a avaliação ultrassonográfica, fica evidente a ação anti-inflamatória da terapia empregada. O resultado terapêutico resultou no não agravamento da área da lesão na seção transversal e do porcentual da área da lesão na seção transversal no GT (semanas 2, 4 e 6), enquanto que no GC houve aumento da lesão no mesmo período, indicando uma possível ação preventiva (anti-inflamatória) quanto à progressão da lesão, seja na minimização ou estabilização da degeneração das fibras tendíneas. A possível explicação para a diminuição da inflamação após o implante das adCTMs se deve ao efeito imunossupressor destas células [39, 41, 42]. São vários os mecanismos que compõem os efeitos anti-inflamatórios das CTMs que beneficiam o reparo tendíneo, entre eles o aumento das quimiocinas, supressão de secreção de citocinas a partir de células dendríticas, redução dos efeitos dos linfócitos T e das células *natural killer*, dados em conjunto que ressaltam seu potente efeito anti-inflamatório ou imunossupressor. Dados estes potentes efeitos imunomoduladores das CTMs, não é de se espantar que estas células estejam sendo utilizadas em estudos clínicos da doença do enxerto contra hospedeiro, de modo geral uma condição fatal após o transplante de órgãos [43].

Não foi possível observar diferença na expressão do colágeno tipo III e fator VIII na avaliação imunoistoquímica entre os diferentes grupos. Em prévios estudos, um deles descrevendo a utilização das células mononucleares derivadas do tecido adiposo e outro descrevendo o uso das adCTMs na terapia da tendinite equina demonstraram a diminuição da expressão do colágeno tipo III no grupo tratado [4, 5]. Há apenas a descrição da quantificação dos vasos sanguíneos presentes no TFDS tratados com CP utilizando o Fator VIII [19], sendo encontrada maior quantidade de vasos no grupo que recebeu terapia com concentrado de plaquetas. O Fator VIII é um pró-cofator da coagulação e pode ser encontrado somente nas células endoteliais intactas e funcionais dos vasos, sendo assim uma importante ferramenta para a avaliação da vascularização tecidual [44].

O aumento da expressão dos genes COL1A1, COL3A1, TNC, TNMD e SCX nos tendões do GT e GC comparado ao GS estão de acordo com o prévio estudo [24]. Sabe-se que logo após a lesão do tendão ocorre o aumento da expressão gênica do COL1A1 e do COL3A1 [45]. O mesmo

ocorre com a TNC, que é uma proteína da MEC que é sintetizada durante a inflamação e o remodelamento tecidual [46], que tem como função a modulação da ligação das células aos componentes da MEC [47]. Quanto a TNMD, esta regula a proliferação dos tenócitos e a maturação das fibras de colágeno [48]. O aumento da expressão da SCX nos tendões lesados é condizente com a tentativa da reparação tecidual, pois esta regula as células progenitoras tendíneas [49], e é um marcador do desenvolvimento tendíneo e ligamentar [50].

Embora tenha sido observado aumento da expressão dos genes testados dos tendões lesados (GT e GC) comparado aos tendões saudáveis (GS), não foi possível observar diferença da expressão entre os diferentes grupos testados (GT e GC), sendo este resultado compatível com prévios estudos [13, 25]. No entanto houve tendência estatística de maior expressão do COL3A1 no grupo controle ($P = 0,08$). Sabe-se que logo após a lesão do tendão ocorre o aumento da expressão gênica dos colágenos tipo I e III, e que a menor concentração do colágeno tipo I em relação ao colágeno tipo III está mais associado à formação do tecido cicatricial do que a regeneração tendínea propriamente dita [25]. Baseado neste princípio, a interpretação do resultado de menor expressão do gene COL3A1 no grupo tratado indicaria uma possível melhor reparação do tendão do GT em relação ao GC. Entretanto este resultado deve ser examinado com cautela, inicialmente devido a não significância estatística na diferença de expressão entre grupos e segundo devido ao não aumento da expressão da proteína do colágeno tipo III na avaliação imunoistoquímica.

Há apenas um estudo que relatou diferença da expressão gênica entre grupos após uso da terapia celular da tendinite equina, neste caso houve aumento da expressão do gene *cartilage oligomeric matrix protein* (COMP) após a terapia da tendinite com as células mononucleares derivadas do tecido adiposo [4]. A possível explicação para não encontrar diferença na expressão gênica entre os tendões do GT que apresentaram melhores características histológicas e ultrassonográficas quando comparado aos tendões do GC, é que apesar dos genes utilizados serem relacionados com a reparação tendínea, estes não são específicos, sendo necessário realizar mais pesquisas para a seleção de genes mais relacionados à reparação da estrutura tendínea [51, 52].

Acreditamos que os principais resultados obtidos neste estudo poderiam ser ainda mais expressivos e talvez pudéssemos obter dados significativos adicionais como, por exemplo, diferença significativa da expressão gênica do COL3A1 entre os grupos caso tivesse sido utilizado maior número de animais, e se também não tivesse ocorrido o incidente com um dos animais experimentais, resultando na diminuição do número de animais do grupo controle. Entretanto vale ressaltar o significativo custo na estadia, compra e cuidados destes animais, além das considerações relacionadas à ética quanto ao seu uso em experimentação animal. Outra limitação deste estudo foi a não determinação do exato mecanismo de ação da terapia instituída seja por ação trófica (modulação das citocinas locais), substituição das células do tecido lesado, imunomodulação local ou outros mecanismos que favoreceram a melhora da reparação tecidual obtida através da análise histopatológica e ultrassonográfica.

É grande a dificuldade encontrada na elaboração de um estudo bem desenhado, em grande escala envolvendo equinos, também é inegável a falta do conhecimento básico quanto ao

comportamento das células tronco adultas e do CP após sua administração. Acredita-se que as células progenitoras possam diferenciar no tecido específico no local no qual foi implantada, como diferenciação em tenócitos, favorecendo assim a produção da MEC apropriada. Estas também podem sintetizar proteínas bioativas (fatores de crescimento e citocinas) que propiciam o recrutamento de células tronco endógenas, além de estímulo anabólico das células recém-recrutadas e das células maduras do próprio tecido [16].

Assim como outros experimentos que utilizaram a terapia celular associada ou não ao CP para a terapia da tendinite equina [4-8, 11, 13, 25], o presente estudo também demonstrou um resultado satisfatório, entretanto ainda limitado quanto aos efeitos da terapia instituída. Estes resultados em conjunto demonstram que ainda não há definição quanto a real eficácia da terapia estabelecida na tendinite equina. Baseado no resultado preventivo da associação terapêutica das AdCTMs ao CP quanto a progressão da lesão na avaliação ultrassonográfica (área da lesão na seção transversal e porcentual da área da lesão na seção transversal), novos estudos devem ser conduzidos tentando validar este resultado através da administração da terapia antes do completo desenvolvimento da lesão tendínea. Esta suposição é compatível com a descrita em recente estudo sobre a tendinopatia da tendinite, que afirma que devido à impossibilidade da regeneração tendínea, a prevenção pode ter um impacto clínico significativamente maior que a terapia [53].

Futuros estudos devem ser realizados a fim de elucidar melhor o momento ideal da instituição da terapia da tendinite equina que atualmente é padronizado entre 7 a 45 dias após início da lesão também deve ser mais estudado, a fim de compreender em qual momento há melhor resultado terapêutico e se realmente é possível evitar o agravamento da lesão quando se faz administração da terapia em uma lesão ainda em desenvolvimento.

Também devem ser realizadas mais pesquisas básicas quanto ao real mecanismo de ação da terapia empregada na reparação tecidual, seja através da comprovação ou não da diferenciação das células tronco empregadas, pela análise da liberação de fatores tróficos (citocinas, fatores de crescimento), ou pela ação anti-inflamatória e imunomoduladora. Certamente o melhor conhecimento da etiopatogenia da tendinite associado ao conhecimento do mecanismo de ação das células tronco adultas e das plaquetas ativadas irão possibilitar a melhora dos resultados clínicos resultando na comprovação da eficácia terapêutica desta nova biotecnologia.

Conclusão

O presente estudo demonstrou ação favorável do uso das AdCTMs associadas ao CP na terapia da tendinite verificada principalmente pela ação preventiva da progressão da lesão, observada na avaliação ultrassonográfica e melhora significativa dos escores da análise histopatológica. Futuros estudos devem ser realizados a fim de elucidar com mais detalhes a ação imunomoduladora das AdCTMs associadas ao CP, bem como o período ideal de sua aplicação.

Agradecimentos

A Fundação de Amparo de Pesquisa de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de doutorado (processo: 2009/10670-8) e pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento deste projeto (processo: 2010/03567-3).

Referências

1. Kasashima Y, Takahashi T, Smith RK, Goodship AE, Kuwano A, Ueno T, Hirano S: **Prevalence of superficial digital flexor tendonitis and suspensory desmitis in Japanese Thoroughbred flat racehorses in 1999.** *Equine Vet J* 2004, **36**(4):346-350.
2. Avella C, Ely E, Verheyen K, Price J, Wood J, Smith R: **Ultrasonographic assessment of the superficial digital flexor tendons of National Hunt racehorses in training over two racing seasons.** *Equine Veterinary Journal* 2009, **41**(5):449-454.
3. Marfe G, Rotta G, De Martino L, Tafani M, Fiorito F, Di Stefano C, Polettini M, Ranalli M, Russo MA, Gambacurta A: **A new clinical approach: Use of blood-derived stem cells (BDSCs) for superficial digital flexor tendon injuries in horses.** *Life Sci* 2012.
4. Nixon AJ, Dahlgren LA, Haupt JL, Yeager AE, Ward DL: **Effect of adipose-derived nucleated cell fractions on tendon repair in horses with collagenase-induced tendinitis.** *Am J Vet Res* 2008, **69**(7):928-937.
5. Carvalho A, Alves A, de Oliveira P, Alvarez L, Amorim R, Hussni C, Deffune E: **Use of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells for Experimental Tendinitis Therapy in Equines.** *Journal of Equine Veterinary Science* 2011, **31**(1):26-34.
6. Smith R, Korda M, Blunn G, Goodship A: **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* 2003, **35**(1):99-102.
7. Crovace A, Lacitignola L, De Siena R, Rossi G, Francioso E: **Cell therapy for tendon repair in horses: an experimental study.** *Vet Res Commun* 2007, **31** Suppl 1:281-283.
8. Crovace A, Lacitignola L, Rossi G, Francioso E: **Histological and immunohistochemical evaluation of autologous cultured bone marrow mesenchymal stem cells and bone marrow mononucleated cells in collagenase-induced tendinitis of equine superficial digital flexor tendon.** *Vet Med Int* 2010, **2010**:250978.
9. Lacitignola L, Crovace A, Rossi G, Francioso E: **Cell therapy for tendinitis, experimental and clinical report.** *Vet Res Commun* 2008, **32** Suppl 1:S33-38.
10. Pacini S, Spinabella S, Trombi L, Fazzi R, Galimberti S, Dini F, Carlucci F, Petrini M: **Suspension of bone marrow-derived undifferentiated mesenchymal stromal cells for repair of superficial digital flexor tendon in race horses.** *Tissue Eng* 2007, **13**(12):2949-2955.
11. Del Bue M, Riccò S, Ramoni R, Conti V, Gnudi G, Grolli S: **Equine adipose-tissue derived mesenchymal stem cells and platelet concentrates: their association in vitro and in vivo.** *Vet Res Commun* 2008, **32** Suppl 1:S51-55.

12. Bosch G, van Schie HT, de Groot MW, Cadby JA, van de Lest CH, Barneveld A, van Weeren PR: **Effects of platelet-rich plasma on the quality of repair of mechanically induced core lesions in equine superficial digital flexor tendons: A placebo-controlled experimental study.** *J Orthop Res* 2010, **28**(2):211-217.
13. Schnabel LV, Lynch ME, van der Meulen MC, Yeager AE, Kornatowski MA, Nixon AJ: **Mesenchymal stem cells and insulin-like growth factor-I gene-enhanced mesenchymal stem cells improve structural aspects of healing in equine flexor digitorum superficialis tendons.** *J Orthop Res* 2009, **27**(10):1392-1398.
14. Argüelles D, Carmona JU, Climent F, Muñoz E, Prades M: **Autologous platelet concentrates as a treatment for musculoskeletal lesions in five horses.** *Vet Rec* 2008, **162**(7):208-211.
15. Godwin EE, Young NJ, Dudhia J, Beamish IC, Smith RK: **Implantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells demonstrates improved outcome in horses with overstrain injury of the superficial digital flexor tendon.** *Equine Vet J* 2012, **44**(1):25-32.
16. Alves ALG, de Mattos Carvalho A, Hussni CA: **Mesenchymal Stem Cell Therapy for Equine Tendinitis.** *Recent Patent on Regenerative Medicine* 2013, **3**.
17. Burk J, Ribitsch I, Gittel C, Juelke H, Kasper C, Staszyc C, Brehm W: **Growth and differentiation characteristics of equine mesenchymal stromal cells derived from different sources.** *Vet J* 2012.
18. Textor JA, Tablin F: **Activation of Equine Platelet-Rich Plasma: Comparison of Methods and Characterization of Equine Autologous Thrombin.** *Vet Surg* 2012.
19. Bosch G, Moleman M, Barneveld A, van Weeren PR, van Schie HT: **The effect of platelet-rich plasma on the neovascularization of surgically created equine superficial digital flexor tendon lesions.** *Scand J Med Sci Sports* 2011, **21**(4):554-561.
20. Filho Cerruti H, Kerkis I, Kerkis A, Tatsui NH, da Costa Neves A, Bueno DF, da Silva MC: **Allogeneous bone grafts improved by bone marrow stem cells and platelet growth factors: clinical case reports.** *Artif Organs* 2007, **31**(4):268-273.
21. Pieri F, Lucarelli E, Corinaldesi G, Fini M, Aldini NN, Giardino R, Donati D, Marchetti C: **Effect of mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma on the healing of standardized bone defects in the alveolar ridge: a comparative histomorphometric study in minipigs.** *J Oral Maxillofac Surg* 2009, **67**(2):265-272.
22. Yamada Y, Ueda M, Naiki T, Takahashi M, Hata K, Nagasaka T: **Autogenous injectable bone for regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma: tissue-engineered bone regeneration.** *Tissue Eng* 2004, **10**(5-6):955-964.
23. de Mattos Carvalho A, Alves AL, Golim MA, Moroz A, Hussni CA, de Oliveira PG, Deffune E: **Isolation and immunophenotypic characterization of mesenchymal stem cells derived from equine species adipose tissue.** *Vet Immunol Immunopathol* 2009, **132**(2-4):303-306.

24. Watts AE, Nixon AJ, Yeager AE, Mohammed HO: **A collagenase gel/physical defect model for controlled induction of superficial digital flexor tendonitis.** *Equine Vet J* 2012, **44**(5):576-586.
25. Watts A, Yeager A, Kopyov O, Nixon A: **Fetal derived embryonic-like stem cells improve healing in a large animal flexor tendonitis model.** *Stem Cell Research & Therapy* 2011, **2**.
26. Risselada M, Kramer M, Saunders JH, Verleyen P, Van Bree H: **Power Doppler assessment of the neovascularization during uncomplicated fracture healing of long bones in dogs and cats.** *Vet Radiol Ultrasound* 2006, **47**(3):301-306.
27. Livak K, Schmittgen T: **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method.** *Methods* 2001, **25**(4):402-408.
28. Flaminio MJ, Borges AS, Nydam DV, Horohov DW, Hecker R, Matychak MB: **The effect of CpG-ODN on antigen presenting cells of the foal.** *J Immune Based Ther Vaccines* 2007, **5**:1.
29. Schramme M, Hunter S, Campbell N, Blikslager A, Smith R: **A surgical tendonitis model in horses: Technique, clinical, ultrasonographic and histological characterisation.** *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology* 2010, **23**(4):231-239.
30. Lake S, Ansorge H, Soslowsky L: **Animal models of tendinopathy.** *Disability and Rehabilitation* 2008, **30**(20-22):1530-1541.
31. Dirks R, Warden S: **Models for the study of tendinopathy.** *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions* 2011, **11**(2):141-149.
32. Vidal M, Kilroy G, Lopez M, Johnson J, Moore R, Gimble J: **Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: Adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells.** *Veterinary Surgery* 2007, **36**(7):613-622.
33. Smith R, Webbon P: **Harnessing the stem cell for the treatment of tendon injuries: heralding a new dawn?** *British Journal of Sports Medicine* 2005, **39**(9):582-584.
34. Caniglia CJ, Schramme MC, Smith RK: **The effect of intralesional injection of bone marrow derived mesenchymal stem cells and bone marrow supernatant on collagen fibril size in a surgical model of equine superficial digital flexor tendonitis.** *Equine Vet J* 2012, **44**(5):587-593.
35. Argüelles D, Carmona JU, Pastor J, Iborra A, Viñals L, Martínez P, Bach E, Prades M: **Evaluation of single and double centrifugation tube methods for concentrating equine platelets.** *Res Vet Sci* 2006, **81**(2):237-245.
36. Boswell SG, Cole BJ, Sundman EA, Karas V, Fortier LA: **Platelet-rich plasma: a milieu of bioactive factors.** *Arthroscopy* 2012, **28**(3):429-439.
37. Barreira AP, Alves AL, Saito M, Amorim R, Kohayagawa A, Menarim B, Mota L: **Autologous Implant of Bone Marrow Mononuclear Cells as Treatment of Induced Equine Tendinitis** *The International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine* 2008, **6**(1):9.

38. Bendinelli P, Matteucci E, Dogliotti G, Corsi MM, Banfi G, Maroni P, Desiderio MA: **Molecular basis of anti-inflammatory action of platelet-rich plasma on human chondrocytes: mechanisms of NF- κ B inhibition via HGF.** *J Cell Physiol* 2010, **225**(3):757-766.
39. Puissant B, Barreau C, Bourin P, Clavel C, Corre J, Bousquet C, Taureau C, Cousin B, Abbal M, Laharrague P *et al*: **Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells.** *Br J Haematol* 2005, **129**(1):118-129.
40. Smith R: **Tendon and Ligament Injury.** In: *Proceedings of the 54th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners 2008; San Diego, California; 2008*: 475-501.
41. Salgado AJ, Reis RL, Sousa NJ, Gimble JM: **Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine.** *Curr Stem Cell Res Ther* 2010, **5**(2):103-110.
42. Crop MJ, Baan CC, Korevaar SS, Ijzermans JN, Weimar W, Hoogduijn MJ: **Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells induce explosive T-cell proliferation.** *Stem Cells Dev* 2010, **19**(12):1843-1853.
43. Nixon AJ, Watts AE, Schnabel LV: **Cell- and gene-based approaches to tendon regeneration.** *J Shoulder Elbow Surg* 2012, **21**(2):278-294.
44. Rosenberg JB, Greengard JS, Montgomery RR: **Genetic induction of a releasable pool of factor VIII in human endothelial cells.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000, **20**(12):2689-2695.
45. Maffulli N, Ewen SW, Waterston SW, Reaper J, Barrass V: **Tenocytes from ruptured and tendinopathic achilles tendons produce greater quantities of type III collagen than tenocytes from normal achilles tendons. An in vitro model of human tendon healing.** *Am J Sports Med* 2000, **28**(4):499-505.
46. Chiquet-Ehrismann R, Chiquet M: **Tenascins: regulation and putative functions during pathological stress.** *J Pathol* 2003, **200**(4):488-499.
47. Minamitani T, Ikuta T, Saito Y, Takebe G, Sato M, Sawa H, Nishimura T, Nakamura F, Takahashi K, Ariga H *et al*: **Modulation of collagen fibrillogenesis by tenascin-X and type VI collagen.** *Experimental Cell Research* 2004, **298**(1):305-315.
48. Docheva D, Hunziker EB, Fässler R, Brandau O: **Tenomodulin is necessary for tenocyte proliferation and tendon maturation.** *Mol Cell Biol* 2005, **25**(2):699-705.
49. Brent AE, Tabin CJ: **FGF acts directly on the somitic tendon progenitors through the Ets transcription factors Pea3 and Erm to regulate scleraxis expression.** *Development* 2004, **131**(16):3885-3896.
50. Schweitzer R, Chyung JH, Murtaugh LC, Brent AE, Rosen V, Olson EN, Lassar A, Tabin CJ: **Analysis of the tendon cell fate using Scleraxis, a specific marker for tendons and ligaments.** *Development* 2001, **128**(19):3855-3866.

51. Young M: **Stem cell applications in tendon disorders: a clinical perspective.** *Stem Cells Int* 2012, **2012**:637836.
52. Taylor SE, Vaughan-Thomas A, Clements DN, Pinchbeck G, Macrory LC, Smith RK, Clegg PD: **Gene expression markers of tendon fibroblasts in normal and diseased tissue compared to monolayer and three dimensional culture systems.** *BMC Musculoskelet Disord* 2009, **10**:27.
53. Patterson-Kane JC, Becker DL, Rich T: **The pathogenesis of tendon microdamage in athletes: the horse as a natural model for basic cellular research.** *J Comp Pathol* 2012, **147**(2-3):227-247.

Tabelas

Tabela 1 Três categorias de análise e seus respectivos escores para a avaliação dos sinais do Power Doppler.

Categoria/Escore	0	1	2	3
Intensidade sinal	Sem sinal	Vermelho Azul Marinho	Laranja Azul	Amarelo Azul Brilhante
Área do vaso (mm ²)	Sem sinal	1	2-3	>3
Número de vasos	Sem sinal	1	2-3	>3

A intensidade de sinal do Power Doppler foi disposta em diferentes cores devido à diferença de sentido do fluxo sanguíneo.

Tabela 2 Sistema de escore histológico e imuno-histoquímico utilizado para a graduação da reparação tendínea em equinos.

Variável	Escore e critério
Formato das células tendíneas	1 = Linear (normal)

	2 = Ligeiramente oval
	3 = Moderadamente redonda
	4 = Predominantemente redonda
Densidade das células tendíneas	1 = Esparso (normal)
	2 = Levemente aumentado
	3 = Moderadamente aumentada
	4 = Camadas de células
Hemorragia	1 = ausente (normal)
	2 = Esparso ou desigual
	3 = Múltiplas áreas
	4 = Predominantemente hemorrágico
Número de vasos	1 = Normal
	2 = Levemente aumentado
	3 = Moderadamente aumentado
	4 = Aumento severo
Infiltrado celular inflamatório	1 = Normal
	2 = Levemente aumentado
	3 = Moderadamente aumentado
	4 = Aumento severo
Linearidade das fibras colágenas	1 = Linear
	2 = >50% linear
	3 = 20% a 50% linear
	4 = Ausencia de áreas lineares
Uniformidade das fibras colágenas	1 = Uniformidade do diâmetro de todas as fibras
	2 = > 50% das fibras são uniformes
	3 = 20% a 50% das fibras são lineares
	4 = Completo desarranjo das fibras
Colágeno tipo III*	1 = < 10% tipo III
	2 = 10% a 50% tipo III
	3 = > 50% a 90% tipo III
	4 = > 90% tipo III
Fator VIII*	1 = Marcação média das células sem o reconhecimento da estrutura vascular
	2 = Marcação de alguns pequenos vasos
	3 = Marcação de vários pequenos vasos ou maiores vasos
	4 = Marcação de vários grandes vasos

*Determinado para análise da imunoistoquímica

Figuras

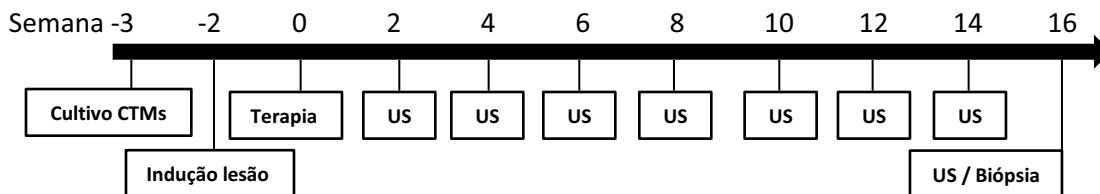
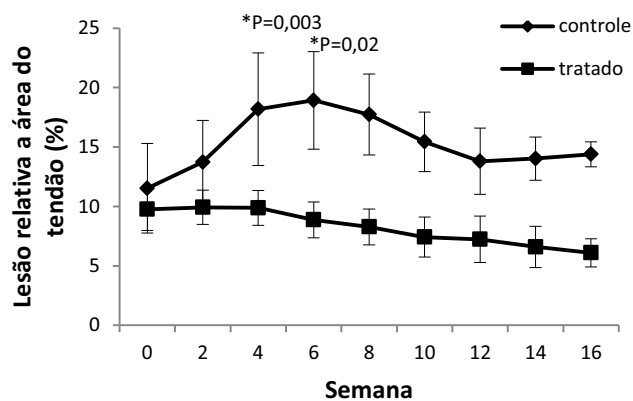
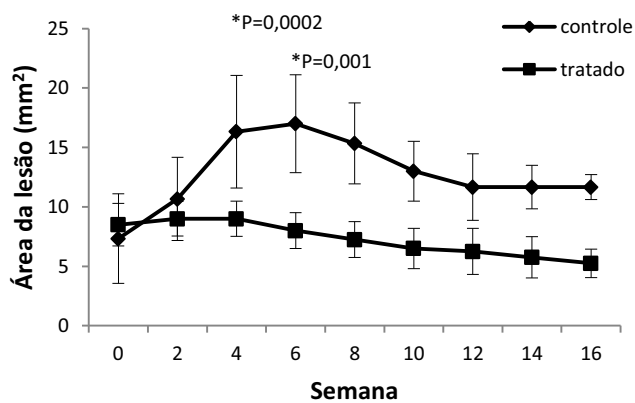


Figura 1 Cronograma do tempo. US, ultrassom.



A)



B)

Figura 2 Medidas ultrassonográficas. (A) Relação da área da lesão entre o grupo tratado e grupo controle entre os diferentes momentos. (B) Relação do percentual da área da lesão na seção transversal entre os diferentes grupos entre os diferentes momentos.

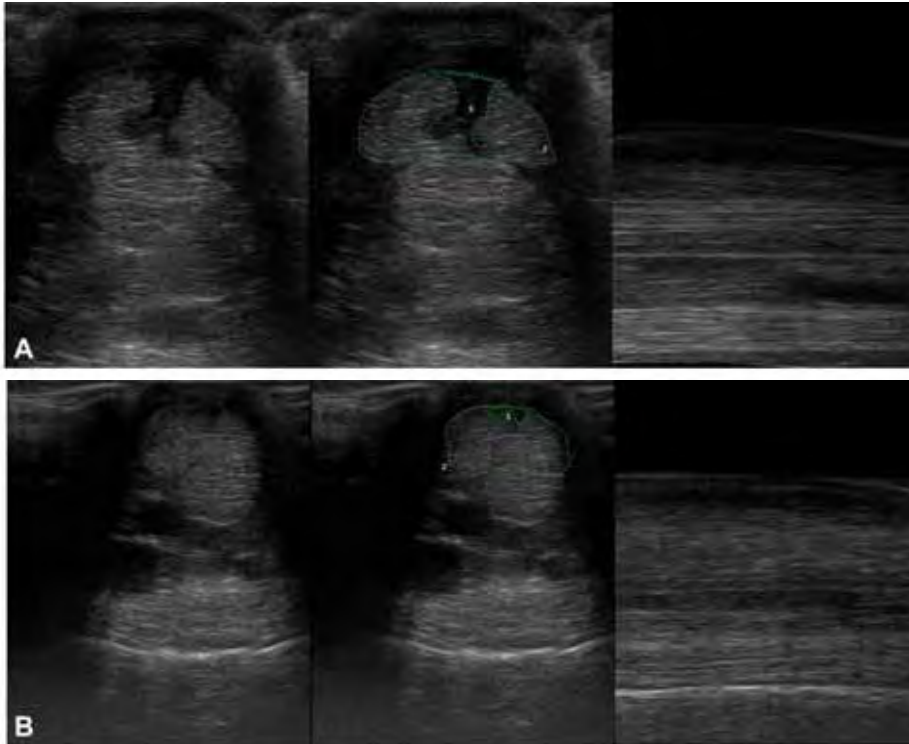


Figura 3 Imagem ultrassonográfica transversal e longitudinal. As imagens foram feitas 12 cm distal ao osso acessório do carpo, seis semanas após a terapia. A) Grupo controle: imagem de lesão tendínea com maior área de lesão se comparado ao tendão do grupo tratado (área do tendão na seção transversal = 81 mm^2 , área da lesão na seção transversal = 17 mm^2 , porcentual da área da lesão na seção transversal = 20%). B) Grupo tratado: tendinite do TFDS demonstrada pela imagem ultrassonográfica hipoecóica (área do tendão na seção transversal = 92 mm^2 , área da lesão na seção transversal = 6 mm^2 , porcentual da área da lesão na seção transversal = 7%).

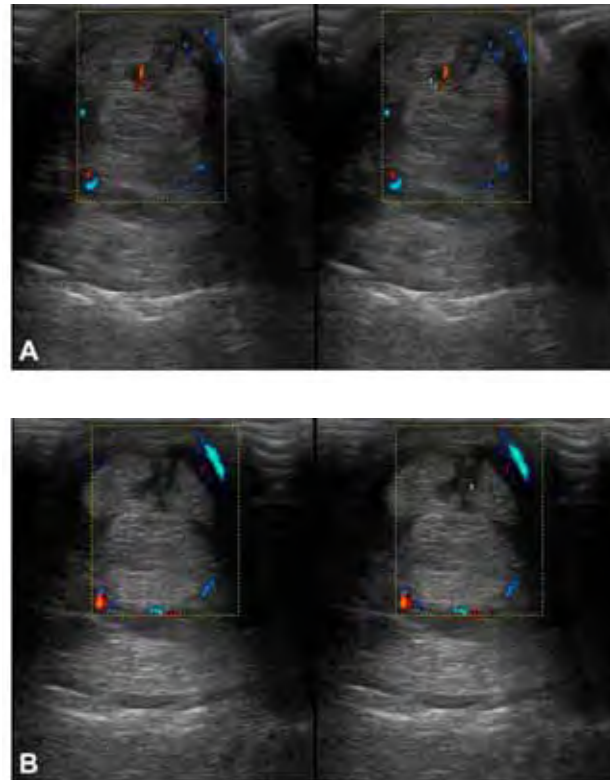


Figura 4 Imagem transversal da avaliação ultrassonográfica Power Doppler transversal. As imagens foram feitas 12 cm distal ao osso acessório do carpo, seis semanas após a terapia. A) Grupo tratado: área do vaso = 3 mm², intensidade do sinal = 2, número de vasos = 1. B) Grupo controle: área do vaso = 1 mm², intensidade do sinal = 1, número de vasos = 1.

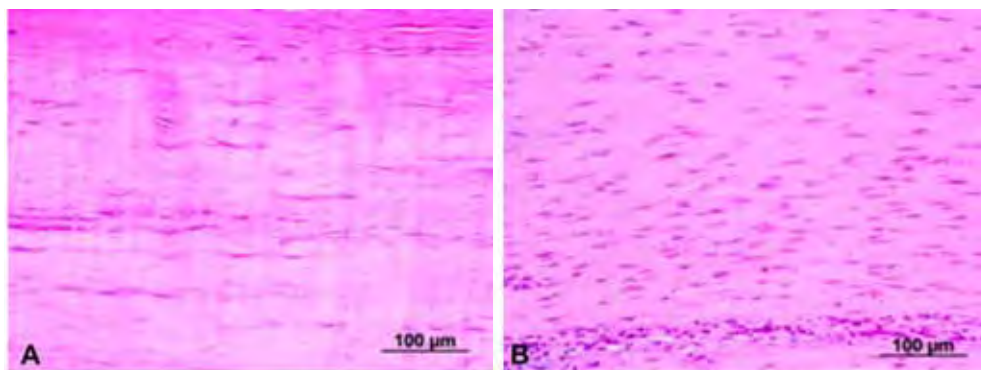


Figura 5 Imagem histopatológica do tendão flexor digital superficial. As figuras mostram cortes histopatológicos com objetiva de 20x coradas com Hematoxilina & Eosina (H&E). A) Grupo Tratado: tendão tratado com a associação de CTMs derivadas do tecido adiposo e concentrado de plaquetas. B) Grupo Controle: tendão tratado com PBS.

Material Adicional

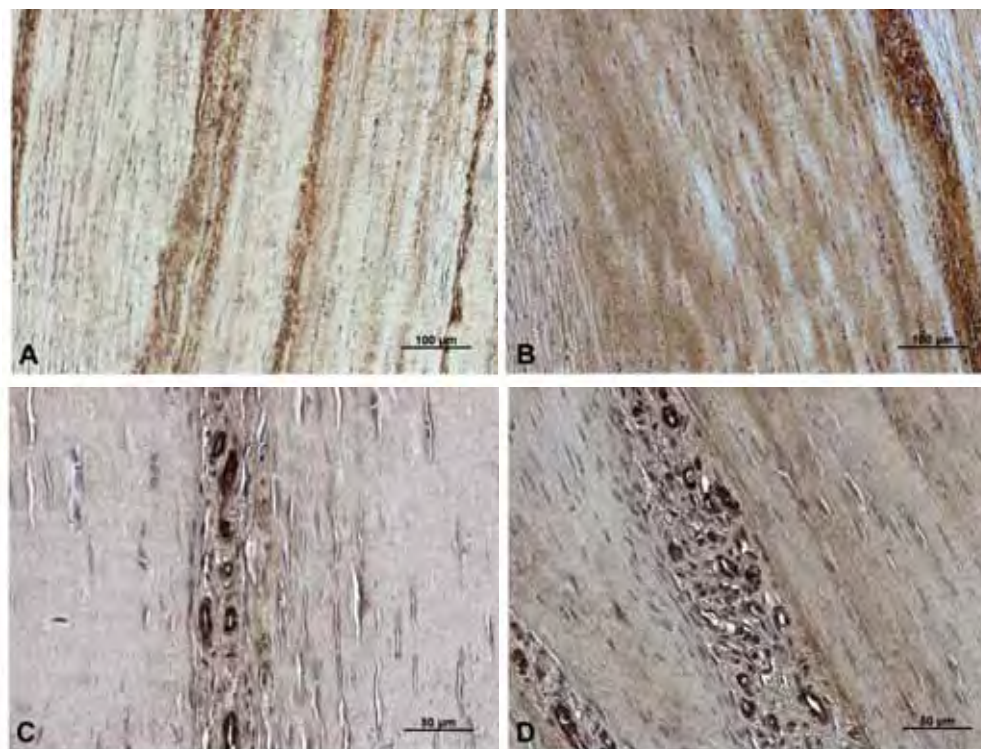


Figura Suplementar 1 Imagem imunoistoquímica do tendão flexor digital superficial. A) Imunoistoquímica para colágeno III, grupo tratado, objetiva 40X. B) Imunoistoquímica para colágeno tipo III, grupo controle, objetiva de 40X. C) Imunoistoquímica para fator VIII, grupo tratado, objetiva de 20X. D) Imunoistoquímica para fator VII, grupo controle, objetiva de 20X.

Tabela Suplementar 2. Mediana da expressão gênica entre os diferentes grupos relativa à expressão gênica obtida nos tendões saudáveis.

Gene	Grupo Tratado	Grupo Controle
<i>COL1A1</i>	38,90 ± 35,8	69,95 ± 41,6
<i>COL3A1</i>	92,59 ± 278,19*	390,60 ± 204,01 *P=0,08
<i>SCX</i>	10,40 ± 8,81	14,37 ± 8,31
<i>TNMD</i>	1034,15 ± 2485,26	1318,31 ± 1630,32
<i>TNC</i>	6,99 ± 17,97	8,62 ± 29,29

Capítulo 5

3 Discussão Geral

Com o avanço da medicina regenerativa, vem-se estudando novas biotecnologias na tentativa de tratar enfermidades cuja eficácia dos tratamentos convencionais são limitados. A terapia da tendinite equina com células progenitoras e concentrado de plaquetas é um exemplo de uma enfermidade que está sendo estudada quanto à possibilidade de regeneração tecidual após a ocorrência da lesão. Ainda devem ser superados diversos obstáculos para a adequada reparação tecidual, e embora o conhecimento em diferentes áreas esteja evoluindo progressivamente, a regeneração tendínea ainda está sendo conquistada.

Algumas características inerentes ao tecido tendíneo dificultam a reparação tendínea como a pobre vascularização e a baixa densidade celular. Após a instalação de uma lesão, ocorre a formação de um tecido cicatricial com características celulares e moleculares distintas do tecido tendíneo saudável que resultam na alteração da MEC e conseqüentemente reduzem a qualidade biomecânica das fibras tendíneas, tornando o tendão reparado mais vulnerável à recorrência da lesão.

Para a correta interpretação da ação da medicina regenerativa na terapia da tendinite equina é necessário certificar a qualidade dos produtos utilizados. Devemos empregar um modelo de tendinite experimental compatível com a tendinite de ocorrência natural e fazer o uso de diferentes metodologias de avaliação da reparação para verificação da possível existência de efeitos benéficos, quanto à instituição da terapia. Baseado nestes dados foi realizada a certificação de que as células que estão sendo isoladas realmente são células progenitoras, ou seja, têm o potencial de diferenciação e características compatíveis com células tronco. Por isso, a caracterização das CTMs com marcadores de superfície específicos e o teste de seu potencial de diferenciação foi realizada antes de sua aplicação terapêutica.

A coleta do tecido adiposo seguido do isolamento da FVE foi realizado com sucesso em todas as amostras, semelhante ao resultado encontrado por nosso grupo de pesquisa em estudos prévios (DE MATTOS CARVALHO et al., 2009, DE MATTOS CARVALHO et al., 2011), e por diferentes grupos de pesquisa (VIDAL et al., 2007, VIDAL et al., 2008, KISIDAY et al., 2008, MAMBELLI et al., 2009, COLLEONI et al., 2009, TOUPADAKIS et al., 2010, AHERN et al., 2011, SCHWARZ et al., 2011). A descrição da coleta do tecido adiposo assim como o isolamento da FVE seguido do cultivo das AdCTMs equina está bem definida, e já existem estudos que demonstram que as células progenitoras do tecido adiposo apresentam vantagens quando comparadas às células provenientes da medula óssea (considerada fonte padrão ouro), como maior número de CTMs viáveis com altas taxas de migração e potencial de diferenciação celular compatível (BURK et al., 2012).

No presente estudo, as AdCTMs foram caracterizadas parcialmente seguindo os critérios estabelecidos por um recente estudo em equinos (DE SCHAUWER et al., 2011): as células isoladas devem ser aderentes ao plástico quando mantidas em condições padrões de cultura; a diferenciação *in vitro* nas três diferentes linhagens deve ser confirmada utilizando as condições de cultivo padrão; as CTMs de equinos devem expressar CD29, CD44 e CD90 e não devem expressar CD14, CD79 e MHC-II.

Devido ao alto custo dos marcadores, falta de reação cruzada interespécie e da dificuldade de aquisição destes, utilizamos os marcadores CD44, CD90, CD 105 e MHC de Classe II. Conforme esperado pode-se observar expressão do CD44, CD90 e CD105 nas AdCTMs e a não expressão do MHC de Classe II. Estes resultados estão de acordo com os resultados de expressão das AdCTMs descritos quanto a marcação com CD44 (PASCUCCI et al., 2011), CD90 (PASCUCCI et al., 2011, RAABE et al., 2011, RANERA et al., 2011) e CD105 (BRAHUN et al., 2010). Estes marcadores também foram descritos em CTMs equinas provenientes de diferentes fontes, como medula óssea (ARNHOLD et al., 2007, GUEST et al., 2008, RADCLIFFE et al., 2010), sangue periférico (MARTINELLO et al., 2010), matriz do cordão umbilical (HOYNOWSKI et al., 2007).

Baseado no critério de caracterização das CTMs equinas descrito (DE SCHAUWER et al., 2011), também foi realizado a diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica das AdCTMs. A diferenciação é um processo que resulta em mudanças na morfologia, tamanho, potencial de membrana e atividade metabólica das células em resposta a modificações na expressão gênica (TAYLOR e CLEGG, 2011).

A diferenciação adipogênica das AdCTMs, pode ser comprovada pela coloração positiva ao *Oil Red* do acúmulo intracitoplasmático de gotículas de gordura após a adição do meio de cultivo específico para diferenciação adipogênica. A diferenciação osteogênica realizada em nosso estudo demonstrou que as AdCTMs adquiriram morfologia de osteoblasto, além da deposição de cálcio na MEC. A diferenciação condrogênica também foi realizada após o cultivo tridimensional das AdCTMs em *pellet* com meio de cultivo específico para diferenciação condrogênica. A deposição de proteoglicanos na MEC produzida pelas AdCTMs diferenciadas pode ser comprovada pela coloração com *Alcian Blue*. Resultados similares foram obtidos em estudos prévios descrevendo a diferenciação das AdCTMs equina (VIDAL et al., 2007, VIDAL et al., 2008, KISIDAY et al., 2008, MAMBELLI et al., 2009, COLLEONI et al., 2009, TOUPADAKIS et al., 2010, AHERN et al., 2011, SCHWARZ et al., 2011).

A escolha da técnica de dupla centrifugação para de obtenção do PRP utilizado em nosso estudo foi relativamente simples, pois requer apenas o uso de centrífuga e do fluxo laminar para a correta manipulação das amostras. Estes equipamentos estão disponíveis na maioria dos Hospitais Veterinários e Universidades do Brasil, tornando hábil seu uso em diferentes locais. Esta foi a principal razão por sua escolha. A concentração média de plaquetas obtidas foi de aproximadamente 320×10^3 plaquetas/ μL , valor compatível com o citado por Argüelles e colaboradores (2006) que descreveram esta técnica em equinos. Também existem técnicas automatizadas para a obtenção do PRP equino que descrevem a concentração de até 750×10^3 plaquetas/ μL (TORRICELLI et al., 2011), entretanto não se sabe qual é a concentração ideal de plaquetas para se obter a melhor resposta terapêutica da tendinite equina.

Outro aspecto importante a ser considerado na avaliação da terapia da tendinite experimental, é a elaboração de uma metodologia de indução de lesão tendínea compatível com a tendinite desenvolvida naturalmente. Existem diversos modelos experimentais para a indução da lesão tendínea em equinos, incluindo a remoção cirúrgica de um fragmento central do tendão (SCHRAMME et al., 2010), injeção de colagenase (YAMADA et al., 2008) e injeção de gel colagenase (WATTS et al., 2012). Cada um possui suas limitações, a técnica de remoção cirúrgica, por exemplo, resulta na formação de uma lesão sem preenchimento (ausência da MEC inflamada), enquanto que a indução da lesão tendínea com colagenase acarreta na formação de lesões muito extensas e irregulares, que continuam expandindo e, ocasionalmente, envolvem a superfície tendínea (BIRCH et al., 1998). A técnica utilizando gel de colagenase resulta na formação de lesão tendínea menor que a técnica de colagenase convencional, entretanto mantém a formação de inflamação compatível à tendinite de ocorrência natural, com presença de pequenas áreas de hemorragia e presença de macrófagos na avaliação histopatológica (WATTS et al., 2012).

A técnica de indução tendínea utilizada neste estudo foi baseada na metodologia descrita por Watts e colaboradores (2012) utilizando colagenase em gel. Embora nossa avaliação tenha sido realizada em apenas duas semanas e tenha sido limitado à avaliação clínica e ultrassonográfica, nosso grupo obteve resultados semelhantes ao previamente descrito como a formação de tendinite focal similar a tendinite de ocorrência natural e menor acometimento da superfície tendínea comparado à tendinite induzida pela injeção de colagenase.

Este é o primeiro estudo controlado que utilizou a associação das AdCTMs ao PRP na terapia da tendinite equina experimentalmente induzida. Os principais dados obtidos após a terapia da tendinite foram a melhor organização das fibras colágenas e diminuição do infiltrado inflamatório na avaliação histopatológica, não progressão da lesão (área da lesão) na avaliação ultrassonográfica, assim como também aumento do número e intensidade de sinais detectados pelo exame de Power Doppler, evidenciando a presença de maior fluxo sanguíneo na área tratada do GT. Resultado semelhante foi obtido em um prévio estudo de nosso grupo onde foi utilizada AdCTMs suspensas em soro autólogo para a terapia da

tendinite equina induzida com colagenase (DE MATTOS CARVALHO et al., 2011), com evidente melhora histopatológica do grupo tratado.

Os dados do presente estudo também são compatíveis com os resultados de outros experimentos que utilizaram CTMs ou PRP para a terapia da tendinite equina, como melhora da avaliação histopatológica e ultrassonográfica (SMITH et al., 2003, NIXON et al., 2008, SCHNABEL et al., 2009, BOSCH et al., 2010, BOSCH et al., 2011, DE MATTOS CARVALHO et al., 2011, MAIA et al., 2011, OLIVEIRA et al., 2012).

A avaliação ultrassonográfica demonstrou diferença quanto a evolução da área da lesão na seção transversal do grupo tratado comparado ao grupo controle, sugerindo ação preventiva após terapia com a associação de AdCTMs e PRP. A interpretação da ocorrência da ação preventiva baseou-se na minimização dos efeitos da ação da colagenase no grupo tratado, uma vez que a área da lesão do grupo tratado manteve-se estável, comparando a área da lesão do momento zero para os momentos subsequentes, enquanto que no grupo controle houve aumento da área da lesão fazendo-se a mesma comparação. Esta ação preventiva é compatível com a ação anti-inflamatória ou imunossupressora da terapia instituída, pois as CTMs geram aumento das quimiocinas, que funcionam como potentes mediadores ou reguladores da inflamação, além da supressão de secreção de citocinas a partir de células dendríticas, redução dos efeitos dos linfócitos T e das células natural *killer* (NIXON et al., 2012).

Os dados obtidos neste estudo quanto a possível ação preventiva da evolução da lesão tendínea amplia ainda mais as possibilidades de uso da terapia da associação terapêutica das AdCTMs com o PRP, focando-nos a estudar futuramente, o seu mecanismo de ação a fim de otimizar sua aplicação clínica. Outros estudos também deverão ser realizados para elucidar melhor o momento ideal da instituição da terapia da tendinite equina, que atualmente é padronizado entre 7 a 45 dias após início da lesão.

O uso do Power Doppler para a avaliação da vascularização tendínea mostrou-se eficaz, sendo que não foi observada vascularização dos tendões antes da indução da lesão (tendões saudáveis), enquanto que foi possível a

visualização de neovascularização nos tendões após a indução da lesão e, conseqüentemente diminuição da vascularização com a evolução da lesão. Sendo as avaliações sempre realizadas com o animal em posição quadrupedal, evitando alterações no posicionamento, como no caso da avaliação do TFDS com o membro fletido que conforme o posicionamento do membro ou estresse causado pela flexão das articulações carpo e metacarpofalangeanas pode resultar na alteração do fluxo sanguíneo.

Os dados obtidos no presente experimento estão de acordo com o descrito por Smith (2008) que relata que a hipervascularização é considerada normal durante o processo de reparação tecidual, entretanto há diminuição da vascularização com o progresso da reparação tendínea. O aumento da vascularização tendínea após a terapia com a associação de AdCTMs e PRP obtido neste estudo também está de acordo com os dados encontrados por nosso grupo em estudo prévio utilizando apenas as AdCTMs para a terapia da tendinite equina (DE MATTOS CARVALHO, 2009).

Além de estudos experimentais evidenciando a ação benéfica das CTMs e do PRP (SMITH et al., 2003, SCHNABEL et al., 2009, BOSCH et al., 2010, BOSCH et al., 2011, DE MATTOS CARVALHO et al., 2011, MAIA et al., 2011, OLIVEIRA et al., 2012), também há um estudo clínico que descreve a diminuição significativa na taxa de reincidência de tendinite após períodos de pelo menos dois anos de acompanhamento de animais tratados com terapia celular quando comparados aos tratados com terapia convencional, com reincidência de 27% e 56% respectivamente (GODWIN et al., 2012). Também há descrição da associação terapêutica das AdCTMs alogênicas com o PRP autólogo (DEL BUE et al., 2008), que evidencia melhora de 14 dos 16 animais tratados, com completa recuperação clínica e retorno a atividade física normal. A interpretação de todos os dados clínicos, experimentais com os obtidos no presente estudo fortalece a presunção do potencial terapêutico das CTMs, do PRP e até mesmo de sua associação.

Mesmo com o crescimento de investimento em pesquisas sobre medicina regenerativa e sua aplicação na tentativa da reparação da tendinite equina, este

ainda é um tema que tem muito a ser desenvolvido. Certamente informações adicionais quanto ao mecanismo de ação das CTMs e do PRP, padronização de seu isolamento, assim como o conhecimento da concentração ideal e o momento adequado para a instituição da terapia irão favorecer sua melhor utilização, e conseqüentemente tornar seu resultado terapêutico cada vez mais eficaz.

4 Conclusões Gerais

De acordo com os objetivos propostos, podemos concluir que:

1- O protocolo de isolamento, cultivo e caracterização das AdCTMs utilizados neste estudo foi adequado para a produção de uma população celular homogênea, de proliferação rápida e com potencial de diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica, tornando possível seu uso em futuros estudos envolvendo terapia celular. Estas informações contribuem para a qualificação da caracterização das CTMs.

2- A indução da lesão utilizando a colagenase em gel demonstrou ser uma técnica efetiva, resultando na formação de uma lesão focal similar a tendinite de ocorrência natural, com menor comprometimento do epitendão se comparado à técnica de colagenase convencional. Esta técnica de indução de lesão tendínea poderá ser utilizada para aperfeiçoar a execução de futuros estudos envolvendo o tratamento de tendinites experimentalmente induzidas.

3- A terapia instituída resultou em melhor organização das fibras colágenas e diminuição do infiltrado inflamatório na avaliação histopatológica, não progressão da lesão (área da lesão) na avaliação ultrassonográfica, assim como também aumento do número e intensidade de sinais detectados pelo exame de Power Doppler, evidenciando a presença de maior fluxo sanguíneo na área tratada do grupo tratado. A terapia utilizada não implicou em diferença significativa da expressão gênica dos genes COL1A1, COL3A1, TNC, TNMD, e SCX entre os diferentes grupos.

5 Bibliografia

AHERN, B.J.; SCHAER, T.P.; TERKHORN, S.P.; JACKSON, K.V.; MASON, N.J.; HANKENSON, K.D. Evaluation of equine peripheral blood apheresis product, bone marrow, and adipose tissue as sources of mesenchymal stem cells and their differentiation potential. *Am. J. Vet. Res.*, v.72, p.127-133, 2011.

ALVES, A.L.G. Contribuições para o estudo da tendinite eqüina. Análise ultrasonográfica e morfológica. 2008. 162f. Tese (Livre docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

ALVES, A.L.G. Influência da beta-aminopropionitrila associada à atividade física na reparação de eqüinos após agressão pela colagenase. Análise ultrassonográfica e morfológica. 1998. 92f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

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

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 the beta-aminopropionitrile fumarate and exercise on equine tendon healing: gross and histological aspects. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.21, p. 335-340, 2001.

ALVES, A.L.G.; VIERA, M.E.M.; BARREIRA, A.P.B.; MOTA, L.S.L.S.; SAITO, M.E.; KOHAYAGAWA, A.; HUSSNI, C.A.; WATANABE, M.J.; OLIVEIRA, P.G.G. Protocolo de isolamento de células mononucleares de medula óssea de eqüinos. *Veterinária e Zootecnia*, v. 16, p. 650-655, 2009.

ARGÜELLES, D.; CARMONA, J.U.; CLIMENT, F.; MUÑOZ, E.; PRADES, M. Autologous platelet concentrates as a treatment for musculoskeletal lesions in five horses. *Vet. Rec.*, v.162, p.208-211, 2008.

AVELLA, C.L.; SMITH, R.K. Ultrasound evaluation of stem cell treated tendon injuries in the horse: repair or regeneration? *Ultrasound*, v.17, p.74-79, 2009.

AVELLA, C.S.; ELY, E.R.; VERHEYEN, K.L., PRICE, J.S., WOOD, J.L., SMITH, R.K. Ultrasonographic assessment of the superficial digital flexor tendons of National Hunt racehorses in training over two racing seasons. *Equine Vet. J.*, v.41, p.449-454, 2009.

BARREIRA, A.P.B.; ALVES, A.L.G.; SAITO, M.E.; AMORIM, R.L.; KOHAYAGAWA, A.; MENARIM, B.C.; MOTA, L.S. Autologous implant of bone marrow mononuclear cells as treatment of induced equine tendinitis. *The International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, v.6, n.1, p.46-54, 2008.

BIRCH, H.L.; BAILEY, A.J.; GOODSHIP, A.E. Macroscopic 'degeneration' of equine superficial digital flexor tendon is accompanied by a change in extracellular matrix composition. *Equine Veterinary Journal*, v.30, p.534-539, 1998.

BIRCH, H.L.; RUTTER, G.A.; GOODSHIP, A.E. Oxidative energy metabolism in equine tendon cells. *Research in Veterinary Science*, v.62, p. 93-97, 1997.

BOSCH, G.; DE MOS, M.; VAN BINSBERGEN, R.; VAN SCHIE, H.T.M.; VAN DE LEST, C.H.A.; VAN WEEREN P.R. The effect of focused extracorporeal shock wave therapy on collagen matrix and gene expression in normal tendons and ligaments. *Equine Veterinary Journal*, v.41, p. 335-341, 2009.

BOSCH, G.; VAN SCHIE, H.T.M.; DE GROOT, M.W.; CADBY J.A.; VAN DE LEST, C.H.; BAMEVELD, A.; VAN WEEREN P.R. Effects of platelet-rich plasma on the quality of repair of mechanically induced core lesions in equine superficial digital flexor tendons: A placebo-controlled experimental study. *Journal of Orthopaedic Research*, v.28, p. 211-217, 2010.

BOSCH, G.; VAN WEEREN P.R.; BARNEVELD, A.; VAN SCHIE H.T.M. Computerised analysis of standardised ultrasonographic images to monitor the repair of surgically created core lesions in equine superficial digital flexor tendons following treatment with intratendinous platelet rich plasma or placebo. *The Veterinary Journal*, v.187, p.92-98, 2011.

BOSWELL, S.G.; COLE, B.J.; SUNDMAN, E.A.; KARAS, V.; FORTIER, L.A. Platelet-rich plasma: a milieu of bioactive factors. *Arthroscopy*, v.28, p.429-439, 2012.

BRAHUN, J.; HACK, A.; WEIS-KLEMM, M.; CONRAD, S.; TREML, S.; KOHLER, K.; WALLISER, U.; SKUTELLA, T.; AICHER, W.K. Evaluation of the osteogenic and chondrogenic differentiation capacities of equine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Am. J. Vet. Res.*, v.71, p.1228-1236, 2010.

BRAMLAGE, L.R. Tendinitis, the approach to treatment. In: REEF, V.B. Equine diagnostic ultrasound. Philadelphia: W.B. Saunders, 1998. p.132-137.

BURK, J.; RIBITSCH, I.; GITTEL, C.; JUELKE, H.; KASPER, C.; STASZYK, C.; BREHM, W. Growth and differentiation characteristics of equine mesenchymal stromal cells derived from different sources. *Vet J*, 2012. No prelo.

CAPLAN, A.I.; DENNIS, J.E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *Journal of Cellular Biochemistry*, v.98, p.1076-1085, 2006.

CARMONA, J.U.; PRADES, M.; ARGÜELLES, D. Autologous platelet concentrates as a treatment for soft tissue musculoskeletal lesions in horses. *Archivos de Medicina Veterinaria*, v.41, p.77-82, 2009.

CARVALHO, A.M. Implante autólogo de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo no tratamento de tendinites experimentais em eqüinos: avaliação clínica, ultrassonográfica, histopatológica e imunoistoquímica. 2009. 134p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

COLLEONI, S.; BOTTANI, E.; TESSARO, I.; MARI, G.; MERLO, B.; ROMAGNOLI, N.; SPADARI, A.; GALLI, C.; LAZZARI, G. Isolation, growth and differentiation of equine mesenchymal stem cells: effect of donor, source, amount of tissue and supplementation with basic fibroblast growth factor. *Vet. Res. Commun.*, v.33, p.811-821, 2009.

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

DAHLGREN, L.A. Management of tendon injuries. In: ROBINSON, N.E. Current therapy in equine medicine 6. Saunders: Elsevier, 2008, Cap.115, p.518-523.

DAHLGREN, L.A. Pathobiology of tendon and ligament injuries. *Clinical Techniques in Equine Practice*, v.6, n.1, p.168-173, 2007.

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

DE MATTOS CARVALHO, A.; ALVES, A.L.G.; GOLIM, M.A.; MOROZ, A.; HUSSNI, C.A.; OLIVEIRA, P.G.G.; DEFFUNE, E. Isolation and immunophenotypic characterization of mesenchymal stem cells derived from equine species adipose tissue. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.132, p.303-306, 2009.

DE MATTOS CARVALHO, A.; ALVES, A.L.G.; OLIVEIRA, P.G.G.; ÁLVAREZ, L.E.C.; AMORIM, R.L.; HUSSNI, C.A.; DEFFUNE, E. Use of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells for Experimental Tendinitis Therapy in Equines. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.31, p.26-34, 2011.

DE SCHAUWER, C.; MEYER, E.; VAN DE WALLE, G.R.; VAN SOOM, A. Markers of stemness in equine mesenchymal stem cells: a plea for uniformity. *Theriogenology*, v.75, p.1431-1443, 2011.

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

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D.; DEANS, R.; KEATING, A.; PROCKOP, D.; HORWITZ, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cell. The International Society for Cellular Therapy Position Statement. *Cytotherapy*, v.8, p.315-317, 2006.

DYSON, S. Treatment of superficial digital flexor tendinitis: a comparison of conservative management, sodium hyaluronate, and glycosaminoglycan polysulfate. *Proceedings of Annual Convention of the American Association of Equine Practice*, v.43, p.297-300, 1997.

DYSON, S.; MURRAY, R. Magnetic resonance imaging evaluation of 264 horses with foot pain: the podotrochlear apparatus, deep digital flexor tendon and collateral ligaments of distal interphalangeal joint. *Equine Veterinary Journal*, v.39, p.340-343, 2007.

DYSON, S.J. Medical management of superficial digital flexor tendonitis: a comparative study in 219 horses (1992-2000). *Equine Vet. J.*, v.36, p.415-419, 2004.

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

FOSTER, T.E.; PUSKAS, B.L.; MANDELBAUM, B.R.; GERHARDT, M.B.; RODEO, S.A. Platelet-Rich Plasma: From Basic Science to Clinical Applications. *Am J Sports Med*, v.37, p. 2259-2272, 2009.

FRIEDENSTEIN, A.J.; PIATETZKY-SHAPIRO, I.I.; PETROKOVA, K.V. Osteogenesis in transplants of BM cells. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, v.16, p.381-90, 1966.

FUFA, D.; SHEALY, B.; JACOBSON, M.; KEVY, S.; MURRAY, M.M. Activation of platelet-rich plasma using soluble type I collagen. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v.4, p.684-690, 2008.

GENOVESE, R.L. *Treatment of superficial digital flexor tendinitis – an opinion. Equine diagnostic ultrasound*. Baltimore: William & Wilkins, 1998. p.543-571.

GODWIN, E.E.; YOUNG, N.J.; DUDHIA, J.; BEAMISH, I.C.; SMITH, R.K.W. Implantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells demonstrates improved outcome in horses with overstrain injury of the superficial digital flexor tendon. *Equine Vet. J.*, v.44, p.25-32, 2012.

GOODSHIP, A.E.; BIRCH, H.L.; WILSON, A.M. The pathobiology and repair of tendon and ligament injury. *The Veterinary Clinics of North America Equine Practice*, v.10, p.323-349, 1994.

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

HENNINGER, D.D.; SNYDER, J.R.; PASCOE, J.R.; DILLING, G.W. Microvascular permeability changes in ischemia/reperfusion injury in the ascending colon of horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.201, p. 1191-1196, 1992.

HERTHEL, D.J. Enhanced suspensory ligament healing in 100 horses by stem cell and other bone marrow components. In: Annual American association of equine practitioners convention, 47, 2001. Proceedings of the 47th AAEP Annual Convention: November 24–28, San Diego, California, USA, 2001, p.319-321.

HOYNOWSKI, S.M.; FRY, M.M.; GARDNER, B.M.; LEMING, M.T.; TUCKER, J.R.; BLACK, L.; SAND, T.; MITCHELL, K.E. Characterization and differentiation of equine umbilical cord-derived matrix cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.362, p.347-353, 2007.

JUNQUEIRA, L.C.U, CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. 10. Ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004. 488p.

KERSH, K.D.; MC CLURE, S.R.; VAN SICKLE, D.; EVANS, R.B. The evaluation of extracorporeal shock wave therapy on collagenase induced superficial digital flexor tendonitis. *Vet. Comp. Orthop. Traumatol.*, v.19. p.99–105, 2006.

KISIDAY, J.D.; KOPECKY, P.W.; EVANS, C.H.; GRODZINSKY, P.W.; MCILWRAITH, C.W.; FRISBIE, D.D. Evaluation of Adult Equine Bone Marrow and Adipose-Derived Progenitor Cell Chondrogenesis in Hydrogel Cultures. *J. Orthop. Res.* v.26, p.322-331, 2008.

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

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

KOCH, T.G.; HEERKENS, T.; THOMSEN, P.D.; BETTS, D.H. Isolation of mesenchymal stem cells from equine umbilical cord blood. *BMC Biotechnol.*, v.7, n. 26, p.2007.

KOERNER, J.; NESIC, D.; ROMERO, J.D.; BREHEM, W.; MAINIL-VARLET, P.; GROGAN, S.P. Equine Peripheral Blood-Derived Progenitors in Comparison to Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*, v.24, p.1613–1619, 2006.

LACITIGNOLA, L.; CROVACE, A.; ROSSI, G.; FRANCIOSO, E. Cell therapy for tendinitis, experimental and clinical report. *Veterinary Research Communications*, v.32, p. 33-38, 2008.

MAIA, L.; SOUZA, M.V.; JÚNIOR, J.I.R.; OLIVEIRA, A.C.; ALVES, G.E.S.; BENJAMIN, L.A.; SILVA, Y.F.R.S.; ZANDIM, B.M.; MOREIRA, J.C.L. Platelet-Rich plasma in the treatment of induced tendinopathy in horses: histologic evaluation. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.29, p.618-626, 2009.

MAMBELLI, L.I.; SANTOS, E.J.; FRAZÃO, P.J.; CHAPARRO, M.B.; KERKIS, A.; ZOPPA, A.L.; KERKIS, I. Characterization of equine adipose tissue-derived progenitor cells before and after cryopreservation. *Tissue Eng.: Part C*, v.15, p.87–94, 2009.

MARFE, G.; ROTTA, G.; DE MARTINO, L.; TAFANI, M.; FIORITO, F.; DI STEFANO, C.; POLETTINI, M.; RANALLI, M.; RUSSO, M.A.; GAMBACURTA, A. A new clinical approach: Use of blood-derived stem cells (BDSCs) for superficial digital flexor tendon injuries in horses. *Life Sci.*, 2012 (In Press).

MARION, N.W.; MAO, J.J. Mesenchymal stem cells and tissue engineering. *Methods Enzymol.*, v.420, p.339-361, 2006.

MARTINELLO, T.; BRONZINI, I.; MACCATROZOO, L.; LACOPETTI, I.; SAMPAOLESI, M.; MASCARELLO, F.; PATRUNO, M. Cryopreservation does not affect the stem cell characteristics of multipotent cells isolated from equine peripheral blood. *Tissue Eng. Part C Methods.*, v.16, p.771-781, 2010.

NIXON, A.J.; DAHLGREN, L.A.; HAUPT, J.L.; YEAGER, A.E.; WARD, D.L. Effect of adipose-derived nucleated cell fractions on tendon repair in horses with collagenase-induced tendinitis. *American Journal of Veterinary Research*, v.69, p.928-937, 2008.

NIXON, A.J.; WATTS, A.E.; SCHNABEL, L.V. Cell- and gene-based approaches to tendon regeneration. *J. Shoulder Elbow Surg.*, v.21, p.278-294, 2012.

NÖTH, U.; RACKWITZ, L.; STEINERT, A.F.; TUAN, R.S. Cell delivery therapeutics for musculoskeletal regeneration. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.62, p.765-83, 2010.

O'MEARA, B.; BLADON, B.; PASRKIN, T.D.; FRASER, B.; LISCHER, C.J. An investigation of the relationship between race performance and superficial digital flexor tendonitis in the Thoroughbred racehorses. *Equine Veterinary Journal*, v.42, p.322-326, 2010.

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

OLIVEIRA, P.G.G.; ALVES, A.L.G.; CARVALHO, A.M.; HUSSNI, C.A.; WATANABE, M.J.; AMORIM, R.L.; RODRIGUES, M.M.P.; MOTA, L.S. Uso de células mononucleares da medula óssea no tratamento de tendinites induzidas experimentalmente em equinos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.63, p. 1391-1398, 2011.

PASCUCCI, L.; CURINA, G.; MERCATI, F.; MARINI, C.; DALL'AGLIO, C.; PATERNESI, B.; CECCARELLI, P. Flow cytometric characterization of culture expanded multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) from horse adipose tissue: Towards the definition of minimal stemness criteria. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.144, p.499-506, 2011.

PUCHALSKI, S.M.; GALUPPO, L.D.; HORNOF, W.J.; WISNER, E.R. Intraarterial contrast enhanced computed tomography of the equine distal extremity. *Veterinary Radiology Ultrasound*, v.48, p.21-29, 2007.

RAABE, O.; SHELL, K.; WÜRTZ, A.; REICH, C.M.; WENISCH, S.; ARNHOLD, S. Further insights into the characterization of equine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Vet. Res. Commun.* v.35, p.355-365, 2011.

RADCLIFFE, C.H.; FLAMINIO, M.J.B.F.; FORTIER, L.A. Temporal analysis of equine bone marrow aspirate during establishment of putative mesenchymal progenitor cell populations. *Stem Cells Dev.* v.19, p.269-81,2010.

RANERA, B.; LYAHYAI, J.; ROMERO, A.; VÁZQUEZ, F.J.; REMACHA, A.R.; BERNAL, M.L.; ZAGAROZA, P.; RODELLAR, C.; MARTÍN-BURRIEL, I. Immunophenotype and gene expression profiles of cell surface markers of mesenchymal stem cells derived from equine bone marrow and adipose tissue. *Vet. Immunol. Immunopathol.* v.144, p.147-154, 2011.

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

REEF, V.B. Superficial digital flexor tendon healing: ultrasonographic evaluation of therapies. *The Veterinary Clinics of North America Equine Practice*, v.17, p.159-178, 2001.

RILEY, G.P. Gene expression and matrix turnover in overused and damaged tendons. *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports*, v.15, p.241-251, 2005.

ROSS, M.W.; DYSON, S.J. *Diagnosis and Management of Lameness in the Horse*. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2003, 1140p.

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

SCHNABEL, L.V.; MOHAMMED, H.O.; MILLER, B.J.; MCDERMOTT, W.G.; JACOBSON, M.S.; SANTANGELO, K.S.; FORTIER, L.A. Platelet Rich Plasma (PRP) Enhances Anabolic Gene Expression Patterns in Flexor Digitorum Superficialis Tendons. *Journal of Orthopaedic Research*, v.25,p.230-240, 2007.

SCHRAMME, M.; HUNTER, S.; CAMPBELL, N.; BLIKSLAGER, A.; SMITH, R. A surgical tendonitis model in horses: Technique, clinical, ultrasonographic and histological characterisation. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology*, v.23, p.231-239, 2010.

SCHWARZ, C.; LEICHT, U.; DROSSE, I.; ULRICH, V.; LUIBL, V.; SCHIEKER, M.; RÖCKEN, M. Characterization of adipose-derived equine and canine mesenchymal stem cells after incubation in agarose-hydrogel. *Vet. Res. Commun.*, v.35, p.487-499, 2011.

SCHWARZ, C.; LEICHT, U.; ROTHE, C.; INGA, D.; VOLKER, LUIBL; MICHAEL, RÖCKEN, M.; MATTHIAS, S. Effects of different media on proliferation and differentiation capacity of canine, equine and porcine adipose derived stem cells. *Res. Vet. Sci.*, v.93, p.457-462, 2011.

SMITH, R.K.W. Pathophysiology of tendon injury. In: ROSS, M.W.; DYSON, S.J. *Diagnosis and management of lameness in the horse*. St. Louis: Saunders, 2003. p.616-628.

SMITH, R.K.W. Recent advances in the diagnosis of tendon disease. In: BRITISH EQUINE VETERINARY ASSOCIATION CONGRESS, 47., 2008, Liverpool, United Kingdom. Proceedings... Liverpool, United Kingdom, 2008. v.47, p.261-262.

SMITH, R.K.W. Tendon and ligament injury. In: Convention of the AAEP, San Diego, California, USA. American Association of Equine Practitioners Annual Convetion, v.54, p.475-501, 2008.

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

SMITH, R.K.W.; MCGUIGAN, M.P.; HYDE, J.T.; DALY, A.S.G.; PARDOE, C.H.; LOCK, A.N.; WILSON, A.M. In vitro evaluation of nonrigid support systems for the equine metacarpophalangeal joint. *Equine Veterinary Journal*, v.34, p. 726-731, 2002.

SMITH, R.K.W.; WEBBON, P. Harnessing the stem cell for the treatment of tendon injuries: Heralding a new dawn? *British Journal of Sports Medicine*, v.39, p. 582-584, 2005.

STEPHENS, P.R.; NUNAMAKER, D.M.; BUTTERWECK, D.M. Application of a Hall-effect transducer for measurement of tendon strains in horses. *American Journal of Veterinary Research*, v. 50, p. 1089-1095, 1989.

TAYLOR, S.E.; CLEGG, P.D. Collection and propagation methods for mesenchymal stromal cells. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.*, v.27, p.263-274, 2011.

TAYLOR, S.E.; SMITH, R.K.W.; CLEGG, P.D. Mesenchymal stem cell therapy in equine musculoskeletal disease: scientific fact or clinical fiction? *Equine Vet. J.*, v.39, p.172-180, 2007.

TEXTOR, J.A.; TABLIN, F. Activation of Equine Platelet-Rich Plasma: Comparison of Methods and Characterization of Equine Autologous Thrombin. *Veterinary Surgery*, 2012. No prelo.

THORPE, C.T.; CLEGG, P.D.; BIRCH, H.L. A review of tendon injury: Why is the equine superficial digital flexor tendon most at risk? *Equine Veterinary Journal*, v.42, p.174-180, 2010.

TORRICELLI, P.; FINI, M.; FILARDO, G.; TSCHON, M.; PISCHEDDA, M.; PACORINI, A.; KON, E.; GIARDINO, R. Regenerative medicine for the treatment of musculoskeletal overuse injuries in competition horses. *Int. Orthop.*, v.35, p.1569-1576, 2011.

TOUPADAKIS, C.A.; WONG, A.; GENETOS, D.C.; CHEUNG, W.K.; BORJESSON, D.L.; FERRARO, G.L.; GALUPPO, L.D.; LEACH, J.K.; OWENS, S.D.; YELLOWLEY, C.E. Comparison of the osteogenic potential of equine

mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, umbilical cord blood, and umbilical cord tissue. *Am. J. Vet. Res.* v.71, p.1237-1245, 2010.

VENDRUSCULO, C.P.; CARVALHO, A.M.; MORAES, L.F.; MAIA, L.; QUEIROZ, D.L.; WATANABE, M.J.; YAMADA, A.L.M.; ALVES, A.L.G. Avaliação da eficácia de diferentes protocolos de preparo do Plasma Rico em Plaquetas para uso em Medicina Equina. *Pesq. Vet. Bras.*, v.32, p. 106-110, 2012.

VIDAL, M.A.; KILROY, G.E.; LOPEZ, M.J.; MOORE, R.M.; GIMBLE, J.M. Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Vet. Surg.*, v.36, p.613-622, 2007.

VIDAL, M.A.; ROBINSON, S.O.; LOPEZ, M.J.; PAULSEN, D.B.; BORKHSENIUS, O.; JOHNSON, J.R.; MOORE, R.M.; GIMBLE, J.M. Comparison of Chondrogenic Potential in Equine Mesenchymal Stromal Cells Derived from Adipose Tissue and Bone Marrow. *Veterinary Surgery*, v.37, p.713–724, 2008.

VIOLINI, S.; RAMELLI, P.; PISANI, L.F.; GORNI, C.; MARIANI, P. Horse bone marrow mesenchymal stem cells express embryo stem cell markers and show the ability for tenogenic differentiation by in vitro exposure to BMP-12. *BMC Cell Biology*, v.10, n.29, 2009.

WANG, M.; CRISOSTOMO, P.R.; HERRING, C.; MELDRUM, K.K.; MELDRUM, D.R. Human progenitor cells from bone marrow or adipose tissue produce VEGF, HGF and IGF-1 in response to TNF by a p38 mitogen activated protein kinase dependent mechanism. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, v.291, p.880-884, 2006.

WATTS, A.; YEAGER, A.; KOPYOV, O.; NIXON, A. Fetal derived embryonic-like stem cells improve healing in a large animal flexor tendonitis model. *Stem Cell Research & Therapy*, v.2, 2011.

WATTS, A.E.; NIXON, A.J.; YEAGER, A.E.; MOHAMMED, H.O. A collagenase gel/physical defect model for controlled induction of superficial digital flexor tendonitis. *Equine Vet. J.*, v.44, p.576-586, 2012.

WHITCOMB, M.B. Ultrasonographic Evaluation of the Metacarpus, Metatarsus, and Pastern. *Clinical Techniques in Equine Practice*, v.3, p.238-255, 2004.

WILSON, A.M.; GOODSHIP, A.E. Exercise-induced hyperthermia as a possible mechanism for tendon degeneration. *Journal of Biomechanics*, v.27, p. 899-905, 1994.

WOO, S.L.; ABRAMOWITZ, S.D.; KILGER, R.; LIANG, R. Biomechanics of knee ligaments: Injury, healing, and repair. *Journal of Biomechanics*, v.39, p.1-20, 2006.

WOO, S.L.Y.; HILDEBRAND, K.; WATANABE, N.; FENWICK, J.A.; PAPAGEORGIOU, C.D.; WANG, J.H. Tissue engineering of ligament and tendon healing. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, v.367p.312-323, 1999.

YAMADA, A.L.M.; ALVES, A.L.G.; HUSSNI, C.A.; NICOLETTI, J.L.M.; THOMASSIAN, A.; WATANABE, M.J.; CARNEIRO, R. Comparação de diferentes doses de colagenase em modelo de indução de tendinite para eqüinos: estudo clínico e ultra-sonográfico. *Ciência Rural*, v.39, p.1124-1130, 2009.

YU, J.; VODYANIK, M.A.; SMUGGA-OTTO, K.; ANTOSIEWICZ-BOURGET, J.; FRANE, J.L.; TIAN, S.; NIE, J.; JONSDOTTIR, G. A.; RUOTTI, V.; STEWART, R.; SLUKVIN, I.I.; THOMSON, J.A. Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science*, v.318, n.5858, p.1917-1920, 2007.

ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. *Células-Tronco: a nova fronteira da medicina*. São Paulo: Editora Atheneu, 2006, 245p.

ZUK, P.A.; ZHU, M.; MIZUNO, H.; HUANG, J.; FUTRELL, J.W.; KATZ, A.J.; BENHAIM, P.; LORENZ< H.P.; HEDRICK, M.H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering*, v.7, p.211-228, 2001.