

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

**IMPLANTE AUTÓLOGO DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS DO TECIDO ADIPOSEO NO TRATAMENTO DE
TENDINITES EXPERIMENTAIS EM EQÜINOS: AVALIAÇÃO
CLÍNICA, ULTRASSONOGRÁFICA, HISTOPATOLÓGICA E
IMUNOISTOQUÍMICA**

ARMANDO DE MATTOS CARVALHO

Botucatu - SP

Junho 2009

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

**IMPLANTE AUTÓLOGO DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS DO TECIDO ADIPOSE NO TRATAMENTO DE
TENDINITES EXPERIMENTAIS EM EQÜINOS: AVALIAÇÃO
CLÍNICA, ULTRASSONOGRÁFICA, HISTOPATOLÓGICA E
IMUNOISTOQUÍMICA**

ARMANDO DE MATTOS CARVALHO

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

Orientadora:
Prof^a. Dr^a Ana Liz Garcia Alves

Botucatu – SP
Junho 2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Carvalho, Armando de Mattos.

Implante autólogo de células-tronco.mesenquimais do tecido adiposo no tratamento de tendinites experimentais em eqüinos: avaliação clínica, ultrassonografica, histopatológica e imunoistoquímica / Armando de Mattos Carvalho. – Botucatu [s.n.], 2009.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2009.

Orientador: Ana Liz Garcia Alves

Assunto CAPES: 50503030

1. Eqüino - Doenças – Tratamento - Estudos experimentais 2. Tendinite
3. Claudicação

Palavras-chave: Eqüino; Célula-tronco mesenquimal; Tecido adiposo; Tendão; Terapia

Composição da Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Ana Liz Garcia Alves

Prof^a. Dr^a. Elenice Deffune

Prof^a. Dr^a. Anna Paula Balesdent Barreira

DEDICATÓRIA

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 **Danielle Borges Mendonça**, por sua compreensão e estímulo durante o curso de mestrado.

Muito obrigado por fazerem parte da minha vida...

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer inicialmente a **Deus**, por tudo de bom que ele deu em minha vida; saúde, família, paz, alegria, amizades, etc. Muito obrigado senhor por sempre estar ao meu lado.

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 e oportunidade do desenvolvimento do curso de mestrado com sua orientação.

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 mestrado, 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 sua grande colaboração no desenvolvimento da dissertação de mestrado.

À Prof^a. Dr^a. **Renée Laufer Amorim**, pela importante cooperação, para a realização dos histopatológicos e imunoistoquímicas.

Aos pós-graduandos **Andrei Moroz** do laboratório de engenharia celular, **Luis Emiliano Cisneros Álvarez** da radiologia, **Patrícia Galvão Gomes de Oliveira** e **Ana Lucia Miluzzi Yamada** da cirurgia de grandes animais, **Luiza Quintão Medeiros** da anestesiologia, **Giuliana Brasil Croce** da patologia, por serem sempre atenciosos e prestativos durante a realização do experimento. Não diferente, as alunas de iniciação científica **Cynthia P. Vendruscolo** e **Marina Alvarenga**, que sempre auxiliaram nos cuidados com os animais e no desenvolvimento do mestrado.

Ao professor Dr. **Marcos Jun Watanabe**, por sua ajuda em momentos de dúvida sobre o cuidado diário com os animais. Aos residentes **Rodrigo Carneiro**, **Mayra Teixeira Alas Martins**, **Cristina de Faria Mantovani** e **Juliana de Moura Alonso** sempre dispostos a auxiliar no desenvolvimento do projeto. Aos funcionários **José Jairo Zucari** e **Melissa Agata Saleme**, sempre atenciosos e dispostos a ajudar.

À **FAPESP**, pela concessão de bolsa para Mestrado.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE ANEXOS	
RESUMO	
ABSTRACT	
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1 ESTRUTURA E FUNÇÃO DOS TENDÕES.....	2
2.2 FISIOPATOLOGIA DA TENDINITE.....	4
2.3 TRATAMENTO DE TENDINITES.....	8
2.3.1 Tratamentos convencionais.....	8
2.3.2 Células-Tronco.....	11
2.3.3 Células-Tronco Mesenquimais.....	13
2.3.4 Coleta do tecido adiposo.....	17
2.3.5 Separação da Fração Vascular Estromal.....	17
2.3.6 Cultura das Células-Tronco Mesenquimais.....	18
2.3.7 Caracterização das Células-Tronco Mesenquimais.....	19
2.3.8 Implante celular guiado por imagem do ultrassom.....	22
2.4 AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE REPARAÇÃO.....	23
2.4.1 Avaliação Clínica e Ultrassonográfica.....	23
2.4.2 Avaliação Histopatológica e Imunoistoquímica.....	25
2.5 EXAME ULTRASSONOGRÁFICO POWER DOPPLER.....	26
3. OBJETIVOS.....	27
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	28
4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	29
4.3 ADMINISTRAÇÃO DE COLAGENASE.....	30
4.4 COLETA DO TECIDO ADIPOSO.....	31
4.5 SEPARAÇÃO DA FRAÇÃO VASCULAR ESTROMAL.....	32
4.6 CULTURA DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS.....	34
4.7 CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DAS CTM.....	36

4.8	IMPLANTE CELULAR GUIADO POR IMAGEM DO ULTRASSOM.....	37
4.9	ATIVIDADE FÍSICA.....	38
4.10	ACOMPANHAMENTO FÍSICO E ULTRASSONOGRÁFICO.....	38
4.11	AVALIAÇÃO POR ULTRASSONOGRAFIA POWER DOPPLER.....	39
4.12	BIÓPSIA.....	40
4.13	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA.....	41
4.14	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
5.	RESULTADOS.....	43
5.1	ADMINISTRAÇÃO DE COLAGENASE.....	43
5.2	TÉCNICAS DE ISOLAMENTO DAS CÉLULAS DA FRAÇÃO VASCULAR ESTROMAL.....	44
5.2.1	Coleta do tecido adiposo.....	44
5.2.2	Separação da Fração Vascular Estromal.....	45
5.3	CULTURA DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS.....	46
5.4	CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS.....	46
5.5	IMPLANTE DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS.....	47
5.6	ANÁLISE DO REPARO TENDÍNEO.....	49
5.6.1	Avaliação Clínica.....	49
5.6.2	Análise Ultrassonográfica.....	50
5.6.3	Avaliação por Ultrassonografia Power-Doppler.....	54
5.6.4	Biópsia.....	55
5.6.5	Análise Histopatológica e Imunoistoquímica.....	56
6.	DISCUSSÃO.....	64
6.1	TÉCNICAS DE MANIPULAÇÃO DAS CÉLULAS MESENQUIMAIS.....	64
6.1.1	Coleta do tecido adiposo.....	64
6.1.2	Separação da Fração Vascular Estromal.....	65
6.1.3	Cultura das Células-Tronco Mesenquimais.....	66
6.1.4	Caracterização das Células-Tronco Mesenquimais.....	66
6.1.5	Implante das Células-Tronco Mesenquimais.....	68
6.2	ANÁLISE DO REPARO TENDÍNEO.....	69
6.2.1	Análise Clínica e Ultrassonográfica.....	69
6.2.2	Avaliação por Ultrassonografia Power Doppler.....	73

6.2.3 Análise Histopatológica e Imunoistoquímica.....	74
7. CONCLUSÕES.....	82
8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	83

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.....	30
Esquema do delineamento experimental	
FIGURA 2.....	31
Indução da lesão com colagenase	
FIGURA 3.....	32
Tricotomia da base da cauda	
FIGURA 4.....	32
Coleta do tecido adiposo	
FIGURA 5.....	34
Etapas da separação da fração vascular estromal.	
FIGURA 6.....	36
Cultura celular.	
FIGURA 7.....	38
Implante das células-tronco mesenquimais.	
FIGURA 8.....	44
Aumento de volume observado após 3 dias da aplicação de colagenase.	
FIGURA 9.....	48
Visualização da agulha no interior do TFDS no momento do implante celular (imagem hiperecólica). Imagem feita com aparelho GE LOGIQ 3.	
FIGURA 10.....	49
Escore de claudicação em função de diferentes momentos.	
FIGURA 11.....	50
Circunferência do terço médio da região metacarpiana em função dos diferentes momentos.	

FIGURA 12.....	52
Perfis médios da área do tendão (cm ²) em função dos diferentes momentos.	
FIGURA 13.....	52
Perfis médios da área da lesão (cm ²) em função dos diferentes momentos	
FIGURA 14.....	53
Perfis médios da porcentagem (%) da área da lesão em função dos diferentes momentos.	
FIGURA 15.....	53
Perfis médios do grau da ecogenicidade em função dos diferentes momentos.	
FIGURA 16.....	55
Avaliação por ultrassonografia Power Doppler.	
FIGURA 17.....	56
Biópsia tendínea.	
FIGURA 18.....	57
Tendão sadio (HE 200X).	
FIGURA 19.....	58
Corte histopatológico aos 60 dias (grupo controle).	
FIGURA 20.....	59
Corte histopatológico aos 150 dias (grupo controle).	
FIGURA 21.....	62
Imunoistoquímica aos 60 dias do experimento.	
FIGURA 22.....	63
Imunoistoquímica aos 150 dias do experimento.	

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1.....	19
Fenótipo molecular das células-tronco mesenquimais	
QUADRO 2.....	45
Número de células obtidas, viabilidade celular e número de células viáveis por animal.	
QUADRO 3.....	46
Número de células viáveis nos momentos; P0 (plaqueamento inicial), P1 (primeira passagem), P2 (segunda passagem).	
QUADRO 4.....	47
Caracterização imunofenotípica da superfície das células-tronco mesenquimais durante a primeira passagem (P1) e segunda passagem (P2).	
QUADRO 5.....	60
Medidas dos marcadores colágeno tipo I, colágeno tipo III e VEGF por grupo nos dois momentos da biópsia.	

ANEXOS

ANEXO 1.....	106
Acompanhamento ultrassonográfico do animal 3, corte transversal, aos dias 30, 45, 60, após indução de lesão.	
ANEXO 2.....	107
Acompanhamento ultrassonográfico do animal 3, corte transversal, aos dias 75, 90 e 105 após indução de lesão.	
ANEXO 3.....	108
Acompanhamento ultrassonográfico do animal 3, corte transversal, aos dias 120,135 e 150 após indução de lesão.	
ANEXO 4.....	109
Instruções aos autores artigos científicos.	
ANEXO 5.....	125
Artigo científico enviado para a publicação.	

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. Botucatu, 2009, 134p., dissertação de mestrado, UNESP, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

RESUMO

A lesão do tendão do músculo flexor digital superficial é uma importante causa de claudicação em eqüinos atletas. Embora existam diversos tratamentos descritos, poucos são eficazes na melhora significativa da qualidade da matriz extracelular. Com isso, há um grande potencial de desenvolvimento de recidivas, e em alguns casos até causar o término precoce da carreira atlética do animal. Recentemente, diversos experimentos vêm focando no potencial terapêutico das células-tronco mesenquimais em casos de lesões de difícil cicatrização. O objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade da cicatrização tendínea de animais tratados com o implante autólogo das células-tronco mesenquimais cultivadas derivadas do tecido adiposo, tendo como foco a caracterização das fibras colágenas tipo I e tipo III, via imunoistoquímica, presentes no tecido cicatricial tendíneo. Foi induzida lesão do tendão flexor digital superficial (TFDS) de ambos os membros anteriores de 8 eqüinos, seguida de implante autólogo em apenas um membro de cada animal. Os animais foram avaliados por parâmetros clínicos e ultrassonográficos e após biópsia, realizada em dois diferentes momentos 60^o dia e no 150^o dia do experimento, sendo verificadas características histológicas e imunoistoquímicas. A terapia com implante autólogo das células-tronco mesenquimais acelerou o processo de cicatrização tendínea, melhorou a organização cicatricial, e fazendo uma comparação entre o grupo tratado e o grupo controle houve maior expressão do colágeno tipo I. O procedimento demonstrou ser seguro e viável.

Palavras-chave: eqüino; tendão; célula-tronco mesenquimal; tecido adiposo; terapia.

CARVALHO, A.M. Autologous implant of mesenchymal stem cells adipose derived in the treatment of experimental tendinitis in equine: clinical evaluation, ultrasonography, histopathological and immunohistochemical. Botucatu, 2009, 134p., master dissertation, UNESP, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

ABSTRACT

The injury of the tendon of superficial digital flexor muscle is a major cause of lameness in equine athletes. Although there are various treatments described, few are effective in significant improvement of the quality of the extracellular matrix. Therefore, there is great potential for development of reinjury, and in some cases even cause the early termination of the athletic career of the animal. Recently, several experiments are focusing on therapeutic potential of mesenchymal stem cells in cases of difficult healing. The aim of this study was to evaluate the quality of tendon healing from animals treated with the implantation of autologous mesenchymal stem cells derived from adipose tissue cultured, focusing the characterization of collagen fibers type I and type III, by immunohistochemistry, in the tendinous scar tissue. There was induced injury of the superficial digital flexor tendon (TFDS) in both previous members, 8 horses, followed by autologous implantation in only one member from each animal. The animals were evaluated by clinical parameters and ultrasound and after biopsy, performed at two different times in 60 days and the 150th day of the experiment. Histological and immunohistochemical analyzes were done. The therapy with implantation of autologous mesenchymal stem cells accelerate the process of tendon healing, improved matrix organization with higher expression of collagen type I in the treated group compared with the control group. The procedure has proved safe and feasible.

Keywords: equine; tendon, mesenchymal stem cell; adipose tissue; therapy.

1. INTRODUÇÃO

É indiscutível a importância da tendinite do flexor digital superficial (TFDS) para todos profissionais que trabalham diretamente no mercado eqüestre. Além de comprometer significativamente o desempenho atlético, a enfermidade pode resultar no fim da carreira do animal. Existem vários fatores predisponentes descritos para TFDS, como ferrageamento incorreto, sobrepeso, piso irregular, idade, e principalmente o tipo e intensidade de exercício praticado (ROSS e DYSON, 2003). Todos estes fatores, isolados ou em conjunto, podem resultar em lesão tendínea facilmente observada pela manifestação dos sinais clínicos por meio da claudicação, inflamação, aumento de volume, calor e sensibilidade ao toque.

Através da utilização da ultrassonografia na avaliação de estruturas tendo-ligamentares foi possível uma melhor definição do diagnóstico, caracterizando-se o tipo da lesão e da estrutura afetada, sendo possível instituir um prognóstico mais adequado.

Apesar de existirem vários métodos terapêuticos para o controle desta lesão, ainda não se encontrou um tratamento ideal, culminando em longo período de reabilitação, baixa taxa de sucesso na terapia e grande porcentagem de recidivas. Esta última justificada, em parte, pelo tipo de fibras tendíneas, que após a lesão não retornam ao estado original e conferem assim ao tendão uma menor resistência.

Recentemente, experimentos vêm se concentrando no potencial terapêutico das células-tronco (CT), verificando sua possibilidade de aplicação em enfermidades complexas, ou lesões de difícil cicatrização.

As células-tronco mesenquimais possuem capacidade de auto-replicação, além da habilidade de se diferenciar em fibroblastos, osteoblastos, condrócitos, tenócitos, adipócitos e miofibroblastos, de acordo com o estímulo local. Esta diferenciação ocorre por toda a vida, tornando seu estudo particularmente interessante em lesões do sistema músculo-esquelético.

Apesar do uso constante em pesquisas de células cultivadas, alguns experimentos utilizam a medula óssea total para o tratamento de tendinites, ou ainda o implante da fração mononuclear. Dentre as células mononucleares,

existem as hematopoiéticas, que originarão células do sangue (linfócitos, eosinófilos, basófilos, neutrófilos, células vermelhas e plaquetas) e as mesenquimais, que poderão originar células musculares, hepatócitos, osteócito, tecido adiposo, condrócitos e estroma. O uso de toda a fração mononuclear em tratamentos de lesões ortopédicas possui a vantagem de permitir a realização do implante no momento do diagnóstico, com menor tempo de preparo das células e custo reduzido, além de aumentar a concentração de células-tronco mesenquimais para o implante direto após a coleta de medula óssea.

O conhecimento sobre a reparação tendínea e suas implicações na capacidade atlética do indivíduo acometido pela tendinite vêm estimulando a realização de pesquisas sobre novas terapias aplicadas a este tecido. A terapia celular com células-tronco mesenquimais tem mostrado resultados promissores em diversos trabalhos já publicados. No entanto, apesar de um grande potencial, ainda há necessidade de estudos controlados que confirmem a real contribuição deste método terapêutico na qualidade da matriz tendínea e recuperação da sua função.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ESTRUTURA E FUNÇÃO DOS TENDÕES

Os tendões são associados aos músculos e formam uma continuação da estrutura colágena que suporta as fibras musculares contráteis (GOODSHIP et al., 1994).

O corpo do músculo flexor digital superficial tem origem na porção proximal do epicôndilo medial do úmero, possui fortes inserções tendíneas e progressivamente continua como tendão flexor digital superficial no membro torácico distal. Esse tendão também se origina do ligamento acessório, inserindo na região caudo medial do rádio. O tendão fusionado, com formato arredondado passa distalmente por dentro do canal carpal. Seguindo pelo metacarpo, este fica achatado com um formato de meia lua e em seguida,

posterior ao ligamento intersesamoideo, seu formato fica simétrico sofrendo um espessamento. Na região distal dos ossos sesamóides proximais, o tendão flexor digital superficial fica progressivamente mais fino no plano digital e mais espesso no plano abaxial. Na região distal da falange proximal, o ramo distal do tendão separa-se e torna-se espesso distalmente, em cada lado da quartela. Eles terminam entre os ligamentos palmar axial e abaxial da articulação interfalangeana proximal (DENOIX, 1994, 1996).

Os tendões transferem as forças geradas pela contração do músculo para o movimento do esqueleto, promovem o suporte esquelético e aumentam a eficiência da locomoção através do armazenamento e liberação de energia. Tendões são necessários para suportar forças de alta tensão, possuindo fibras de colágeno arranjadas em um padrão estritamente paralelo.

Os tenócitos são células altamente diferenciadas que têm um potencial limitado para replicação. Fazem parte de uma extensiva rede tridimensional de componentes da matriz extracelular e são constituídos principalmente por colágeno tipo I, tipo III e tipo V, além de proteoglicanos, elastina e fibronectina (VIOLINI et al. 2009).

O tendão é composto de um tecido conjuntivo denso fibroso caracterizado por uma precisa organização de fibroblastos esparsos, fixados em uma matriz extracelular (MEC) rica em colágeno altamente organizado. A complexa hierarquia estrutural permite deformação plástica sobre 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. Uma extensa rede tridimensional de extensão citoplasmática encobre os feixes de fibrilas de colágeno e promove uma forma de comunicação célula-célula e célula-matriz extracelular (DAHLGREN, 2007).

A MEC é composta principalmente pelos seguintes componentes: 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 e WOO 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, 1993 e BIRCH et al., 1998 e VOGEL et al., 1986); e colágeno, que compõe mais de 80% do peso seco do tendão (WOO et al., 2006), sendo 95% colágeno tipo I (RILEY, 2005). O restante do colágeno consiste primariamente no colágeno tipo III com pequenas porções de outros tipos de colágeno (FRANK, 2004).

O colágeno do tipo III é o segundo mais abundante e pode ser encontrado ao redor das fibras do tipo I e no endotendão. Com a idade, é observado um aumento de sua quantidade, especialmente na área central do terço médio da região metacarpiana (GOODSHIP et al., 1994; SMITH e WEBBON, 1996 e ALVES, 1998). Traços de colágeno do tipo II, V e VI foram detectados em tendões normais (GOODSHIP et al., 1994; CRAYCHEE, 1995; SMITH e WEBBON, 1996; ALVES, 1998; CARVALHO et al., 2006).

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

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 sujeitas às forças compressivas e de tensão, sendo seu aumento observado com a idade (SMITH e WEBBON, 1996).

2.2 FISIOPATOLOGIA DA TENDINITE

A incidência de tendinite e desmíte na população de cavalos de performance é estipulada entre 11% e 46% (DAHLGREN, 2007). A tendinite e a desmíte são as lesões mais comuns dos tecidos moles em cavalos de corrida (WILLIAMS et al., 2001). Ainda é relatado por Rooney e Genovese (1981) que 25% dos casos de tendinite ocorrem precocemente e podem comprometer a carreira do potro com recidivas, ocorrendo até mesmo o afastamento da atividade atlética (GENOVESE et al., 1996).

Um recente estudo epidemiológico em Hong Kong reportou que a tendinite segundo o relato de veterinários é a causa mais comum de aposentadoria em cavalos de corrida (LAM et al., 2007).

Há maior incidência de tendinites em potros machos que em fêmeas, as possíveis explicações para este fato são que: os machos possuem maior velocidade, necessidade de tempo maior para condicionamento e conformação; podem existir diferenças entre os sexos no metabolismo das fibras do tendão; resposta dos mecano receptores ao exercício (YOSHIKAWA et al., 2001, 2002).

Em condições fisiológicas normais, o tendão é um tecido pobremente vascularizado com uma baixa densidade de células que exibem atividade mitótica reduzida. Essa é a possível explicação para a cicatrização tendínea ser lenta e, na maioria dos casos, resulte em uma matriz extracelular mecanicamente inferior (VIOLINI et al., 2009).

O tendão flexor digital superficial no cavalo atinge tensão máxima de 16% durante o galope, próximo ao seu limite funcional (STEPHENS et al., 1989). A tensão aferida *in vitro* mostrou, entretanto, que o limite para a falência do TFDS acontece ao redor de 10-20% da tensão (GOODSHIP et al., 1994). Ou seja, o tendão trabalha muito próximo ao seu limite de tolerância, e assim as lesões causadas por hiperextensão do TFDS são comuns nos eqüinos atletas. A lesão pode ocorrer por um episódio abrupto, quando as forças exercidas sobre o tendão ultrapassam o limite de tensão suportado; ou ainda, um acúmulo de pequenas microlesões que enfraquecem todo o tendão ou parte dele e culminam na lesão completa ou em uma porção da estrutura (GOODSHIP e BIRCH, 1996).

A aparência histológica descrita por Webbon, 1978, observada em tendões normais, demonstrou alterações celulares, porém sem apresentação de sinais clínicos. As microlesões observadas nos tendões dos eqüinos podem ocorrer devido ao exercício intenso e constante, se tornando mais freqüentes com o avanço da idade (SMITH et al., 2002b). Wilson e Goodship, 1994, demonstraram que o exercício de alta intensidade eleva a temperatura no interior do tendão, atingindo cerca de 45°C. É possível que esse aumento na temperatura local influencie na formação das microlesões, porém, não resultando necessariamente em morte celular. Uma das possibilidades é a de

que a ocorrência de repetidos quadros de hipertermia local comprometa o metabolismo dos tenócitos e/ou cause danos à MEC, levando à degeneração tendínea (BIRCH et al., 1997).

Outros possíveis fatores seriam o pobre fluxo sanguíneo na área tendínea, que durante a sobrecarga constante sofrida pelo membro durante o exercício pode gerar uma hipóxia localizada, e assim, uma isquemia tecidual e ou a produção de radicais livres (SMITH e GOODSHIP, 2004).

Os eventos envolvidos na reparação tendínea de eqüinos têm sido estudados através da inoculação intratendínea de colagenase purificada de bactérias que causam destruição das fibras colágenas tendíneas, simulando tendinites de ocorrência natural (WILLIAMS, 1984; SPURLOCK et al., 1989; FOLAND et al., 1992; GIFT et al., 1992; ALVES, 1998; BARREIRA et al., 2008; YAMADA et al., 2009).

O processo de cicatrização tendínea é dividido em três fases; inflamação aguda, proliferação e remodelamento.

Inflamação aguda é a fase da reparação que tem início imediatamente após a lesão e termina entre uma a duas semanas, dependendo da severidade da lesão e da aplicação de fármacos antiinflamatórios. Histologicamente ocorre o influxo de células responsáveis por uma variedade de eventos necessários para a progressão da cicatrização. Os monócitos e os macrófagos auxiliam no debridamento da matriz extracelular lesada via fagocitose e a produção de fatores vasoativos e quimiotáticos que promovem a angiogênese, estimulam a produção celular e recrutam células adicionais que estão envolvidas no reparo tendíneo. Também há um rápido aumento da expressão gênica de fatores de crescimento e citocinas que participarão dos eventos celulares subsequentes. Os eritrócitos se acumulam no local da lesão como resultado da lesão do endotendão em conjunto com o dano na matriz extracelular (DAHLGREN, 2007). Em um modelo de indução de lesão tendínea com o uso da colagenase, as lesões agudas eram caracterizadas predominantemente pelo acúmulo de células vermelhas dentro da lesão, que é consistente com a formação de hematoma e com características ultrassonográficas hipoecóicas (DAHLGREN et al., 2005).

A fase proliferativa inicia-se quando a resposta celular aguda está diminuindo, poucos dias após o início da lesão e pode perdurar de semanas a

meses. O endotendão sofre uma hipertrofia com o acúmulo de elementos vasculares e celulares. A massa da população celular do endotendão é grande, circular para oval e indiferenciada, sugerindo que essas podem ser células progenitoras que podem ter migrado para a área lesada em resposta aos fatores quimiotáticos produzidos imediatamente após a lesão. A potencial fonte dessas células progenitoras deve ser os vasos sanguíneos (DAHLGREN et al., 2007).

A fase proliferativa tem seu auge com aproximadamente quatro semanas após a lesão, com o número celular elevado no tecido cicatricial por até 24 semanas após a lesão. A produção de matriz extracelular aumenta rapidamente após a lesão. A expressão gênica de colágeno tipo I e colágeno tipo III também tem um aumento repentino e abrupto após a lesão (ERIKSEN et al., 2002; CLEGG et al., 2007). Nas quatro semanas iniciais após a lesão, o colágeno tipo III aumenta para aproximadamente 66% do colágeno total de um tendão normal. Com oito semanas, o colágeno tipo I volta novamente ao patamar de 90% do total de colágeno (DAHLGREN et al., 2002; DAHLGREN et al., 2005). Com aproximadamente quatro semanas após o início da tendinite, a lesão é preenchida com tecido fibroso imaturo, semelhante ao tecido de granulação. Nesse estágio, a matriz extracelular apresenta uma propriedade mecânica inadequada para suportar qualquer tipo de exercício físico (DAHLGREN, 2007).

Oito semanas após a lesão com colágenase, o tendão ainda demonstra um padrão de reparo desorganizado, entretanto a deposição de matriz intercelular é mais proeminente. Porém, o arranjo casual celular e das fibras ainda não apresenta semelhança à estrutura bem organizada do tendão normal (WILLIAMS et al., 1984).

Com 20 semanas, o tendão continua mole e gelatinoso. O tecido cicatricial é caracterizado por hipercelularidade e intensa vascularização com os fibroblastos contendo núcleo redondo a levemente alongado, parcialmente organizado entre as fibras de colágeno. O endotendão é hipercelular com abundante vascularização menos organizada e mais espessa que o endotendão normal. O arranjo paralelo e longitudinal das fibras é parcial (MARXEN et al., 2003).

A fase de remodelamento inicia-se aproximadamente com seis semanas após a lesão e estende por seis a doze meses ou até mais tempo. As fibras de colágeno ficam alinhadas em modo paralelo ao longo da força de tensão. A ligação cruzada entre as moléculas de colágeno apresenta um aumento exponencial na força de tensão, com o aumento do tempo a ligação cruzada estas ligações cruzadas ficam maduras e se tornam cada vez mais fortes (DAHLGREN, 2007).

2.3 TRATAMENTO DAS TENDINITES

Com o progressivo conhecimento adquirido sobre a biologia básica dos tendões e com o auxílio da ultrassonografia, que permite um diagnóstico mais adequado das lesões, diversas pesquisas têm testado a eficácia das terapias aplicadas à tendinite. 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 próximos ao original, reduzindo o índice de recidivas e diminuindo os prejuízos (GAUGHAN, 1998; OIKAWA e KASASHIMA, 2002).

2.3.1 Tratamentos Convencionais

A terapia com antiinflamatórios não esteróides (AINE) é recomendada durante os primeiros dez dias após o início da lesão e seu uso é de extrema importância para a redução do dano tecidual. Os AINE tópicos, como o diclofenaco sódico, podem ser úteis como adjuvantes da terapia sistêmica e reduzem os riscos dos efeitos tóxicos dos AINE sistêmicos (DAHLGREN, 2008).

A administração de AINE como a fenilbutazona é indicada até a fase subaguda. O flunixin meglumine, ou o meloxicam (VERONESI et al., 2006) podem ser utilizados nos primeiros dias após a lesão, pois possuem ação

rápida (BRAMLAGE, 1998; GENOVESE, 1998; GAUGHAN, 1998). Apesar do benefício destes fármacos, o uso prolongado deve ser evitado, pois possuem potencial de indução de úlceras gástricas, lesões renais e demais efeitos colaterais (HENNINGER, 1992). Estes fármacos possuem ação inibidora da prostaglandina sintetase (ciclo-oxigenase) em tecidos inflamados, reduzindo os sinais clínicos da inflamação (NELL et al., 2002).

A área afetada deve receber um penso temporário, que, ao promover uma compressão uniforme, minimiza o edema, além de diminuir ou neutralizar as forças biomecânicas da estrutura afetada (GAUGHAN et al., 1998; REEF, 1998). A bandagem pode ser trocada diariamente ou a cada vez que for ser realizada a aplicação da terapia a frio (DALGREN, 2008).

Tratamentos convencionais que envolvem longos períodos de repouso aliado a um regime de exercícios controlados resultam em um melhor retorno à forma quando comparado a animais que são simplesmente soltos a pasto (GILLIS, 1997). A atividade física é importante na fase de maturação, pois a tensão aplicada corretamente às fibras tendíneas contribui para a produção e orientação das fibras colágenas. Assim, recomenda-se que, após a lesão, o animal seja confinado por um curto período de tempo, a fim de prevenir o aumento da lesão ou envolvimento de outras estruturas (REEDING, 1992; ALVES et al., 1998; GAUGHAN, 1998).

A aplicação tópica de frio deve ser realizada intensamente na fase inicial através de gelo, ducha ou massagens frias, com o objetivo de reduzir a resposta inflamatória inicial (GAUGHAN et al., 1998; REEF, 2001), sendo realizada diversas vezes ao dia, com duração de 20-30 minutos em cada aplicação. Atualmente existe um aparelho que promove a compressão cíclica em conjunto com a circulação de água gelada para maximizar a eficácia do tratamento (<http://www.gamereadyequine.com/>). A compressão cíclica estimula a drenagem linfática e auxilia a dirigir o frio em tecidos mais profundos (DAHLGREN, 2008).

Outras técnicas de fisioterapia como ultrassom e laserterapia são também utilizadas, embora possuam resultados comprovados cientificamente em humanos e animais de laboratório, mas não na espécie eqüina.

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, Dyson (1997) contraria esta idéia ao mostrar que nenhum destes tratamentos trouxe maiores benefícios do que a abordagem conservativa.

Manipulações farmacológicas do processo cicatricial vêm sendo testados com o uso de fatores de crescimento e fumarato de beta-aminopropionitrilo fumarato (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 das ligações no estágio inicial da cicatrização (30-90 dias), permitiria uma melhor organização da deposição do colágeno, aliado ao exercício (GENOVESE, 1992; REEF et al, 1997; ALVES, 1998; ALVES et al., 2001a; ALVES et al., 2001b). Porém, apenas 45-50% dos animais tratados com FBAPN retornaram a atividade atlética de máxima intensidade (REEF et al, 1996; REEF et al, 1997), o que questiona a eficácia do uso de FBAPN no tratamento de tendinites em eqüinos. Atualmente, este medicamento não se encontra disponível no mercado.

Vários estudos preliminares sugerem que a administração de fatores de crescimento exógenos em um tendão lesado pode melhorar a cicatrização e o reparo tendíneo (DAHLGREN et al., 2002; RODEO et al., 2007; THOMOPOULOS et al., 2007). Experimentos com infiltração intralesional com fatores de crescimento (TGF- β e IGF-1) na terapia tendínea têm apresentado resultados promissores, entretanto há dificuldade no estabelecimento da dose (ASPENBERG e FORSLUND, 1999). Uma possibilidade de introduzir uma concentração variada de fatores de crescimento na área tendínea lesada é através da injeção de plasma rico em plaquetas (PRP) (ANDRES et al., 2008; MAIA, 2008).

Existem evidências que a terapia por ondas de choque extracorpóreo (*shock wave*) estimula a liberação de fatores de crescimento que podem promover a cicatrização do tendão. Em um estudo realizado com ratos, pode ser observado o aumento da proliferação de tenócitos e o aumento da expressão de fatores de crescimento (TGF- β e IGF-1) após a terapia com as ondas de choque extracorpóreo (CHEN et al., 2004). Um estudo semelhante realizado na espécie eqüina também mostrou o aumento de fatores de crescimento (CAMINOTO et al., 2005).

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

Alguns dos objetivos para o desenvolvimento de um tratamento efetivo nas tendinites visam à redução da formação de tecido cicatricial, bem como promover a regeneração de tenócitos normais e da matriz extracelular (MEC), de forma a restabelecer a resistência e funcionalidade normal do tendão lesado, reduzindo os riscos de recidiva.

2.3.2 Células-Tronco

Também conhecidas como células-mãe ou células estaminais, são células que possuem a capacidade de se dividir dando origem à células semelhantes às progenitoras e de se diferenciar em outros tipos celulares. As células-tronco podem ser classificadas quanto ao grau de diferenciação:

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 - são capazes de originar aos mais de 250 tipos diferentes de tecidos de um indivíduo adulto, ou seja, capazes de originar 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: célula-tronco

mesenquimal da medula óssea que pode ser diferenciada em células ósseas, músculo e cartilagem.

O uso potencial das células-tronco embrionárias (pluripotentes) para certas doenças e terapias celulares é enorme, porém, envolve diversas questões éticas, principalmente em relação ao embrião humano, e seu uso tem sido associado com a formação de tumores (WAKITANI et al., 2003), mais especificamente, o teratoma. Também há evidência da indução de tumores (sarcoma) pelas células-tronco mesenquimais implantadas junto de *bioscaffold* em camundongo (TASSO et al., 2009), por isso é necessário um maior número de investigações à fim de evitar essa ocorrência. O fato de a célula-tronco adulta ou do cordão umbilical poder causar a formação de teratomas, ou outros tipos de tecidos indesejados é pouco estudado, entretanto esta possibilidade deve ser considerada caso seja utilizada a terapia com células-tronco (KOCH et al., 2009).

Recentemente foram desenvolvidas as células-tronco de pluripotência induzida (iPS, na sigla em inglês), que são células do organismo adulto que foram reprogramadas geneticamente para se comportar como células pluripotentes, idênticas às células-tronco embrionárias, com capacidade para se transformar em todo tipo de tecido. A técnica consiste na reprogramação das células adultas usando um vírus, como cavalo-de-tróia, para inserir nas células adultas quatro fragmentos de DNA capazes de ativar genes normalmente funcionais em células-embrionárias (GUIMARÃES, 2009).

A exploração da diferenciação das células-tronco como terapêutica é feita sob forma de implante celular, ou na bioengenharia voltada para transplantes. Este novo campo de conhecimento é chamado de Medicina Regenerativa (LEVENBERG et al., 2003).

Engenharia tecidual é o uso de células, fatores biológicos e biomateriais, sozinho ou em combinação, com o objetivo de restaurar a função e a estrutura do tecido normal. Biofatores são utilizados indiretamente na medicina eqüina, como nos casos da combinação das células-tronco com o plasma rico em plaquetas, sobrenadante da medula óssea, ou soro autólogo (KOCH et al., 2009).

Com o advento da terapia celular, vários grupos de pesquisadores ao redor do mundo têm estudado o seu uso terapêutico em diversas doenças

ortopédicas na espécie eqüina, como por exemplo, tendinites, desmites, doenças articulares e fraturas ósseas. O uso de células-tronco mononucleares (BARREIRA, 2005; BARREIRA et al., 2008; OLIVEIRA, 2008) e mesenquimais no tratamento de lesões tendíneas e ligamentares vem sendo explorado (YOUNG et al., 1998; HERTHEL, 2001; SMITH et al., 2003; HERTHEL, 2001; 2002; ROSENBROCK et al., 2004; CROVACE et al., 2007; RICHARDSON et al., 2007; SUTTER, 2007; FORTIER e SMITH, 2008; NIXON et al., 2008). A engenharia tecidual e o uso das células-tronco mesenquimais em lesões músculo esqueléticas tem mostrado resultados promissores.

Atualmente, há estudos do emprego da terapia celular para casos de infarto do miocárdio, diabetes tipo I, lesão da medula espinhal, enfermidades pulmonares, tratamento de leucemias, doenças renais, reconstituição do tecido epitelial, fraturas com grandes perdas ósseas, disfunção muscular, na recuperação da cartilagem, tendinite e desmíte (SCHÄFFLER & BÜCHLER, 2007).

As células-tronco adultas podem manifestar uma resposta regenerativa através da diferenciação em células maduras no tecido nas quais essas foram implantadas e produzindo um tecido apropriado de matriz extracelular (MEC). Elas também contribuem na cicatrização através da produção de proteínas bioativas (fatores de crescimento e citocinas) que exerce um efeito de sinalização local através do recrutamento das células-tronco endógenas e induzindo efeitos anabólicos nas células recém recrutadas e nas células maduras tecido-específico já presentes no tecido. O potencial de diferenciação celular, produção de fatores de crescimento, e o recrutamento celular têm feito da tecnologia das células-tronco um dos tópicos mais discutidos da atualidade (DAHLGREN, 2008).

2.3.3 Células-Tronco Mesenquimais

Durante os últimos anos na medicina veterinária houve um aumento no interesse em entender a biologia das células-tronco mesenquimais. Esse interesse vem do seu potencial uso terapêutico, especialmente quanto ao

reparo de feridas, engenharia tecidual e aplicação no campo terapêutico, incluindo a cirurgia regenerativa (VIOLINI et al., 2009).

As fontes utilizadas com finalidade terapêutica de células-tronco mesenquimais na espécie eqüina são a medula óssea e o tecido adiposo, embora também já tenha sido realizado o isolamento dessas células do sangue (KOERNER et al., 2006), sangue da veia umbilical (KOCH et al., 2007) e da veia do cordão umbilical (REED et al., 2008). Em humanos e em outras espécies as células-tronco mesenquimais também já foram isoladas do músculo (WILLIAM et al. 1999), osso trabecular (NOTH et al., 2002), cérebro (VESCOVI et al., 2001) e membrana sinovial (DE BARI et al., 2001).

Já existem dados científicos que confirmam que as células-tronco mesenquimais liberam diversos fatores de crescimento no local implantado, dentre eles o VEGF (*vascular endothelial growth factor*), HGF (*hepatocyte growth factor*) e IGF-1 (*insulin-like growth factor I*) (WANG et al. 2006). Também já foi descrito que estas células promovem imunomodulação (LE BLANC et al. 2006), entretanto ainda não foi provado que as células-tronco mesenquimais sofram uma diferenciação *in vivo*, transformando-se em células idênticas às células do local implantado.

A punção da medula óssea é a forma tradicional pela qual se obtém as células-tronco mesenquimais, e é realizada preferencialmente na 5^a esternébra nos eqüinos. O material aspirado é bastante heterogêneo e contém uma grande diversidade de células, incluindo células maduras do sangue, linfócitos, fragmentos de estroma e gordura, além das células-tronco hematopoiéticas e células-tronco mesenquimais. A suspensão celular pode ser transfundida para o receptor sem processamento adicional (apenas filtração para eliminar fragmentos maiores), ou pode-se proceder a vários outros fracionamentos: separação das células CD34+, expurgo de linfócitos T, centrifugação em gradiente de hipaque para obtenção de uma camada de células mononucleares (células precursoras, linfócitos e monócitos) (ZAGO et al. 2006).

O processo de isolamento e cultura das células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea envolve uma fase inicial de separação das células mononucleares em gradiente de densidade, seguida de plaqueamento. Em cultura, as células-tronco mesenquimais apresentam uma característica fibroblastóide, são aderentes a placa de cultura e capazes de se propagarem

por mais de 15 passagens sem sinal de senescência. Neste período, as células não aderentes, incluindo as hematopoiéticas são descartadas, resultando em uma cultura relativamente homogênea de CTM em diferentes graus de maturação (ZAGO et al. 2006).

A célula-tronco mesenquimal possui potencial limitado (multipotente), podendo se diferenciar em apenas algumas linhagens celulares, como osteoblastos (osso), condrócitos (cartilagem), tenócitos (tendão e ligamento), fibroblastos (tecido cicatricial), adipócitos (gordura) e miofibroblastos, dependendo de certas influências como condições de crescimento, vascularização e oxigenação tecidual, sinais celulares adjacentes e forças mecânicas (FORTIER et al. 1998).

As células-tronco mesenquimais representam uma pequena fração da população total de células nucleadas de origem medular. Alguns estudos sugerem que 0,001-0,01% das células mononucleares separadas através do uso de hipaque são células mesenquimais. Ainda, em cultivo celular, as células mesenquimais se aderem ao fundo dos frascos, e se multiplicam em poucos dias. Em eqüinos com menos de 5 anos de idade, $1-2 \times 10^5$ células aderentes podem ser obtidas de 10ml de aspirado de medula óssea após 3 dias de cultura (FORTIER et al. 2005).

Outro aspecto importante desta célula-tronco adulta é a sua possibilidade de realização de implantes autólogos (SCHÄFFLER et al. 2007). Desta forma, evitam-se complicações como a transmissão de doenças do doador para o receptor, e também reduz-se a possibilidade de rejeição imune. Entretanto, os efeitos de imunomodulação das células-tronco mesenquimais em resposta aos transplantes alogênicos em modelos clínicos e experimentais sugerem que estas células têm um importante papel nesta função. O mecanismo exato de como as células-tronco mesenquimais são toleradas é pouco compreendido. Experimentos mostram que as células-tronco mesenquimais podem suprimir as reações mistas de linfócito em cultura, sugerindo que essas células possibilitam a aplicação alogênica de medula óssea para o reparo tecidual devido a sua imunossupressão (LE BLANK et al. 2006).

Atualmente há três técnicas disponíveis para o tratamento de lesões tendíneas e de ligamentos com células-tronco mesenquimais derivadas da

medula óssea na espécie eqüina (FORTIER et al. 2008): aspirado medular total, realiza a injeção direta da população celular heterogênea contida no aspirado da medula óssea; fração mononuclear, faz a centrifugação em um processo similar aquele usado para a obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP), com o objetivo de aumentar o número de células-tronco em cada injeção; células-tronco mesenquimais cultivadas, realiza a cultura celular com a população derivada da medula óssea.

As células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo de humano e camundongo têm a capacidade de se diferenciar sobre apropriadas condições de cultura, usando específicos hormônios e fatores de crescimento em linhagens do tecido mesodermal, como músculo esquelético, osso, tendão, cartilagem e gordura (SCHÄFFLER et al. 2007).

O conhecimento do reparo da tendinite aguda e subaguda através do uso da fração vascular do tecido adiposo ou do uso das células-tronco mesenquimais cultivadas é pouco compreendido (NIXON et al., 2008), sendo publicado até o atual momento somente um trabalho com o uso das células nucleadas concentradas derivadas do tecido adiposo para a terapia da tendinite aguda (NIXON et al., 2008).

Há duas empresas pioneiras no mundo, que desde o ano de 2002 oferecem serviços para a espécie eqüina: *VetStem*, é uma empresa americana que isola a fração vascular estromal do tecido adiposo (contendo as células-tronco mesenquimais); a *VetCell BioScience Limited* é uma empresa britânica que isola as células mononucleares da medula óssea e posteriormente faz o cultivo celular com o intuito de selecionar e replicar as células-tronco mesenquimais que em condições de cultura têm como característica a aderência ao plástico.

2.3.4 Coleta do tecido adiposo

O tecido adiposo pode ser coletado em diversos locais na espécie eqüina, como a base da cauda próxima ao músculo semitendinoso, região lateral e dorsal da porção medial do pescoço (MAMBELLI et al., 2009). Nixon e colaboradores (2008) também citam a possibilidade da coleta do tecido adiposo na região inguinal. Em um estudo realizado em humanos foram feitas análises de viabilidade celular da fração vascular estromal entre os diferentes procedimentos cirúrgicos disponíveis para a coleta do tecido adiposo (ressecção cirúrgica, lipossucção e lipossucção assistida por ultrassom) e diferentes locais anatômicos, não sendo observada nenhuma diferença quanto à viabilidade celular (OEDAYRAJSINGH-VARMA et al., 2006).

2.3.5 Separação da Fração Vascular Estromal

A fração vascular estromal (contendo as células-tronco mesenquimais) derivada do tecido adiposo pode ser rapidamente isolada através da digestão enzimática pela colagenase (GIMBLE et al, 2003).

O tecido adiposo é derivado do folheto germinativo mesodermal, similar à medula óssea, e contém um estroma de suporte que pode ser facilmente isolado (GRONTHOS et al. 2001). Essa fração estromal do tecido adiposo consiste em uma mistura heterogênea de células, incluindo células endoteliais, células do músculo liso, células mesenquimais, fibroblastos, mastócitos e pré-adipócitos (ZUK et al. 2001). Em adição, assim como na medula óssea, a fração vascular estromal do tecido adiposo contém uma população de células-tronco mesenquimais multipotentes derivadas do tecido adiposo (GRONTHOS et al 2001).

O lipoaspirado tem um rendimento superior de células estromais que o aspirado medular. Isso pode ser explicado pelo alto suprimento de sangue e alta densidade de vasos sanguíneos (ROMANOV et al. 2005).

2.3.6 Cultura das Células-Tronco Mesenquimais

O uso clínico atual do tecido adiposo como fonte de células-tronco dispensa o uso da cultura celular devido à maior concentração de células-tronco mesenquimais contida na mistura das células da fração vascular estromal. As células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo têm um maior potencial de proliferação quando mantidas em um meio de cultura ideal, chegando a expandir sete vezes mais rápido que as células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea em laboratório (COWAN et al. 2004). Em um experimento realizado com as células-tronco mesenquimais de eqüinos, é observado um tempo de $2,1 \pm 0,9$ dias por duplicação celular nas células-tronco adultas derivadas do tecido adiposo, enquanto nas células derivadas da medula óssea esse tempo é de $5 \pm 1,6$ dias por duplicação celular nas células-tronco derivadas da medula óssea durante a primeira passagem (VIDAL et al. 2006; VIDAL et al. 2007).

A cultura das células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo é semelhante ao descrito na cultura das células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea. Entretanto podem ser observadas diferenças quando são comparadas as duas populações celulares, as células da fração vascular estromal não formam colônias distintas, mas mostram uma distribuição mais uniforme da aderência na placa de cultura (VIDAL et al. 2007).

Fatores como a idade do doador, tipo (tecido adiposo branco ou marrom) e localização (subcutâneo ou tecido adiposo visceral) do tecido adiposo, tipo de procedimento cirúrgico, condições de cultura, exposição ao plástico, densidade celular durante o plaqueamento e as formulações dos meios de cultivo podem influenciar na expansão celular (SCHÄFFLER et al, 2007). Diferentes procedimentos cirúrgicos utilizados para a coleta do tecido adiposo podem afetar o potencial de crescimento em cultura das células-tronco mesenquimais (OEDAYRAJSINGH-VARMA et al, 2006). Também existe uma maior capacidade de aderência e crescimento celular das células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo de doadores jovens (SHI et al, 2005).

2.3.7 Caracterização das Células-Tronco Mesenquimais

A identificação precisa das células-tronco é possível utilizando-se marcadores de superfície que, em conjunto, refletem as características biológicas e funcionais das células de forma geral e permitem também a individualização de um determinado tipo celular. As células-tronco mesenquimais apresentam inúmeros marcadores imunofenotípicos, entretanto estes marcadores não são específicos, ocorrendo em outros tipos celulares (DE BARI et al. 2001). A expressão da superfície das células-tronco mesenquimais com os marcadores estão demonstrados no quadro um (KERN et al. 2006; DE UGARTE et al. 2003).

QUADRO 1: Fenótipo molecular das células-tronco mesenquimais

Marcadores positivos das células-tronco mesenquimais	Marcadores negativos das células-tronco mesenquimais
CD13	CD11c
CD29	CD14
CD44	CD19
CD73	CD31
CD90	CD34
CD105	CD45
CD106	CD56
CD166	CD133
	CD144

O termo CD (*Cluster designation* = denominação de grupamento) é utilizado para denominar anticorpos monoclonais criados em diferentes laboratórios de todo o mundo contra os antígenos leucocitários humanos. O citômetro de fluxo é um aparelho utilizado para a avaliação da emissão da fluorescência das células (FACS – *Fluorescence Activated Cell Sorter*). Alguns

aparelhos são capazes de separar fisicamente as células de acordo com as características citométricas (ROITT, 1999).

Foi criado um critério mínimo para a caracterização da célula-tronco mesenquimal humana (DOMINICI et al. 2006): ser aderente ao plástico quando mantida em condições de cultura; possuir a habilidade de diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica; deve ainda expressar CD 73, CD 90 e CD 105 e não pode expressar os marcadores da linhagem hematopoiética c-kit, CD 14, CD 11b, CD 34, CD 45, CD 19, CD 79 α e antígeno leucocitário humano (HLA)-DR.

A maioria dos marcadores utilizados para a caracterização das células-tronco mesenquimais, ainda não foi desenvolvida especificamente para a espécie eqüina e há evidência de que alguns marcadores disponíveis para outras espécies não apresentam reação cruzada com as células-tronco mesenquimais do cavalo (TAYLOR et al. 2007). Um exemplo desta não reação inter-espécies foi demonstrada em um estudo realizado (MAMBELLI et al. 2009), onde não houve expressão entre o marcador humano CD29 e as células-tronco derivadas do tecido adiposo da espécie eqüina.

As células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo apresentam características fenotípicas parecidas com as células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea. Ambas possuem um potencial de expressão dos marcadores de superfície semelhantes (DEKTER et al. 2005).

Vários estudos mostram expressão semelhante entre os marcadores da superfície celular das células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea e das células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo. Ambas apresentam reação positiva à análise pelo aparelho de citometria de fluxo e pela imunocitoquímica aos seguintes marcadores; CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166, HLA-ABC, vimentina, colágeno tipo I, fibronectina, ASMA (*monoclonal antibodies to smooth muscle α -actin*). E apresentam reação negativa aos seguintes marcadores; CD10, CD14, CD24, CD31, CD34, CD36, CD38, CD45, CD49d, CD117, CD133, SSEA4, HLA-DR (WAGNER et al. 2005, ZUK et al. 2002, KERN et al. 2006).

Em um estudo mais recente foi realizada a comparação da expressão da superfície das proteínas das células-tronco mesenquimais humanas derivadas de diversas fontes (medula óssea, sangue do cordão umbilical e tecido

adiposo), onde pode ser observada a expressão do CD106 em todas as fontes, entretanto, a porcentagem de positividade das células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea foi o dobro se comparada com as células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (KERN et al. 2006). O CD106 é ligado a uma molécula de superfície das células-tronco mesenquimais conhecida como VCAM que é associada com a hematopoiese e a migração celular (LEVESQUE et al. 2001), características que estão mais associadas às células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea que as células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo, sendo esta uma possível explicação para essa diferença na expressão do marcador CD106.

Alguns grupos independentes de pesquisa têm encontrado um perfil de expressão das proteínas da superfície das células-tronco adultas derivadas do tecido adiposo altamente compatível, porém não idênticas (GRONTHOS et al. 2001). Essa discrepância dos resultados pode ser explicada pelos diferentes métodos de isolamento das células, o tempo de cultura celular antes da análise, o uso de anticorpos monoclonais detectando diferentes epítomos da mesma proteína de superfície e aos diferentes graus de sensibilidade utilizados para a análise da citometria de fluxo (GIMBLE et al. 2003).

Comparada com as células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea, as células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo possuem um potencial similar de diferenciação em células e tecidos de origem mesodermal, como adipócitos, cartilagem, osso e músculo esquelético (SCHÄFFLER et al. 2007). Entretanto, existem diferenças no tempo de diferenciação osteogênica entre os dois tipos celulares: as células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea aparentam ter um maior potencial de diferenciação osteogênica quando comparado com as células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo, que pode ser correlacionado com as diferenças de expressão da fosfatase alcalina entre essas duas populações celulares indiferenciadas (VIDAL et al. 2007). Também quanto à diferenciação adipogênica, é observado que as células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo equino apresentam uma forte diferenciação das células em adipócitos (VIDAL et al. 2007). Uma possível explicação para o maior potencial de diferenciação das células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea

é que essa fonte de células-tronco é conhecida há um maior tempo, e por isso tem-se um maior domínio da técnica de diferenciação utilizando essa fonte.

2.3.8 Implante celular guiado por imagem do ultra-som

O melhor momento para a instituição do tratamento e a dose ideal de células-tronco mesenquimais a ser implantada ainda não foram determinados para as diferentes fontes de células-tronco, tipos de lesão e espécies de animais (KOCH et al., 2009), por isso são interessantes novas pesquisas para estabelecer qual é a fonte de células progenitoras mais favoráveis segundo o tipo de lesão. Entretanto sabe-se que o momento ideal para o emprego das células-tronco adultas no tratamento de tendinites em eqüinos é implantar depois da fase inflamatória, mas antes da formação de fibrose no tecido (em torno de 30 dias após o início da lesão), e que o número mínimo de células viáveis que devem ser administradas na área lesada é de 10×10^6 (FORTIER e SMITH, 2008). Oliveira (2008) induziu tendinite com a administração de colagenase em cavalos, e observou que as lesões atingiram a sua máxima definição aos 30 dias após a indução, com imagens anecóicas e hipocóicas na análise ultrassonográfica.

O uso do ultrassom é muito recomendado para assegurar que o produto seja administrado no local desejado com precisão. O procedimento deve contar com o auxílio de um assistente para segurar a probe do ultrassom para a formação de uma imagem nítida enquanto o profissional que realizará a operação possa manusear a seringa e a agulha com as duas mãos durante o implante celular. Recomenda-se o uso de agulhas 21 ou 22 G, pois uma menor agulha pode danificar as células-tronco, e uma agulha maior pode deixar vaziar células ao longo do caminho formado pela injeção. A administração deve ser realizada vagarosamente o suficiente para evitar o desacoplamento entre a seringa e a agulha devido à excessiva pressão. O uso de bandagem estéril logo após o implante celular e sua manutenção durante 24 horas é necessário para o controle do aumento de volume e para a prevenção de contaminação no local injetado (DALGREN, 2008).

2.4 AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE REPARAÇÃO

O processo de cicatrização pode ser acompanhado por métodos não invasivos, como a avaliação clínica e ultrassonográfica; ou invasivos como a biópsia para a realização de exames histopatológico e imunoistoquímico.

2.4.1 Avaliação Clínica e Ultrassonográfica

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

A avaliação clínica também é realizada no animal em movimento, de preferência ao trote ou marcha, para a verificação da presença ou não de claudicação e sua graduação (REEF, 1998).

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

A partir da aplicação da ultrassonografia na avaliação de tendões e ligamentos de eqüinos, diversos artigos foram publicados sobre o exame ultrassonográfico na classificação das lesões, como também o acompanhamento do processo cicatricial (HAUSER e RANTANEN, 1982; SMITH e WEBBON, 1996). O processo de reparo deve ser monitorado através de exames ultrassonográficos repetidos do tendão à fim de evitar atraso na cicatrização durante a reabilitação (DYSON, 2004).

O TFDS possui aparência ultrassonográfica homogênea e ligeiramente menos intensa que o TFDP. No corte longitudinal, a estrutura possui aparência hiperecótica linear. A área tendínea avaliada pelo corte transversal é considerada normal entre $0,60\text{cm}^2$ e $1,20\text{cm}^2$, dependendo da raça (RANTAKEN et al., 1986; GENOVESE et al., 1986; GILLIS et al., 1993; WOOD et al., 1993; WOOD et al., 1994).

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

A tendinite recente e difusa possui aparência complexa, com a alternância de áreas anecóticas e hipocóticas, ocupando toda a área tendínea em determinados cortes transversais, caracterizando a presença de áreas de baixa densidade tecidual existentes na fase aguda e subaguda da inflamação. No corte longitudinal, é observada a presença de ecos curtos e desalinhados. Quanto mais crônica a lesão, mais ecótica a sua aparência, sua ecotextura tende à heterogeneidade, com bordas irregulares, pouco diferenciadas das estruturas vizinhas. No corte longitudinal, estas lesões costumam apresentar fibras irregulares e desalinhadas. Durante o processo cicatricial, podem ser formados pontos de fibrose intratendíneos, representados no ultra-som (US) por focos hiperecóticos (MARR et al., 1993; REEF, 1998).

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

O cálculo da porcentagem de comprometimento das fibras no corte transversal habilita o profissional a comparar com maior precisão a gravidade da lesão inicial com exames posteriores, evidenciando a cicatrização ou a piora da lesão (WHITCOMB, 2004). Em tendinites focais, são classificadas de lesões leves aquelas com envolvimento focal de até 15% das fibras no corte

transversal; moderadas as que atingem de 16 a 25%; e graves, acima de 26% das fibras. No caso de tendinites difusas, o aumento da área tendínea servirá de parâmetro para sua classificação, sendo leves com aumento tendíneo de até 20%; moderadas com 21 a 35%; e graves com mais de 36% de aumento de volume em relação à média fisiológica, ou ao membro contralateral. Com a classificação das lesões é possível determinar de forma mais precisa o prognóstico que acompanha a lesão instalada (GENOVESE et al., 1997).

2.4.2 Avaliação Histopatológica e Imunoistoquímica

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

Muitas técnicas de coloração foram desenvolvidas para a avaliação das fibras colágenas ao microscópio óptico, sendo, em sua maioria, colorações tricrômicas. Embora as fibras colágenas apareçam geralmente bem coradas por estes métodos, também são coradas outras estruturas que contêm colágeno, como as fibras reticulares e as membranas basais. Deste modo, é necessária a análise imunoistoquímica para diferenciar os diferentes tipos de colágeno entre si, e em relação aos demais componentes colágenos (HORTON, 1984; ALVES et al., 2001 a e b).

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

Ainda não se encontram disponíveis no mercado anticorpos específicos para fibras colágenas tipo I e III em eqüinos, estes sendo os principais constituintes do tecido tendíneo sadio e na sua reparação, respectivamente. A sua marcação e diferenciação permitirá avaliar a qualidade do tecido cicatricial

formado. Para a sua identificação, existe a possibilidade de utilização de anticorpos policlonais produzidos em coelhos, aumentando a possibilidade de reação cruzada entre a espécie que o anticorpo se destina e a espécie eqüina. Outra dificuldade encontrada é que o tecido tendíneo é extremamente denso, e as ligações cruzadas existentes em um tendão sadio dificultam a ligação antígeno-anticorpo para que aconteça a reação de imunoistoquímica.

Outro anticorpo policlonal que pode ser utilizados para avaliação da resposta tecidual à injúria é o anticorpo para VEGF (vascular endothelial growth factor/ fator de crescimento endotelial vascular). Está é uma importante proteína sinalizadora envolvida na angiogênese. Sua atividade tem sido estudada em células do endotélio vascular, e também possui efeito em outras células, como na estimulação da migração de macrófagos. *In vitro*, tem sido observada ação de estímulo da mitose de células endoteliais e na migração celular. Outra importante característica é a de aumentar a permeabilidade vascular.

Em um estudo realizado por OLIVEIRA (2008), foi realizada a terapia da tendinite induzida com o implante das células mononucleares derivadas da medula óssea, com posterior biópsia aos 120 dias após a indução da lesão para avaliação imunoistoquímica utilizando os seguintes marcadores; colágeno tipo I, colágeno tipo III e VEGF. Entretanto, só foi possível evidenciar diferença entre os grupos tratados e controles quanto a expressão do colágeno tipo I.

2.5 EXAME ULTRASSONOGRÁFICO POWER DOPPLER

O exame realizado através de ultrassonografia Doppler vem se tornando um método de escolha para a avaliação da vascularização de diversos órgãos, especialmente os densos (ZANETTI et al., 2003). A unidade Doppler utiliza um código de cores para promover medidas de velocidade de fluxo sanguíneo. O exame Color Doppler permite apenas detectar a velocidade média, e possui um limite máximo de velocidade detectável (RISSELDA et al., 2006). A sensibilidade e especificidade da ultrassonografia do Doppler colorido para tendinite patelar em humanos mostrou ser 92% e 100%, respectivamente

(KRISTOFFERSEN et al., 2005). O exame Power Doppler, ao contrário, não fornece dados sobre direção do fluxo ou velocidade, porém é mais sensível a presença e volume de fluxo, independentemente da angulação, e assim possibilita a visualização de pequenos vasos (RISSELDA et al., 2006). Mais recentemente o Power Doppler tem se mostrado útil para o diagnóstico e subseqüentemente para o monitoramento dos efeitos das terapias em humanos. A técnica utilizando o Power Doppler é superior para a detecção e o monitoramento da hiperêmia (aumento da vascularização) nas estruturas inflamadas (BOESEN et al., 2007).

O ultra-som Doppler tem sido importante na identificação de processos inflamatórios em sua fase inicial e mais recentemente tem se tornado mais acessível para o uso na prática veterinária (POZOR e MCDONNEL, 2004).

Foi realizada a avaliação do fluxo sanguíneo através do exame com Power Doppler antes e após o implante de células mononucleares derivadas da medula óssea em um experimento de tendinite induzida em equinos. Observou-se o início do fluxo sanguíneo com 30 dias após a indução da lesão e este pode ser observado por até 120 dias após a indução da lesão, entretanto, o fluxo encontrou-se mais acentuado entre os dias 60 e 90 após a indução da lesão. O fluxo pode ser observado tanto no grupo tratado, quanto no grupo controle, entretanto, pode-se notar uma maior visualização da vascularização nos membros tratados (OLIVEIRA, 2008).

3. OBJETIVOS

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

1- Avaliar a eficácia da utilização do implante autólogo de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo no tratamento da tendinite.

2- Isolar as células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo eqüino e fazer o seu cultivo.

3- Realizar a caracterização imunofenotípica da superfície das células-tronco mesenquimais durante a 1^o e a 2^o passagens utilizando os seguintes marcadores; CD13, CD44 e CD90.

4- Acompanhar o processo de reparação tendínea com exames clínicos, exames ultrassonográfico simples e com power doppler.

5- Avaliar a qualidade do tecido tendíneo neoformado com identificação das fibras colágenas tipo I, III e do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) analisadas via imunistoquímica em dois momentos (60 e 150 dias após a indução da lesão) .

4. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) e no Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), UNESP, campus de Botucatu.

4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

A pesquisa foi aprovada pela Câmara de Ética em Experimentação Animal (parecer número 106/2007). Foram utilizados 08 animais da espécie eqüina, cujos membros anteriores foram distribuídos em dois grupos de oito membros cada (GA e GB) e receberam diferentes tratamentos após indução de tendinite pela aplicação de colagenase¹. Os animais experimentais apresentaram idades entre 2 e 3 anos e meio, sendo todos do sexo feminino, sem raça definida. Todos clinicamente saudáveis, sem alterações no sistema locomotor.

No Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, os animais foram pesados, vermifugados com

febendazol e receberam aplicação tópica de carrapaticida. Os cuidados se iniciaram um mês antes do desenvolvimento do experimento. Os eqüinos foram mantidos em piquetes, sendo 2 animais por piquete, e receberam água, alimento concentrado balanceado e feno de “coast-cross”.

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais foram divididos em dois grupos (A e B) de quatro animais, e receberam os seguintes tratamentos após a indução da tendinite:

GRUPO A: Ambos os membros torácicos receberam uma injeção intra-tendínea de colagenase (1,0ml; 2,5mg/ml), no terço médio da região metacarpiana, nos tendões flexores digitais superficiais. Este grupo foi subdividido em mais dois subgrupos: G1A (membro torácico direito) onde após trinta dias da administração da colagenase, receberam no local da lesão, o implante de CTM derivadas do tecido adiposo diluído em soro; G2A (membro torácico esquerdo) correspondendo a um subgrupo que não recebeu nenhum tipo de tratamento. Os animais de ambos os subgrupos permaneceram confinados em baias individuais e, após trinta dias da terapia com células-tronco (60º dia do experimento), foram submetidos à biópsia tendínea de ambos os membros.

GRUPO B: Também foi realizada a inoculação intra-tendínea de colagenase (1,0ml; 2,5mg/ml), no terço médio da região metacarpiana, nos tendões flexores digitais superficiais de ambos membros anteriores. Este grupo também foi subdividido em dois subgrupos, G1B (membro torácico direito) onde após trinta dias da administração da colagenase, receberam no local da lesão, o implante de CTM derivadas do tecido adiposo diluídas em soro e o G2B (membro torácico esquerdo) correspondendo a um subgrupo controle. Os animais de ambos os subgrupos permaneceram duas semanas confinados em baias individuais, porém após esse período foram submetidos ao esquema de atividade física crescente com duração até o 150º dia. Neste período estes foram avaliados através da ultrassonografia e da doppler-sonografia nos dias

15, 30, 45, 60, 75, 90, 120 e 150 após a indução da lesão e posteriormente foi realizada a biópsia tendínea de ambos os membros.

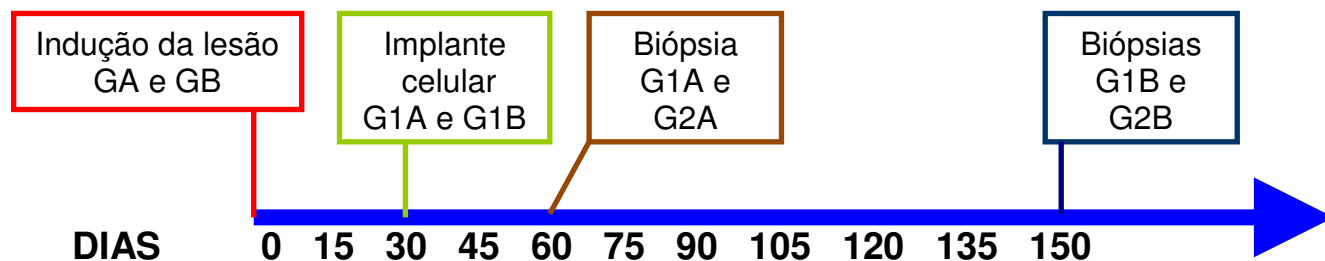


FIGURA 1: Esquema do delineamento experimental.

G1A (grupo tratado); G2A (grupo controle); G1B (grupo tratado); G2B (grupo controle).

4.3 ADMINISTRAÇÃO DE COLAGENASE

A administração de colagenase foi considerada como o início do experimento (dia 0). Todos os oito animais foram submetidos à indução de lesão nos tendões flexores digitais superficiais em ambos os membros anteriores, na região de terço médio do metacarpo. A lesão foi induzida através da administração de 1mL de colagenase¹ na concentração de 2,5mg/mL.

Esta aplicação realizou-se após sedação dos animais com xilazina 10%² (1,1mg/kg) via intravenosa, tricotomia e anti-sepsia da região, e botão anestésico local com 1,5mL de lidocaína 2%³, sem vasoconstritor. A agulha utilizada foi a 30 X 0,80mm (21G), sendo posicionada no local desejado, guiado por ultrassom (GE Logiq 3, probe linear 7,5MHz). Uma seringa de 3mL, contendo 1mL da solução de colagenase, foi então acoplada à agulha e o líquido injetado. Após a indução, os animais foram tratados com fenilbutazona, 2,2mg/kg, IV, uma vez ao dia durante 7 dias. A formação de lesão foi

¹ Colagenase Tipo 1- Sigma-Aldrich C-0130

² Sedazine- Fort Dodge

³ Cristália

acompanhada com exame físico diário (nos primeiros sete dias) e ultrassonográfico no 15^o dia do experimento.



FIGURA 2: Indução da lesão com colagenase.

4.4 COLETA DO TECIDO ADIPOSEO

A coleta do tecido adiposo é realizada na região acima do músculo glúteo dorsal (base da cauda), local utilizado devido à disponibilidade do material, ausência de grandes vasos e fácil acesso. Foi realizado o preparo cirúrgico na base da cauda, com a realização da tricotomia e posterior anti-sepsia. Os animais foram tranqüilizados com xilazina 10% (0.5-1mg/kg intravenoso) e posteriormente foi realizada a infiltração da pele e do tecido subcutâneo com anestésico cloridrato de lidocaína 2%⁴ utilizando um bloqueio em L invertido. Uma incisão de aproximadamente 10cm de comprimento foi realizada paralela e a aproximadamente 15cm abaxial à coluna vertebral, permitindo a visualização de uma camada de tecido adiposo entre a pele e a musculatura. Aproximadamente 5mL de tecido adiposo foi coletado, sendo armazenado em tubo cônico de 50mL, estéril, contendo meio RPMI-1640 de

modo que este ficasse completamente submerso. A sutura da pele foi realizada com um fio de nylon em ponto simples separado. O material foi imediatamente acondicionado em uma caixa térmica com gelo reciclável e encaminhado ao laboratório, sendo então submetido a sucessivas lavagens com tampão fosfato (PBS - v/v) em tubos Falcon® estéreis.



FIGURA 3: Tricotomia da base da cauda.



FIGURA 4: Coleta do tecido adiposo.

4.5 SEPARAÇÃO DA FRAÇÃO VASCULAR ESTROMAL

As amostras foram encaminhadas em caixa térmica ao laboratório de Engenharia Celular no Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu, e manipuladas em fluxo laminar de forma a ser evitada a sua contaminação.

Inicialmente foram realizadas sucessivas lavagens do tecido adiposo em solução salina tamponada a fim de evitar a contaminação com o sangue total previamente contido no tecido coletado. Após esta etapa, o tecido adiposo foi acondicionado em uma placa de petri e levado a balança de precisão para o conhecimento do peso do material coletado.

Realizou-se delicada separação mecânica do tecido adiposo com o auxílio de lâmina de bisturi e pinça anatômica, para promover uma melhor digestão enzimática. Adicionou-se solução de 2mg/ml de colagenase diluída em meio RPMI-1640, utilizando o dobro do volume desta solução para cada miligrama de tecido adiposo coletado.

A placa foi levada a estufa a 37°C com 5% de CO₂ e mantida por 12 horas. Após este período, a solução contendo o tecido adiposo digerido foi transferido para um tubo tipo Falcon®, onde foi adicionado um igual volume a solução previamente digerida de meio de cultura contendo 10% de soro fetal bovino para promover a neutralização da ação enzimática.

Os tubos foram centrifugados por 10 minutos a uma força centrífuga relativa (FCR) de 260g a 15°C, separando o pellet celular contendo as células-tronco mesenquimais.

Após a centrifugação o sobrenadante foi removido cuidadosamente e adicionado o meio RPMI-1640, fez-se a sua homogeneização e foi novamente centrifugado a uma FCR de 260g a 15°C durante 10 minutos para promover a remoção completa da collagenase utilizada para a digestão enzimática.

Novamente removeu-se o sobrenadante, só que neste momento adicionou-se apenas 3ml de meio Knockout DMEM 10% de soro fetal bovino, contendo L-glutamina, aminoácidos essenciais, aminoácidos não essenciais, antibiótico-antimicótico e fez a sua homogeneização. Utiliza um volume de 50 µl da solução e faz a contagem das células mononucleares e o cálculo de viabilidade celular utilizando o método de exclusão por azul de tripan 0,2%, contados em câmara de Neubauer.

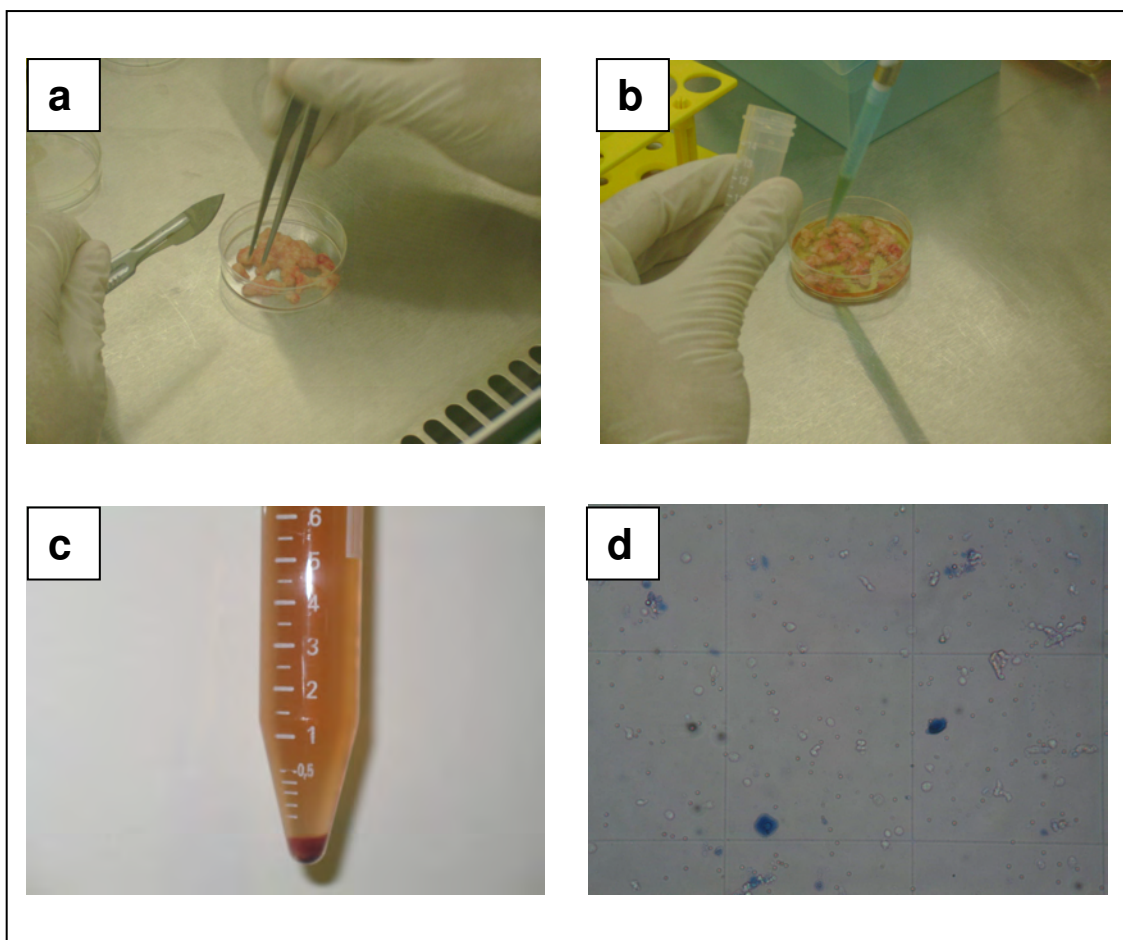


FIGURA 5: Etapas da separação da fração vascular estromal. a) corte do tecido adiposo em pequenos pedaços; b) adicionado a solução de 2mg/ml de colagenase diluída em meio Hepes; c) após 12 horas na estufa, é centrifugado a uma FCR de 260g; d) teste de viabilidade celular com azul de tripan (2%).

4.6 CULTURA DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

As células-tronco mesenquimais tem como característica a aderência ao plástico quando mantidas em condição de cultura, e todas as outras células presentes na fração vascular estromal não apresentam essa característica, por isso, a cultura celular tem como finalidade isolar as células-tronco mesenquimais, tornando a população de células mais homogênea além de expandir o seu número.

As células mononucleares da fração vascular estromal foram plaqueadas (P0) em uma concentração de aproximadamente 10^5 células/cm² e foram mantidas em estufa com ambiente humidificado, a 37°C, 5,0% de CO₂. Com menos de 48 horas já era possível observar as células com características fibroblastóides aderidas a placa de cultura. O meio de cultura era trocado em dias alternados ou quando houvesse alteração da cor do meio de cultura, que era um indicativo da alteração do pH (de cor avermelhada para cor amarelada).

As placas de cultura eram observadas em microscopia óptica em dias alternados, para observar possíveis contaminações e avaliar a sua confluência. Quando a confluência da placa de cultura estava com confluência de 70%, a tripsinização da placa era realizada.

A tripsinização consiste no despregueamento das células-tronco mesenquimais que estão aderidas ao plástico quando mantidas em condições de cultura utilizando tripsina 0,05%. Para a realização desta, aspira-se todo o meio de cultura, seguido da lavagem com PBS e em seguida adiciona a tripsina até completa imersão da superfície da placa de cultura. A placa de cultura foi levada a estufa e mantida por 3 minutos, após este período faz uma inspeção macroscópica para observar se houve o completo despregueamento das células aderidas. Após esta etapa, adiciona o meio de cultura contendo 10% de soro fetal bovino para inativar a ação da tripsina. Com o auxílio de uma pipeta, todo o volume contido na placa de cultura foi aspirado e transferido para um tubo tipo falcon e centrifugado a uma FCR de 260g durante 10 minutos a 15°C. Após a centrifugação, fez-se a lavagem do pellet celular formado com o uso de PBS e novamente o material foi centrifugado em um procedimento idêntico ao anterior descrito. Após a lavagem, o pellet celular foi suspenso em meio de cultura e fez contagem e viabilidade celular com azul de tripan (0,2%). As células-tronco mesenquimais foram plaqueadas novamente (P1) em uma concentração de 10^5 células/cm² e mantidas em cultura até o momento do implante celular.

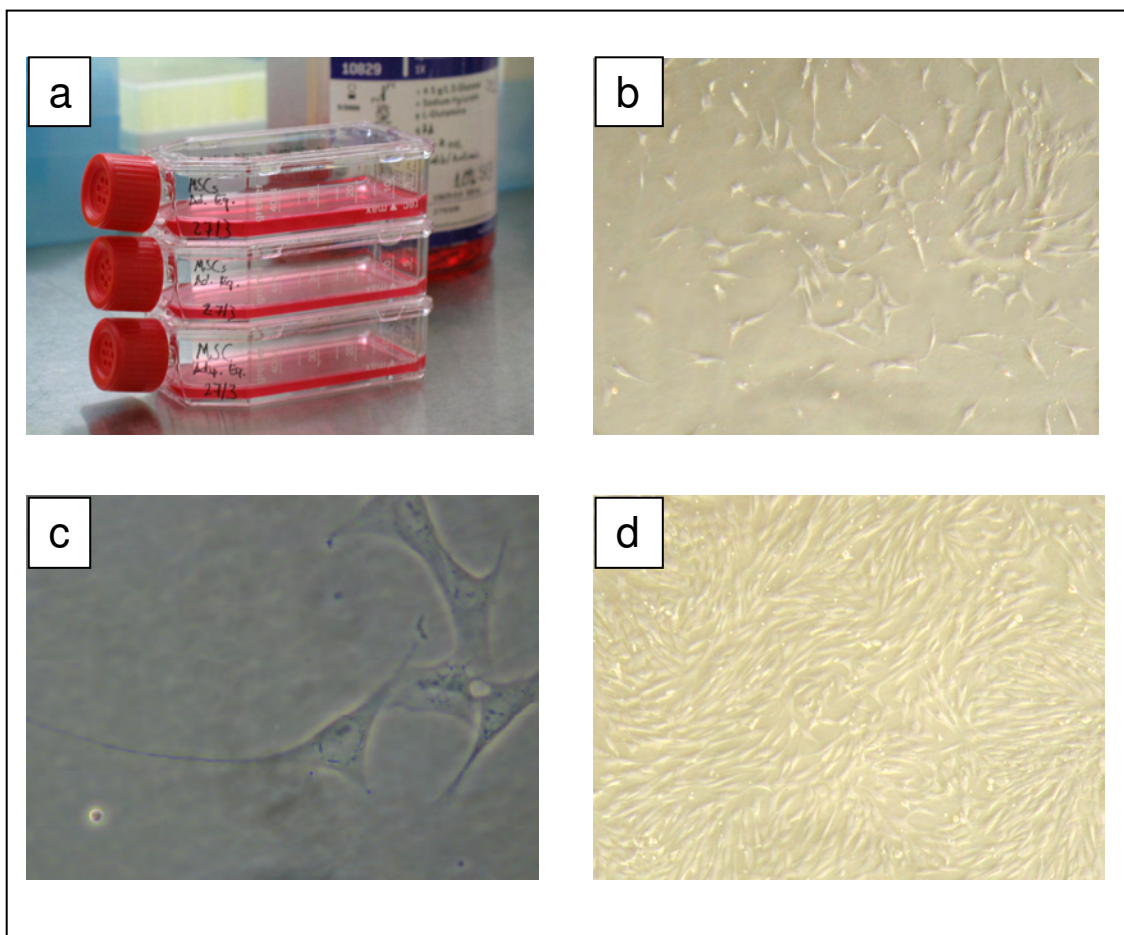


FIGURA 6: Cultura celular. a) plaqueamento das células da fração vascular estromal (células-tronco mesenquimais); b) após 72 horas em cultivo já é possível a visualização das células com adesão no plástico; c) característica fibroblastóide da célula-tronco mesenquimal; d) confluência de 80% da placa de cultivo (tripsinização).

4.7 CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DAS CTM

A caracterização imunofenotípica da superfície das células-tronco mesenquimais foi realizada em dois momentos, durante a primeira e segunda passagem (P1 e P2) utilizando o aparelho de citometria de fluxo (FACSCalibur). Para a realização deste, removeu-se uma amostra de 30×10^4 células para cada teste realizado e utilizou-se os seguintes marcadores; *mouse anti-rat* CD90 FITC (isotiocianato de fluoresceína), *mouse anti-horse* CD13, *mouse anti-horse* CD44. Os marcadores CD13 e CD44 são específicos da

espécie equina, já o marcador CD90 é específico de uma espécie distinta ao cavalo, por isso foi observado se houve a reação inter-espécie. Os marcadores específicos, necessitam de um marcador secundário para a sua análise, para isso foi utilizado o marcador *goat anti-mouse* IgG-FITC.

Para o controle negativo dos marcadores utilizados nas amostras foram realizados os seguintes testes para a correta calibração do aparelho de citometria de fluxo: leitura da fluorescência das células e leitura da fluorescência das células adicionadas ao anticorpo secundário (*goat anti-mouse* IgG-FITC).

4.8 IMPLANTE CELULAR GUIADO POR IMAGEM DO ULTRASSOM

O pellet contendo as células-tronco mesenquimais foi acrescido de 0,5mL de soro autólogo e colocado em seringa de 1mL e transportado do laboratório ao local que se encontravam os animais dentro de uma caixa fria, também com gelo reciclável.

Os membros tratados (G1A e G1B) receberam injeção intratendínea das células-tronco mesenquimais, ao 30º dia após a indução da lesão.

Os animais foram submetidos a procedimento semelhante ao descrito para realização de indução de lesão, sendo sedados e o membro preparado com tricotomia, antisepsia e botão anestésico.

Com auxílio de ultra-som, posicionou-se agulha 30 X 0,80mm no centro da lesão, acoplada a seringa contendo as células, e estas injetadas. O procedimento foi realizado com auxílio de aparelho GE LOGIQ 3, do departamento de Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecia (FMVZ) da Unesp de Botucatu.

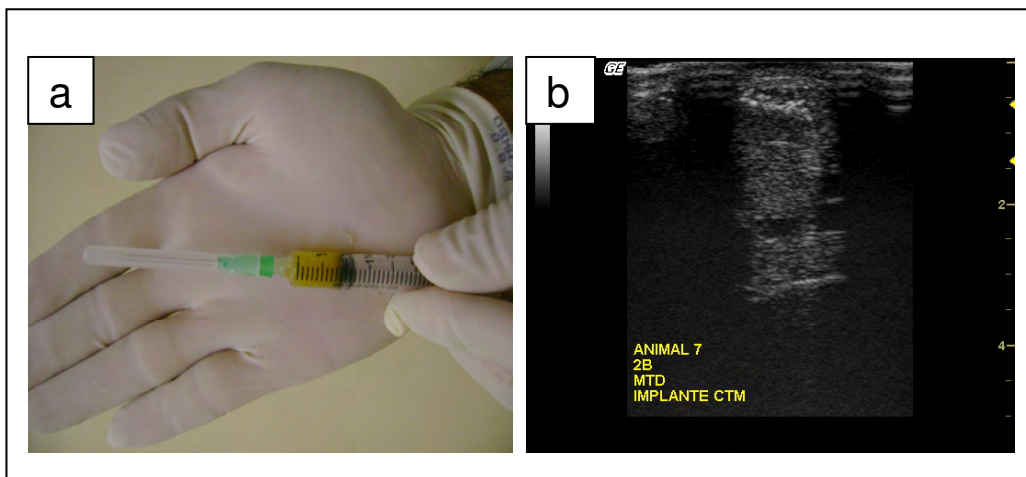


FIGURA 7: Implante das células-tronco mesenquimais. a) seringa contendo as células-tronco dissolvidas em soro autólogo. b) avaliação ultrassonográfica no momento da injeção tendínea com formação de imagem hiperecólica.

4.9 ATIVIDADE FÍSICA

Após o implante celular, os animais foram submetidos a uma atividade física controlada e progressiva, seguindo o esquema a seguir:

- 45^o–60^o dia: andar ao passo, por 15 minutos, uma vez ao dia (GA e GB).
- 61^o–90^o dia: andar ao passo, por 15 minutos, duas vezes ao dia (GB).
- 91^o–120^o dia: andar ao passo, por 30 minutos, uma vez ao dia (GB).
- 121^o–150^o dia: andar ao passo, por 30 minutos, duas vezes ao dia (GB).

4.10 ACOMPANHAMENTO FÍSICO E ULTRASSONOGRÁFICO

Os animais foram acompanhados diariamente durante 1 semana após a indução de lesão, e semanalmente até o momento de realização de biópsia.

Os parâmetros avaliados ao exame físico foram grau de claudicação (escores de 0 a 5) (STASHAK, 2002), presença de sensibilidade (graduado

como 0-ausente, 1-leve, 2-moderado e 3-severo), aumento de temperatura (presente ou ausente), e aumento de volume (sendo medido o perímetro da região lesada, considerado normal no momento anterior à indução).

Procedeu-se ainda o exame ultrassonográfico (com aparelho GE Logiq 3, provido de transdutor linear 7,5 MHz) dos animais nos dias 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135 e 150 para que fossem avaliados:

- tamanho do tendão;
- tamanho da lesão;
- porcentual da área lesada no interior do tendão;
- ecogenicidade da lesão, graduada de 0 a 4, da seguinte forma

(GENOVESE et al.,1986):

- 0 - padrão normal (ecóico)
- 1 - queda de 25% do padrão ecóico (predominantemente ecóico)
- 2 - queda de 50% do padrão ecóico
- 3 - queda de 75% do padrão ecóico (predominantemente anecóico)
- 4 - queda de 100% do padrão ecóico (totalmente anecóico)

As imagens obtidas foram gravadas para posterior comparação entre os diferentes momentos e grupos de animais.

As lesões, apesar de bem visíveis, encontravam-se difusas no tendão e constantemente alteravam sua forma a cada avaliação.

4.11 AVALIAÇÃO POR ULTRASSONOGRAFIA POWER DOPPLER

Exames Power Doppler foram realizados no tendão flexor digital superficial anteriormente à indução da lesão, quando se observou a ausência de sinais, representando a não existência de patologias tendíneas.

Os animais foram acompanhados nos dias 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135 e 150 após a indução de lesão, sendo realizados exames ultrassonográficos Power Doppler (GE Logiq 3, probe linear 7,5MHz), para identificação da existência de vasos, a presença de fluxo sanguíneo e sua localização. A existência de fluxo sanguíneo é notada pela visualização de

focos coloridos na imagem, chamados de sinais, e suas cores representam a direção deste fluxo, se aproximando ou distanciando da probe.

Foi desenvolvida uma escala, com os escores variando de 0 a 3, sendo avaliados os sinais do Power Doppler, considerando a combinação entre a intensidade do sinal e o número de sinais.

4.12 BIÓPSIA

Os animais foram biopsiados em dois momentos, no 60º dia e no 150º dia, sendo retirado um fragmento do tendão flexor digital superficial de até 1cm² no local da lesão. Para este procedimento ser realizado, os animais foram submetidos à anestesia geral, sendo realizada medicação pré-anestésica com acepromazina⁴ (0,5mg/kg) e xilazina 10% (0,5-1,0mg/kg), indução com ketamina⁵ (2,2mg/kg) e diazepam, sendo mantidos com anestesia inalatória com isofluorano⁶. Bloqueio anestésico local foi realizado com 20mL de lidocaína para bloqueio dos nervos mediano, antebraquial cutâneo medial e ulnar.

Optou-se por mantê-los em decúbito lateral direito, permitindo acesso a ambos os membros anteriores. Realizou-se incisão de aproximadamente 5cm de comprimento, tanto em pele como no subcutâneo, divulsionando tecidos e fibroses formadas. O tendão foi então identificado e individualizado com auxílio de uma hemostática. Segundo imagens ultrassonográficas da lesão inicial e marcação prévia da altura da lesão no membro, escolheu-se o local a ser biopsiado, sendo esta realizada com lâmina de bisturi nº 15. O fragmento foi colocado em frasco contendo formalina tamponada 10%, sendo identificados o número e o membro do animal. Procedeu-se a sutura do paratendão e pele com fio nylon 2-0, seguido da realização de bandagem protetora e administração de antiinflamatório não esteroideal (meloxicam, 0,6mg/kg, SID, via oral) por 5 dias. Adicionalmente, durante o período pós-operatório, foram

⁴ Acepran 1%- Univet

⁵ Vetaset- Fort Dodge

⁶ Cristália

realizados curativos diários da ferida cirúrgica, bem como o monitoramento clínico.

4.13 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA

Os fragmentos foram processados no Laboratório de imunoistoquímica do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina e Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista – Campus de Botucatu. O processamento dos fragmentos foram realizados pelos métodos convencionais para inclusão em parafina e obtenção de cortes histopatológicos, corados pelos métodos de Hematoxilina – Eosina (H.E.) e pelo Tricrômio de Masson. A análise histopatológica foi feita por microscopia óptica, sem o prévio conhecimento dos grupos a que pertenciam as lâminas.

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

Para a realização da técnica de imunoistoquímica, novos cortes de 3 micrômetros de espessura foram obtidos dos blocos de parafina, e distendidos em lâminas histológicas Immunoslides (EasyPath). Para a incubação com os anticorpos primários colágenos tipo I e tipo III, 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 1% (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, e 2 lavagens de 5 minutos com TRIS (pH 7,4). Após o bloqueio de peroxidase, seguiu-se o bloqueio de ligações inespecíficas com leite em pó Molico® 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 4°C, utilizando-se anticorpos policlonais anti-bovino para colágeno tipo I⁷ e para colágeno tipo III⁸. As diluições foram 1:2000 e 1:1000 respectivamente. O anticorpo secundário utilizado foi o EnVision⁹, incubado a temperatura ambiente por 1 hora. O material foi então incubado com DAB¹⁰ como cromógeno, com diluição de 1 gota por mililitro. A contra-coloração foi feita com hematoxilina.

Para determinar a expressão dos colágenos nas amostras coletadas dos tendões dos animais do grupo controle e tratado, foram avaliados 5 campos de cada fragmento. Em cada campo foi mensurado o percentual de células marcadas (Figura 21 e 22), com auxílio do programa Leica Qwin 3.0, através do processador de imagens binárias, com realização da detecção das regiões marcadas, realizando sua mensuração, apresentadas em percentual de regiões marcadas por campo.

Também realizou-se imunoistoquímica para VEGF¹¹. O processo iniciou-se com desparafinização, semelhante ao feito para as fibras colágenas, porém a recuperação antigênica foi feita com o uso de calor, através de banho maria, 20 minutos, em solução pré aquecida de TRIS-EDTA (pH 9,0). O bloqueio da peroxidase endógena foi feito de maneira semelhante ao anteriormente citado. O anticorpo primário foi incubado a 4°C, por 18 horas, na diluição 1:25. A incubação do anticorpo secundário foi feita com Advance¹², durante 1 hora, seguido do cromógeno, feito com DAB, e contra-coloração feita com hematoxilina de Meyer. A área de cada corte, com expressão de VEGF foi avaliada com auxílio do programa de análise de imagens Leica Qwin 3.0, avaliando-se cinco campos com maior intensidade de marcação.

Como controle negativo, substituiu-se o anticorpo primário por imunoglobulina da espécie de cada anticorpo primário (imunoglobulina de coelho para os colágenos I e III e imunoglobulina de camundongo para o VEGF). Utilizou-se uma lâmina de tendão de equino, previamente testada,

⁷ NOVOTEC Rabbit anti-bovine type I collagen, #20121

⁸ NOVOTEC Rabbit anti-bovine type III collagen; #20321

⁹ DAKO K4061

¹⁰ DAKO Liquid DAB + Substrate Chromogen System Igual Advance

¹¹ DAKO Monoclonal mouse anti-human; clone VG 1; M7273

¹² DAKO ADVANCETM

como controle positivo para os dois tipos de colágeno e a marcação positiva dos vasos para VEGF foi considerada um controle interno positivo.

4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as variáveis escore de claudicação e grau de lesão foi realizado o Teste de Friedman separadamente para os grupos tratados e controle, ao longo dos momentos de avaliação (HOLLANDER e WOLFE, 1973).

Para as variáveis quantitativas contínuas (Circunferência de tendão, Área do Tendão, Área da Lesão e % da Área da Lesão) realizou-se Análise de Variância para Medidas Repetidas (*Two Way Repeated Measures ANOVA*) com efeitos aleatórios, incorporando a dependência entre as observações ao longo dos momentos observados e entre as observações no mesmo animal (DIGGLE et al., 1994).

Para as características imunoistoquímicas, Colágeno Tipo I, Colágeno Tipo III, foram realizadas duas análises de variâncias, uma para os dados da biópsia aos 60 dias e outra para os da biópsia aos 150 dias. O delineamento foi em blocos casualizados, comparando-se o grupo tratado e grupo controle, com 20 repetições.

5. RESULTADOS

5.1 ADMINISTRAÇÃO DE COLAGENASE

Os animais permitiram a manipulação no momento da indução da lesão com a sua contenção em brete e com o uso de tranqüilizantes. Também foi utilizado o botão anestésico local, para a dessensibilização. Notou-se resistência no momento da injeção intra tendínea da colagenase.

As lesões iniciaram-se difusas e foram se organizando com o passar dos dias.

A necessidade da padronização de lesões para verificação da ação do tratamento em questão, fez com que, em dois animais, fosse decidido induzir novamente a lesão 10 dias após o primeiro procedimento, com a mesma quantidade e concentração de colagenase.



FIGURA 8: Aumento de volume observado após 3 dias da aplicação de colagenase.

5.2 TÉCNICAS DE ISOLAMENTO DAS CÉLULAS DA FRAÇÃO VASCULAR ESTROMAL

5.2.1 Coleta do tecido adiposo

A coleta foi realizada seguindo as instruções de Vidal (2007), a contenção em brete, associada à tranquilização e ao bloqueio anestésico local em L invertido demonstraram-se adequadas para a coleta do tecido adiposo, entretanto devido ao baixo escore corporal de alguns animais, houve dificuldade na obtenção de um maior volume de tecido adiposo.

Após a coleta, os animais foram mantidos em baia e foi realizado diariamente o curativo utilizando Clorexidine 0,5% e repelente até o 10^o dia após a coleta do tecido adiposo, quando foi realizada a retirada dos fios de sutura. Não houve nenhum problema de contaminação ou de cicatrização das

feridas cirúrgicas realizadas durante o experimento. Entretanto, foi necessária a coleta do tecido adiposo de um dos animais utilizados no experimento por três vezes devido à contaminação durante o período de cultura (este animal apresentava alopecia no início do experimento).

Em média obteve-se 1-2 gramas de tecido adiposo coletado da base da cauda de cada animal, sendo este material acondicionado imediatamente dentro de um tubo estéril contendo PBS.

5.2.2 Separação da Fração Vascular Estromal

O número de células obtidas em cada animal, assim como a sua viabilidade (feita pelo teste de exclusão do azul de tripan 0,2%) e o número de células viáveis, estão apresentados na tabela 1.

Em média, observou-se uma viabilidade celular de 84%, com média de 16×10^6 células totais e média de $13,45 \times 10^6$ células viáveis.

QUADRO 2: Número de células obtidas, viabilidade celular e número de células viáveis por animal.

ANIMAL	1	2	3	4	5	6	7	8	MÉDIA
Peso (g)	1,40	1,48	2,81	0,98	1,26	1,62	2,69	2,57	1,85
Nº células ($\times 10^6$)	11,7	17,7	16,8	16,0	13,6	18,6	19,2	14,4	16
Viabilidade celular (%)	74,3	84,7	78,9	86,2	88,0	74,1	92,1	93,7	84
Nº cél. viáveis ($\times 10^6$)	8,7	15,0	13,2	13,8	11,9	13,8	17,7	13,5	13,4

5.3 CULTURA DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

A técnica descrita para a cultura celular mostrou-se viável e os valores do número de células viáveis na primeira e segunda passagem estão apresentados na tabela 2.

Em média, observou-se um número total de células-tronco mesenquimais viáveis de $14,3 \times 10^6$ durante a primeira passagem (P1), e de $40,3 \times 10^6$ durante a segunda passagem (P2).

QUADRO 3: Número de células viáveis nos momentos; P0 (plaqueamento inicial), P1 (primeira passagem), P2 (segunda passagem).

ANIMAL	1	2	3	4	5	6	7	8	MÉDIA
Nº cél. P0 ($\times 10^6$)	8,7	15,0	13,2	13,8	11,9	13,8	17,7	13,5	13,45
Nº cél. P1 ($\times 10^6$)	9,1	15,6	16,2	14,2	13,3	14,5	17,8	14,1	14,35
Nº cél. P2 ($\times 10^6$)	28,2	38,3	52,9	40,3	37,1	10,2*	46,2	39,1	36,53

O animal número 6*, apresentou um baixo valor de número de células no momento do implante (P2), devido a formação de um aglomerado de células que não pode ser dissolvida por completo durante a homogeneização com o uso de pipeta. Portanto, a contagem do número celular e o cálculo da viabilidade celular neste animal, foi prejudicado e certamente havia um maior número de células que o valor demonstrado na tabela anterior.

5.4 CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

A caracterização imunofenotípica das células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo foram realizadas utilizando os marcadores CD13, CD44 e CD90 durante a primeira e a segunda passagem (P1 e P2). Os valores

obtidos durante o teste estão demonstrados na tabela 3 e a média dos valores estão apresentados na tabela 4.

QUADRO 4: Caracterização imunofenotípica da superfície das células-tronco mesenquimais durante a primeira passagem (P1) e segunda passagem (P2).

ANIMAL		1	2	3	4	5	6	7	8	MÉDIA
P1	CD13 (%)	1,36	5,43	9,86	6,25	10,32	3,92	3,68	9,66	6,31
	CD44 (%)	54,44	25,95	59,01	45,21	17,97	19,79	53,64	85,83	45,23
	CD90 (%)	94,32	95,34	93,47	97,24	91,04	93,82	91,08	94,73	95,15
P2	CD13 (%)	4,51	3,48	6,72	7,54	5,96	6,57	9,57	6,06	6,30
	CD44 (%)	40,51	67,76	87,24	74,31	71,93	93,11	80	47,81	70,33
	CD90 (%)	95,22	94,55	93,69	98,53	92,8	96,49	91,44	98,53	95,15

Foi realizada a análise de variância por delineamento inteiramente ao acaso para comparar se há diferença estatística significativa quanto aos marcadores utilizados comparando sua expressão nas diferentes passagens. Houve diferença estatística significativa na expressão somente do CD44, que foi maior na segunda passagem (P2) se comparado a primeira passagem (P1).

5.5 IMPLANTE DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

O implante celular pode ser realizado com sucesso após a contenção dos animais em brete e a sedação seguida do bloqueio anestésico.

Todos os animais tiveram as células implantadas no centro da lesão ou muito próximas a ela.

A realização do implante se mostrou uma técnica simples, e a utilização de aparelho de ultra-som Logiq 3 (GE) permitiu a correta implantação das células no local da lesão por uma maior facilidade de visualização da agulha durante todo o procedimento, inclusive da movimentação da administração das células no interior da lesão. É importante ressaltar a mudança da ecogenicidade da lesão logo após o momento do implante celular, o que provavelmente se deve a maior ecogenicidade produzida pela alta

concentração celular, que a curto prazo pode ser considerada erroneamente uma melhora da lesão.

Também pode ser observado com o auxílio do aparelho de ultrassom Logic 3 (GE) que uma alicota da solução contendo as células-tronco mesenquimais que foi injetada no centro da lesão tendínea, sofreu um retrocesso junto ao canal formado pela própria agulha utilizada durante o implante celular, o que nos levou a concluir que parte do material injetado não se aderiu ao local desejado (centro da lesão), ficando esta porção das células-tronco mesenquimais difusas em áreas adjacentes ao tendão.

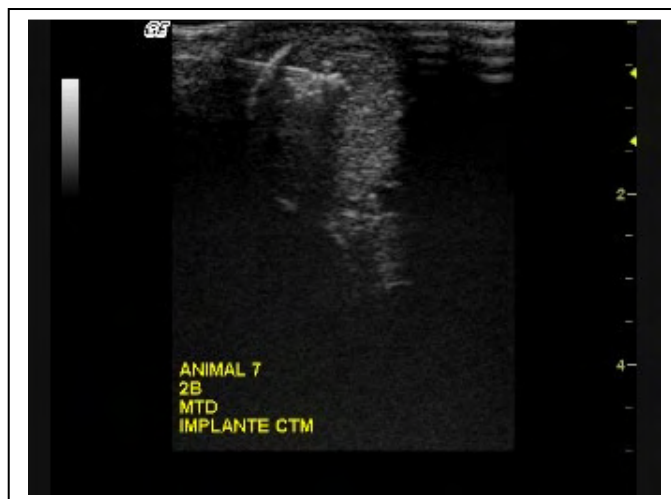


FIGURA 9: Visualização da agulha no interior do TFDS no momento do implante celular (imagem hiperecólica). Imagem feita com aparelho GE LOGIQ 3.

5.6 ANÁLISE DO REPARO TENDÍNEO

5.6.1 Avaliação Clínica

Achados clínicos como o aumento de volume, dor à palpação (sensibilidade) e claudicação estiveram presentes desde a indução da lesão até o momento da biópsia, variando de intensidade entre os grupos.

Todos os parâmetros avaliados mostraram melhora gradativa. O aumento de temperatura local foi o primeiro parâmetro a regredir completamente (ao redor dos 30 dias), ao contrário do aumento de volume, que permaneceu até o momento da biópsia (60 e 150 dias), mesmo que leve. O volume maior (medido como o perímetro do metacarpo na região lesada) foi observado em dois distintos momentos, aos 3 dias após a indução da lesão e aos 75 dias após a indução da lesão (principalmente nos membros tratados), se igualando ao volume dos membros controle no término do experimento. O aumento da circunferência do tendão aos 60 dias após o início do experimento é condizente com o início do programa de atividade física controlada e progressiva.

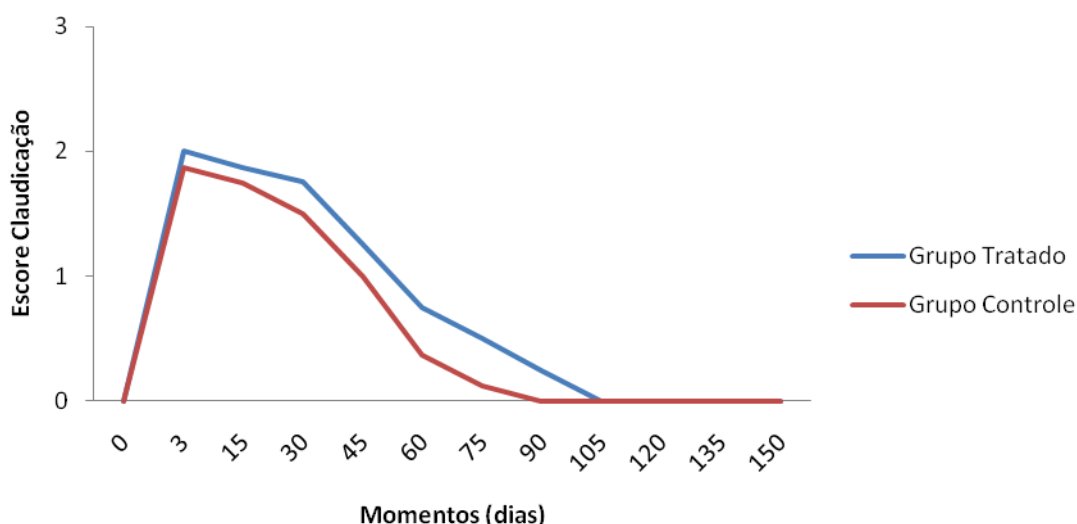


FIGURA 10: Escore de claudicação em função de diferentes momentos.

Quanto a atividade locomotora após administração de colagenase, observou-se claudicação variável, aos 3 dias após a indução da lesão o escore médio dos animais foi de grau 2, o grupo controle obteve um valor médio igual a zero a partir dos 90 dias após a indução da lesão, enquanto o grupo tratado apresentou o escore médio de claudicação igual a zero a partir do 105º dia do experimento. De uma forma geral, o grupo tratado veio apresentando parâmetros muito semelhantes ao grupo controle até o momento de implante celular, entretanto após este momento houve elevação do escore de claudicação e perímetro de canela no grupo tratado em relação ao grupo controle. Não houve diferença significativa entre os perfis médios entre os grupos tratado e controle quando se fez a análise estatística quanto ao escore de claudicação e circunferência de tendão.

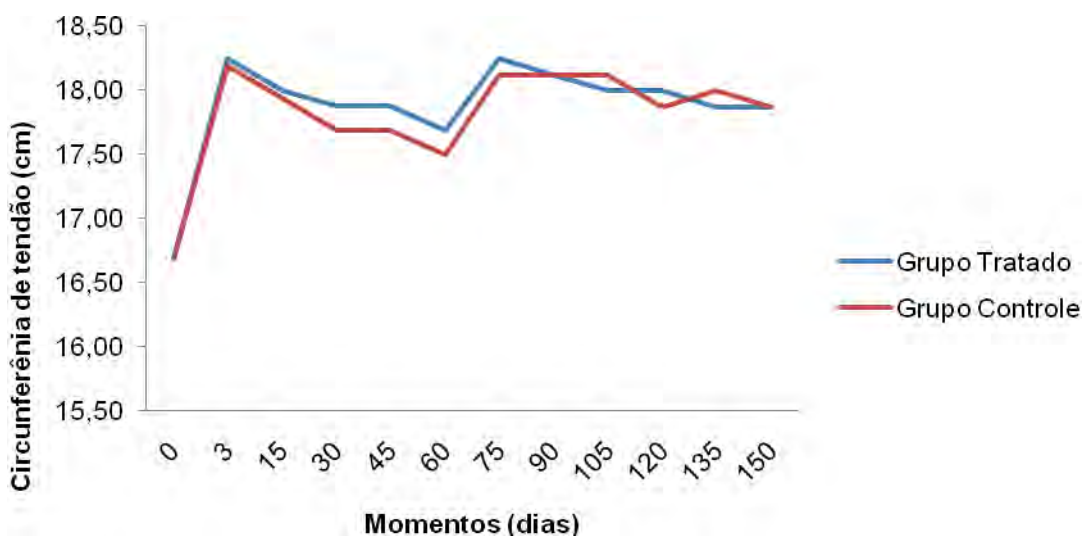


FIGURA 11: Circunferência do terço médio da região metacarpiana em função dos diferentes momentos.

5.6.2 Análise Ultrassonográfica

Os resultados da avaliação ultrassonográfica da lesão, após uma semana da aplicação de colagenase, demonstraram imagem hipocóica na

maioria dos animais, possibilitando sua delimitação e mensuração, mas ainda não completamente definida em sua forma, que variou diversas vezes durante todo o período da pesquisa.

Os resultados obtidos no exame ultrassonográfico demonstraram que os 150 dias de acompanhamento não foram suficientes para que as lesões atingissem a normalidade do padrão ecóico, definida como escore zero.

Não houve diferença significativa entre a área média do tendão, área média da lesão, porcentagem da área da lesão e quanto ao grau da lesão entre os grupos (para todos os momentos). Entretanto, pode ser observado um aumento da área da lesão no grupo tratado a partir dos 45 dias, com o pico aos 75 dias. A análise da porcentagem de comprometimento de fibras, calculada pela relação entre a área lesada e área total do tendão (Figura 14), revelou-se semelhante à situação apresentada em relação à área da lesão. A possível explicação para esse fato, é que o grupo tratado recebeu a administração das células-tronco mesenquimais no 30º dia do experimento, o que possivelmente causou uma inflamação que pode ser nas seguintes avaliações ultrassonográficas.

Ao comparar-se a média de ecogenicidade da lesão dos grupos nos diferentes momentos (Figura 15), observou-se que a média da ecogenicidade da lesão inicial foi a mesma em ambos os grupos, apresentando seu maior valor aos 30 dias e diminuindo na seqüência. O tempo de 150 dias foi insuficiente para que a lesão atingisse padrão ecóico normal tanto nos membros tratados quanto nos membros controles.

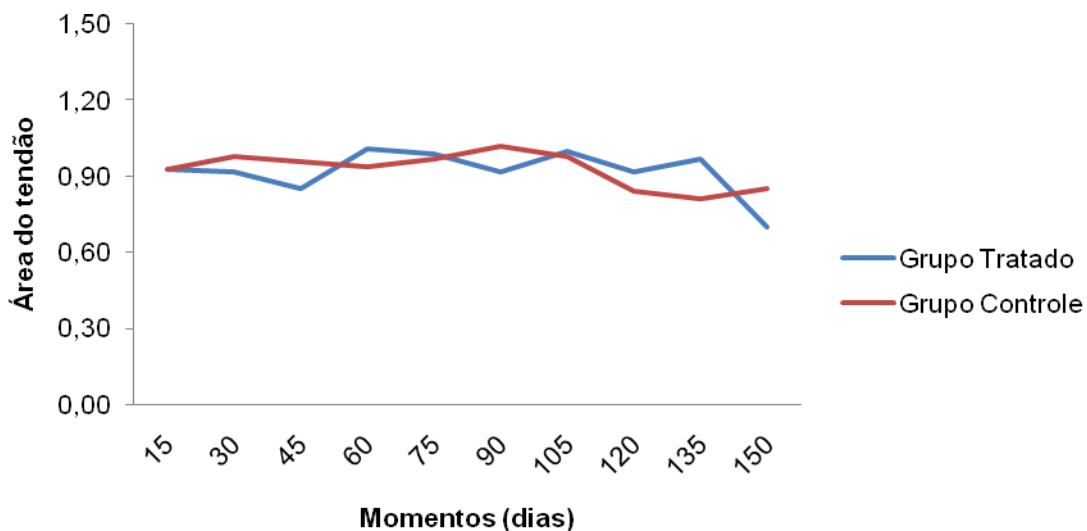


FIGURA 12: Perfis médios da área do tendão (cm^2) em função dos diferentes momentos.

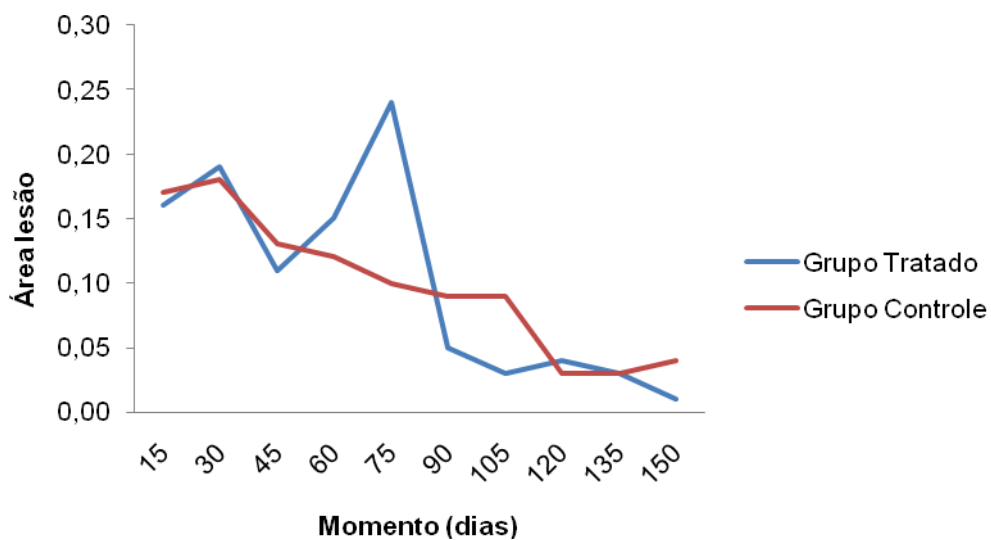


FIGURA 13: Perfis médios da área da lesão (cm^2) em função dos diferentes momentos

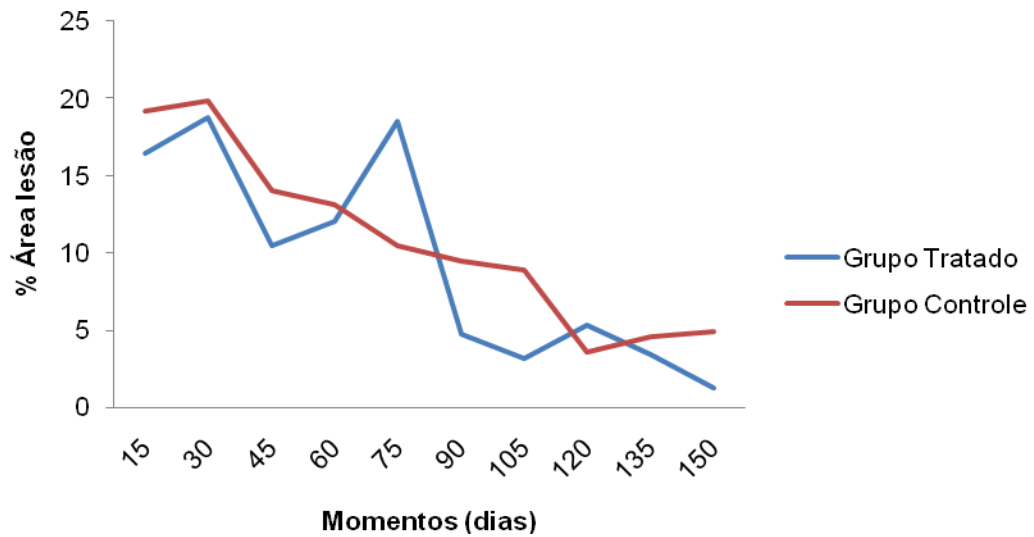


FIGURA 14: Perfis médios da porcentagem (%) da área da lesão em função dos diferentes momentos.

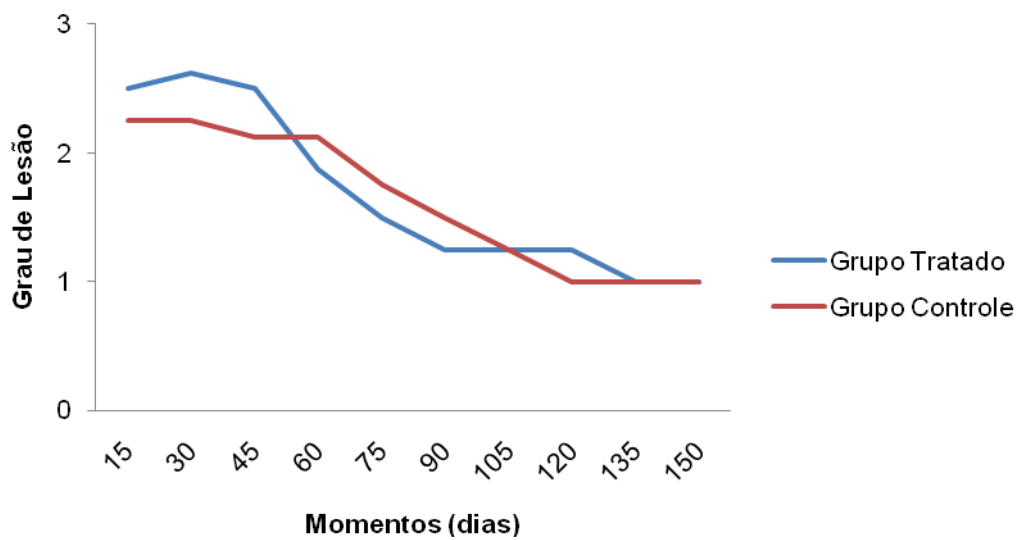


FIGURA 15: Perfis médios do grau da ecogenicidade em função dos diferentes momentos.

5.6.3 Avaliação por Ultrassonografia Power-Doppler

Foi estabelecido o PRF (define a amplitude máxima a ser exibida pelo Power-Doppler) de 0,3 como padrão, sendo mantida esta PRF para a avaliação de todos os animais do experimento. As imagens a serem consideradas foram aquelas produzidas quando os animais encontravam-se completamente estáticos, pois qualquer tipo de movimento, inclusive cutâneo, aumentava consideravelmente a quantidade de sinais, podendo ocorrer uma interpretação errônea das imagens.

A vascularização pôde ser claramente observada nas imagens da região lesada, inclusive no próprio local da lesão. Uma grande variedade na intensidade, tamanho e número de sinais puderam ser notadas (Figura 16).

Em todos os animais, nenhuma presença de fluxo foi observada antes da indução da lesão e durante a fase aguda do processo inflamatório (aos 15 dias). Pode ser observada presença de fluxo somente nos grupos tratados após o implante das células-tronco mesenquimais em dois momentos, aos 45 dias com cinco membros tratados apresentando média do escore ultrassonográfico Power Doppler de 1,1 (totalizando 15 dias após o implante), e aos 60 dias com quatro membros tratados com presença de fluxo sanguíneo esboçando média de escore dos sinais ultrassonográficos Power Doppler de 0,8 (totalizando 30 dias após o implante). Não foi possível a identificação de fluxo após os 60 dias do experimento no grupo tratado e nenhum dos membros controle apresentou fluxo, independente do momento da avaliação.

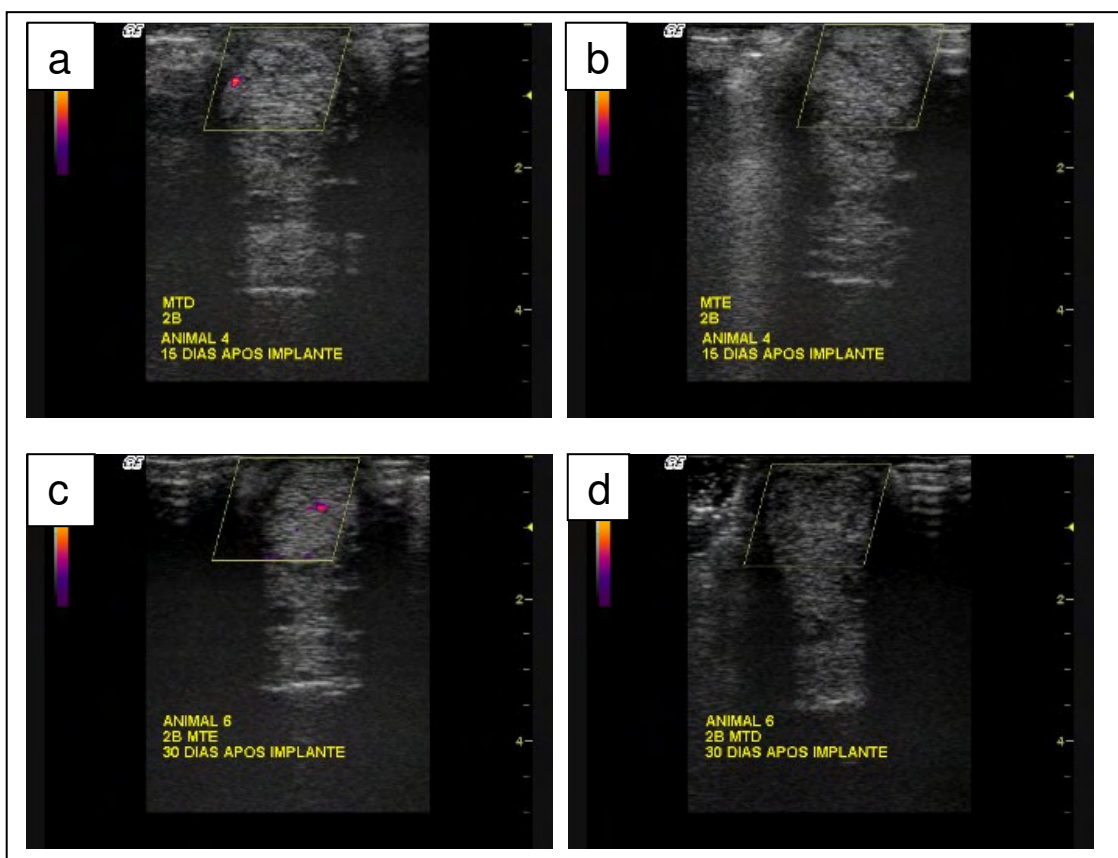


FIGURA 16: Avaliação por ultrassonografia Power Doppler. a) avaliação do membro tratado aos 45 dias do experimento; b) avaliação do membro controle aos 45 dias do experimento; c) avaliação do membro tratado aos 60 dias do experimento; d) avaliação do membro controle aos 60 dias do experimento.

5.6.4 Biópsia

Um leve aumento de volume, tanto no grupo controle quanto no grupo tratado, ainda se fazia visível nos dois momentos da biópsia (60 e 150 dias após a indução da lesão). Todos os animais apresentaram sangramento em maior ou menor grau no momento da incisão de pele, sangramento este considerado de maior intensidade se comparado a um animal sadio. Alguns dos cortes dos animais biopsiados aos 60 dias após a indução da lesão (GA) apresentavam aspecto gelatinoso, sem o padrão usual das fibras tendíneas.

Toda a região ao redor da lesão, incluindo o tecido subcutâneo e paratendão, apresentava grande quantidade de fibrose, aspecto observado principalmente no grupo (GA), (Figura 17). No entanto, não foi possível determinar o local exato da área lesada visualmente nos animais que foram biopsiados aos 150 dias após a indução da lesão (GB), sendo necessária a visualização da imagem ultrassonográfica para a correta localização da área lesada.

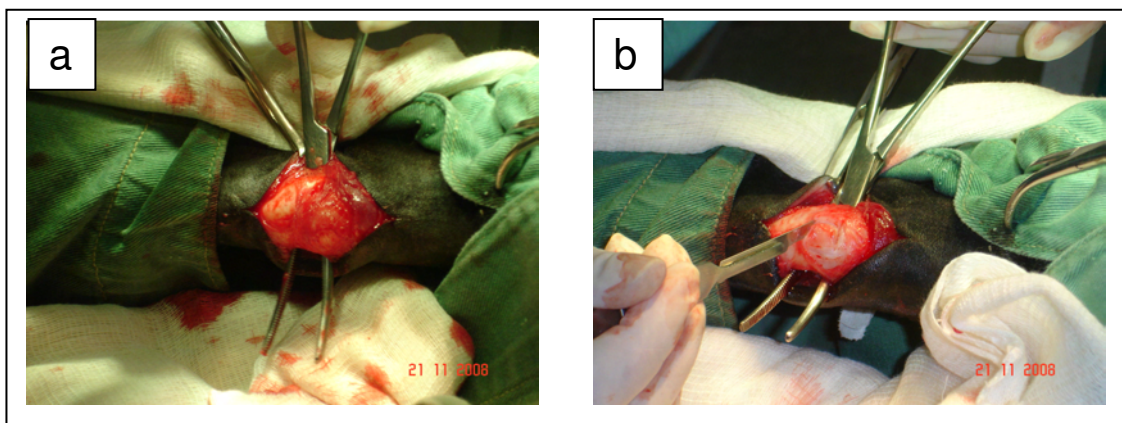


FIGURA 17: Biópsia tendínea. a) grande presença de fibrose pode ser observada. b) tendão é apresentado com auxílio de pinça, e com o bisturi, retirou-se um pequeno fragmento.

5.6.5 Análise Histopatológica e Imunoistoquímica

Não foram observadas à avaliação histopatológica características de fase aguda, como necrose tecidual, edema ou hemorragia. Tanto o grupo tratado como o grupo controle apresentaram uma hiper celularidade, caracterizando o estágio de evolução da reparação do tecido lesado.

No exame histopatológico do grupo tratado que foi biopsiado aos 60 dias após a indução da lesão (G1A) foram observadas fibras colágenas mais bem definidas, com maior organização e alinhamento, como também ondulações mais representativas se comparado ao grupo controle (G2A), porém ainda não semelhante ao tecido sadio (Figura 18). Os núcleos do fibroblastos encontravam-se mais alongados, porém a celularidade ainda foi alta, se comparado à celularidade encontrada em um tendão normal.

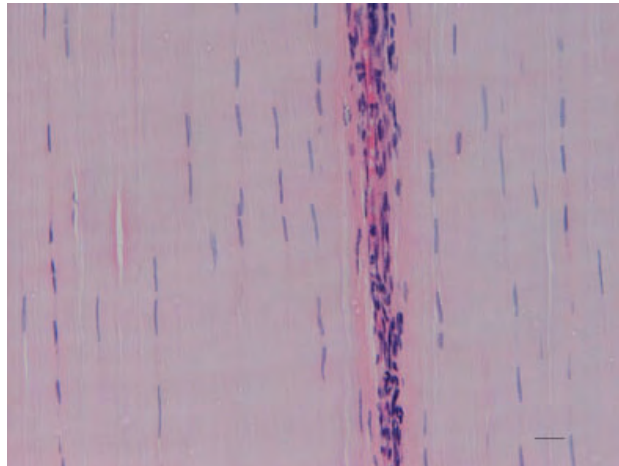


FIGURA 18: Tendão sadio (HE 200X).

Os vasos tenderam a se alongar longitudinalmente, no sentido da força exercida sobre o tendão.

O grupo controle (G2A) apresentou fibroblastos com núcleos mais arredondados e as fibras encontravam-se menos visíveis, estando a matriz extracelular mais basofílica. Este grupo também possuiu uma menor quantidade de ondulações e menor organização das fibras (Figura 19).

O grupo controle que foi realizado a biópsia no 150º dia do experimento (G2B), apresentou menor celularidade no tendão, maior arranjo paralelo das fibras colágenas e menor intensidade de infiltrado inflamatório perivascular em relação ao grupo controle do 60º dia do experimento (G2A). O grupo tratado que foi realizado a biópsia no 150º dia do experimento (G1B), apresentou aspecto semelhante a um tendão normal, com presença de matriz extracelular em arranjo paralelo e pouca celularidade (Figura 20).

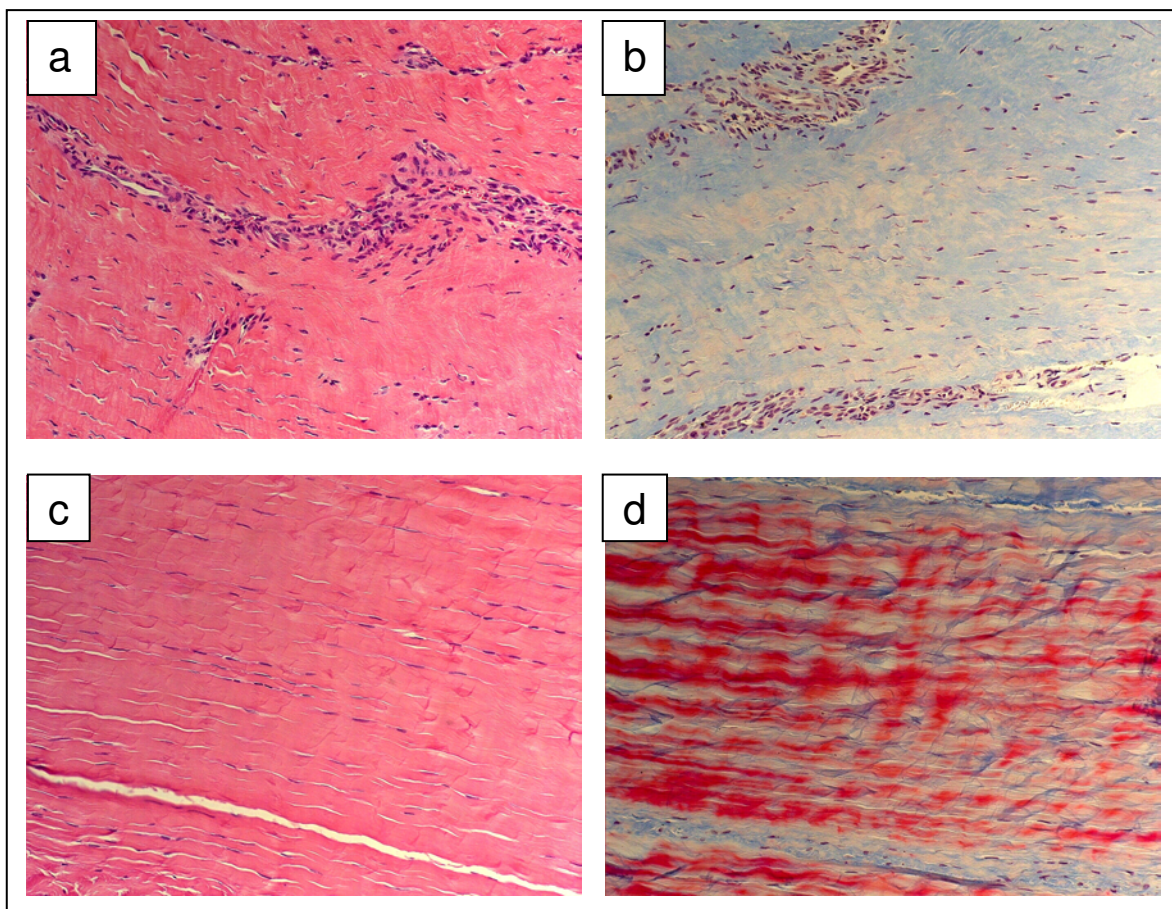


FIGURA 19: Corte histopatológico aos 60 dias (grupo controle). a) infiltrado mononuclear perivascular moderado e maior celularidade (maior número de núcleos) no tendão. A matriz extracelular não está alinhada (HE, objetiva 20x). b) presença de tecido conjuntivo não colagenizado, presença de infiltrado inflamatório perivascular e maior celularidade (Tricrômio de Masson, objetiva 20x). Corte histopatológico aos 60 dias (grupo tratado). c) fibras colágenas arranjadas de forma paralela, semelhante a um tendão saudável, menor celularidade em comparação ao grupo controle (HE, objetiva 20x). d) maior deposição de colágeno (coloração vermelha) no tendão (Tricrômio de Masson, objetiva 20x).

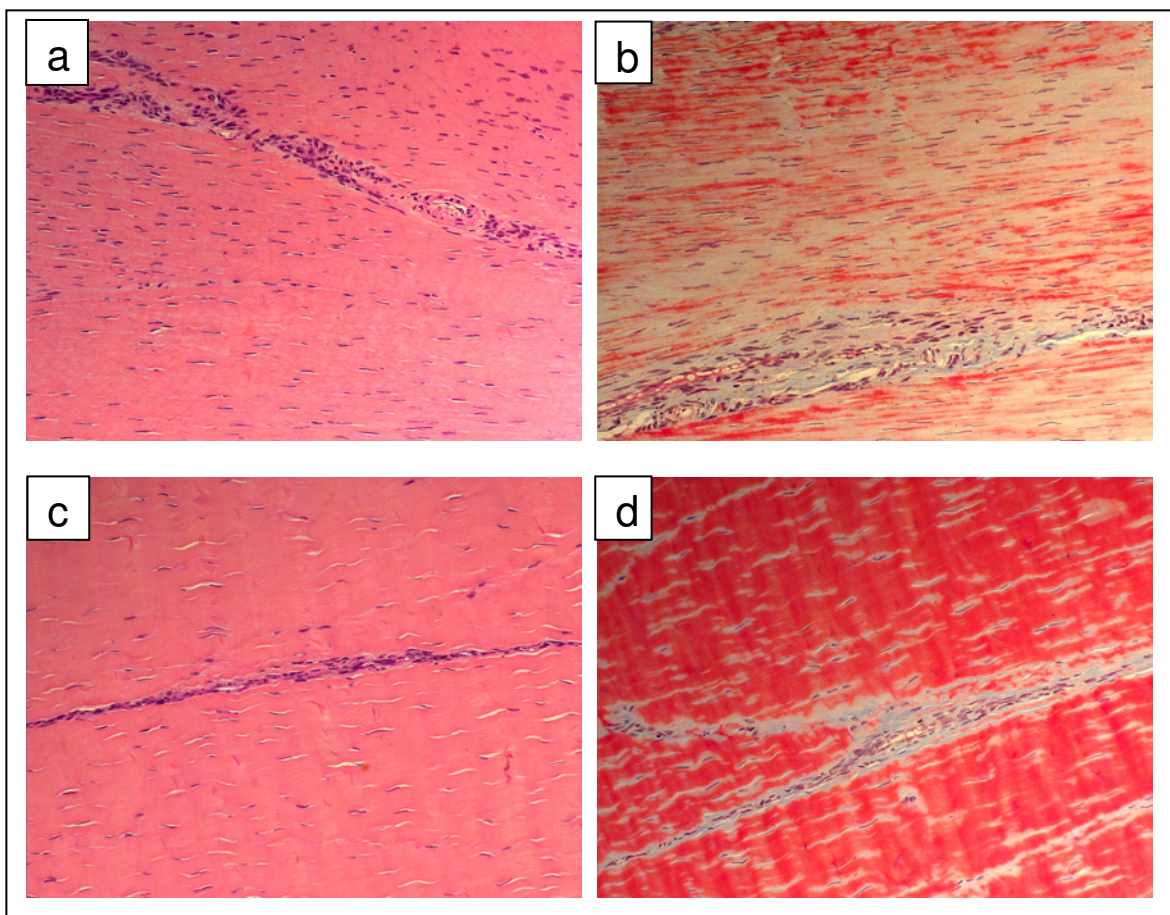


FIGURA 20: Corte histopatológico aos 150 dias (grupo controle). a) celularidade menor no tendão, em relação ao grupo controle aos 60 dias. Maior arranjo paralelo das fibras colágenas e menor intensidade de infiltrado inflamatório perivascular (HE, objetiva 20x). b) nota-se maior deposição de matriz extracelular, colágeno (em vermelho), em relação ao grupo controle aos 60 dias, porém em menor intensidade do que o grupo tratado aos 150 dias (Tricrômio de Masson, objetiva 20x). Corte histopatológico aos 150 dias (grupo tratado). c) aspecto semelhante a de um tendão normal, com presença de matriz extracelular em arranjo paralelo e pouca celularidade (HE, objetiva 20x). d) maior deposição de colágeno (coloração vermelha) no tendão em relação ao grupo controle.

TABELA 5: Médias dos marcadores colágeno tipo I, colágeno tipo III e por grupo nos dois momentos da biópsia.

		COLÁGENO TIPO I	COLÁGENO TIPO III
BIÓPSIA AOS 60 DIAS	TRATADO	7,39 a	4,98 a
	CONTROLE	5,14 b	5,10 a
BIÓPSIA AOS 150 DIAS	TRATADO	7,26 a	3,14 a
	CONTROLE	4,11 b	5,50 b

Letras diferentes na coluna significam que foram diferentes estatisticamente em nível de 5% ($P < 0,05$), letras iguais não houve diferença.

Os grupos tratados e controle apresentaram diferença estatisticamente significativa em nível de 5% ($P < 0,05$) somente para o marcador colágeno tipo I, aos 60 dias do experimento (GA), e em todos os marcadores utilizados aos 150 dias do experimento (GB).

Na avaliação imunoistoquímica, o anticorpo para colágeno tipo I mostrou marcação positiva na biópsia aos 60 dias de 7,39% no grupo tratado e de 5,14% no grupo controle, sendo este um valor significativo. Este resultado sinaliza uma maior quantidade de colágeno tipo I presente no grupo tratado que no grupo controle, sendo este tipo caracterizado como a principal fibra constituinte do tendão sadio (Figura 21- a, b; Tabela 5).

Quanto ao colágeno tipo III, que identifica a fibra colágena existente no tecido cicatricial, este foi encontrado em 4,98% no grupo tratado e em 5,10% no grupo controle, sendo este um valor não significativo (Figura 21- c, d; Tabela 5).

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), também marcado através de imunoistoquímica, também expressou marcação, entretanto não foi possível a mensuração do porcentual de regiões marcadas por campo através do programa de imagens Leica Qwin 3.0 (Figura 21 e 22). Não foi realizada a mensuração da porcentagem da marcação do VEGF devido a formação de “dobras” do tendão nas lâminas, a possível explicação para esse ocorrido se deve a recuperação antigênica ter sido feita com o uso de calor, através de banho maria, 20 minutos, em solução pré aquecida de TRIS-EDTA (pH 9,0). O que pode ser verificado, foi a maior expressão do anticorpo VEGF no grupo GA

(biópsia realizada aos 60 dias após o implante) em relação ao GB (biópsia realizada aos 150 dias após o implante), entretanto não foi possível fazer a comparação da expressão do anticorpo VEGF entre o grupo tratado e o grupo controle.

Durante a avaliação aos 150 dias do experimento (GB), houve diferença estatisticamente significativa entre todos os marcadores testados, o anticorpo colágeno tipo I esboçou marcação de 7,26% no grupo tratado (G1B) e 4,11% no grupo controle (G2B). O marcador colágeno tipo III expressou 3,14% no grupo tratado (G1B) e 5,50% no grupo controle (G2B), (Figura 22; Tabela 5).

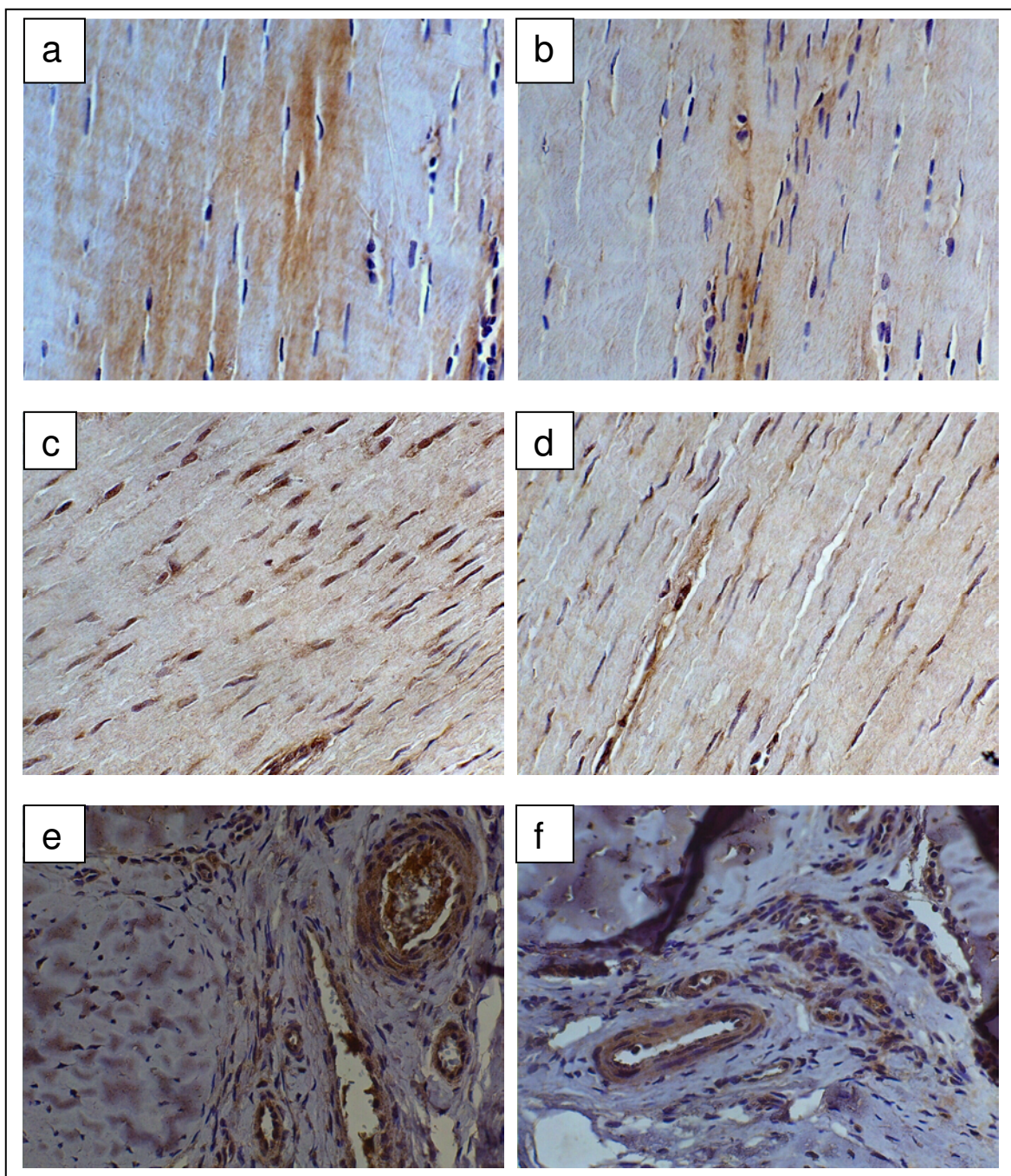


FIGURA 21: Imunoistoquímica aos 60 dias do experimento.

- a) Imunoistoquímica para colágeno tipo I, membro tratado (400X);
- b) Imunoistoquímica para colágeno tipo I, membro controle (400X);
- c) Imunoistoquímica para colágeno tipo III, membro tratado (400X);
- d) Imunoistoquímica para colágeno tipo III, membro controle (400X);
- e) Imunoistoquímica para VEGF, membro tratado (640X);
- f) Imunoistoquímica para VEGF, membro controle (640X).

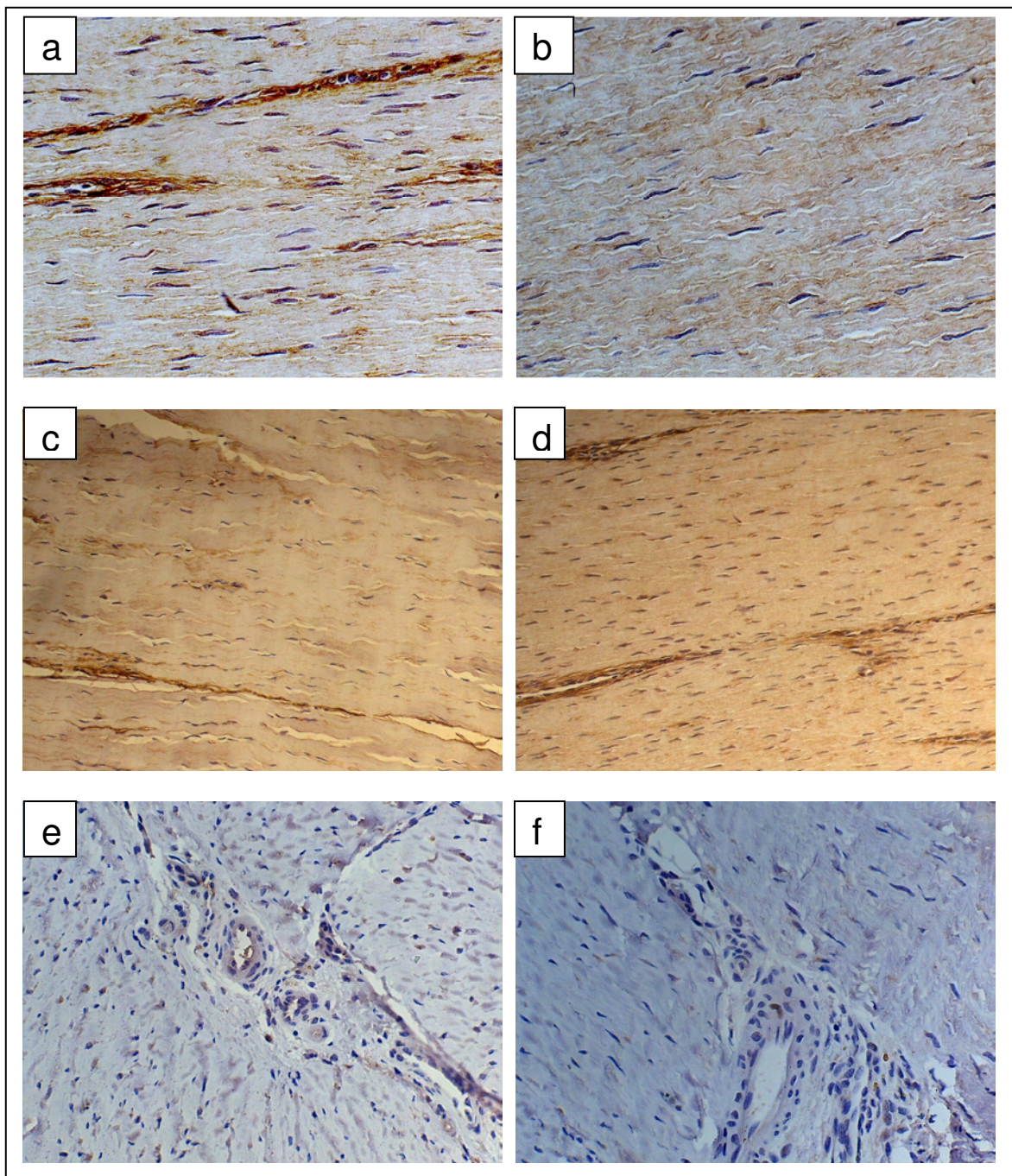


FIGURA 22: Imunoistoquímica aos 150 dias do experimento.
a) Imunoistoquímica para colágeno tipo I, membro tratado (400X);
b) Imunoistoquímica para colágeno tipo I, membro controle (400X);
c) Imunoistoquímica para colágeno tipo III, membro tratado (400X);
d) Imunoistoquímica para colágeno tipo III, membro controle (400X);
e) Imunoistoquímica para VEGF, membro tratado (640X);
f) Imunoistoquímica para VEGF, membro controle (640X).

Os resultados histopatológicos e imunoistoquímicos obtidos neste estudo demonstram que a terapia celular implantada neste experimento causou a evolução na maturação da matriz extracelular de modo mais significativo no grupo tratado (Figura 19 e Figura 20). Maior expressão do colágeno tipo I no grupo tratado em relação ao grupo controle nos dois momentos que foi realizado a biópsia (Tabela 5; Figura 21; figura 22). Menor expressão do colágeno tipo III no grupo tratado em relação ao grupo controle no momento que a biópsia foi realizada no 150º dia (GB) (Tabela 5; Figura 22).

6. DISCUSSÃO

6.1 TÉCNICAS DE MANIPULAÇÃO DAS CÉLULAS MESENQUIMAIS

6.1.1 Coleta do tecido adiposo

A contenção em brete, seguida da sedação mostrou-se eficiente para a realização do procedimento, entretanto alguns animais mostraram desconforto no momento da realização do bloqueio anestésico em “L invertido”, e durante alguns procedimentos cirúrgicos foi necessário a readministração de anestésico local para promover a completa analgesia no local bloqueado.

A coleta do tecido adiposo na base da cauda de eqüinos em estação (VIDAL et al., 2007; NIXON et al., 2008; MAMBELLI et al., 2009), mostrou-se viável. Segundo Mambelli e colaboradores (2009) e Nixon e colaboradores (2008), além da região da base da cauda, também é possível realizar a coleta do tecido adiposo na região da tábua do pescoço, e na região inguinal, entretanto não foi realizada nenhuma tentativa de coleta de tecido adiposo nos locais por eles descrito para fazer uma análise se estas técnicas foram mais vantajosa em relação a que foi desenvolvida neste experimento.

Também foi observada por Mambelli e colaboradores (2009) a contaminação sanguínea do material coletado, sendo necessárias diversas lavagens em laboratório com PBS para a remoção do sangue de forma semelhante ao nosso experimento.

Durante o experimento, foi observada a deiscência da linha de sutura com posterior contaminação por miíase em somente um dos animais, este foi um fato isolado que aconteceu após a remoção dos fios de sutura durante um final de semana do experimento. Provavelmente, o animal apresentava prurido e ao coçar a base da cauda em algum objeto houve a deiscência da sutura, entretanto após a constatação do fato ocorrido foram estabelecidos curativos diários e em cerca de dez dias de tratamento a ferida estava completamente cicatrizada. Estes dados foram divergentes da literatura consultada (Vidal et al., 2007; Nixon et al., 2008; Mambelli et al., 2009), pois estes não citaram nenhum tipo de problema (deiscência da linha de sutura) no pós-operatório dos animais de pesquisa.

6.1.2 Separação da Fração Vascular Estromal

O procedimento de separação da fração vascular estromal foi possível através da técnica descrita, semelhante ao obtido por Aust e colaboradores (2004), que descreveram procedimento similar em humanos. Vidal e colaboradores (2007) realizaram técnica semelhante em eqüinos, com o cultivo de células-tronco mesenquimais *in vitro*.

A média do peso das amostras foi de 1,85 g, sendo suficiente para obtenção de aproximadamente $13,45 \times 10^6$ células da fração vascular estromal viáveis, as quais foram cultivadas posteriormente a sua obtenção. Esses resultados foram divergentes ao demonstrado por Vidal e colaboradores (2007), que fizeram a coleta do tecido adiposo na base da cauda dos eqüinos com um valor médio variando de 15 a 20 g de tecido adiposo por animal.

O teste de viabilidade com coloração de azul de tripan 0,2% foi realizado em câmara de Neubauer, permitindo não só a contagem das células viáveis, mas também a contagem do número de células totais contidas na fração vascular estromal. A média da viabilidade celular após o isolamento das células nucleadas derivadas do tecido adiposo foi de 84%, valor muito semelhante a encontrada por Nixon e colaboradores (2008) de 87,5%. Oliveira (2008)

realizou a extração da fração mononuclear da medula óssea e obteve 85,5% de viabilidade, valor muito próximo ao encontrado neste estudo.

Possuindo-se o número de células obtidas através da separação da fração vascular estromal, obteve-se o número de células viáveis a serem cultivadas e implantadas. O teste de viabilidade se fez importante pois nos permitiu saber o número de células viáveis a serem injetadas no tendão, assegurando maior confiabilidade ao trabalho e em seus resultados.

6.1.3 Cultura das Células-Tronco Mesenquimais

O método de cultura das células-tronco mesenquimais descrito neste experimento mostrou-se viável. A densidade de plaqueamento das células da fração vascular estromal a 10^5 células/cm² foi semelhante ao que foi descrito por Mambelli e colaboradores (2009), e diferente da densidade 5×10^3 células nucleadas/cm² que foi descrita por Vidal e colaboradores (2007). Pode-se observar a aderência das células-tronco mesenquimais em cultura em menos de 48 horas, fato de acordo com o descrito na literatura quanto à característica destas células de adesão ao plástico quando mantidas em condições de cultivo (ZAGO et al., 2006; SCHÄFFLER et al., 2007).

O teste de viabilidade com coloração de azul de tripan 0,2% foi realizado em câmara de Neubauer, permitindo a contagem das células-tronco mesenquimais viáveis, entretanto não foram encontrados trabalhos utilizando o tecido adiposo como fonte das células-tronco mesenquimais, com posterior cultivo, impossibilitando a comparação deste trabalho quanto a viabilidade das células-tronco mesenquimal após o cultivo celular.

6.1.4 Caracterização das Células-Tronco Mesenquimais

Ainda não existe um anticorpo monoclonal específico para a identificação das células-tronco mesenquimais, por isso foi importante fazer a

sua caracterização com o maior número de marcadores que apresentam reação, como os marcadores CD13, CD44, CD73, CD90, CD105 e que não apresentam reação, como os marcadores CD34 e CD45 (UGARTE et al., 2003; KERN et al., 2006; SCHÄFFLER & BÜCHLER 2007). Neste estudo não foi feito o teste com um marcador negativo devido à inexistência de um marcador específico para a espécie eqüina, o que tornaria a informação da expressão negativa como inconclusiva.

Os resultados dos marcadores CD90 e CD44 revelaram compatibilidade com os resultados esboçados em alguns experimentos utilizando as CTM derivadas do tecido adiposo humano (DICKERA et al., 2005; MITCHELL et al., 2006; KERN et al., 2006; TAPP et al., 2009).

O marcador CD13 que é marcador dos granulócitos e monócitos, também tem expressão quando utilizado nas células da fração vascular fresca e nas CTM derivadas do tecido adiposo humano (SCHÄFFLER & BÜCHLER, 2007; MITCHELL et al., 2006; TAPP et al., 2009). Entretanto este não apresentou reação em nosso trabalho, mostrando incompatibilidade com os dados dos estudos realizados em humanos.

A caracterização imunofenotípica da superfície das células-tronco mesenquimais cultivadas derivadas do tecido adiposo da espécie eqüina, mostraram uma semelhança na caracterização destas células com os marcadores utilizados em outros estudos com diferentes espécies, entretanto não houve esta correlação quando foi utilizado o marcador CD13 (SCHÄFFLER & BÜCHLER, 2007; MITCHELL et al., 2006; TAPP et al., 2009). Essa discrepância dos resultados pode ser explicada pelos diferentes métodos de isolamento das células, o tempo de cultura celular antes da análise, o uso de anticorpos monoclonais detectando diferentes epítomos da mesma proteína de superfície e aos diferentes graus de sensibilidade utilizados para a análise da citometria de fluxo (GIMBLE et al., 2003). Os resultados apresentados confirmaram a caracterização imunofenotípica da superfície das células isoladas e cultivadas como células-tronco mesenquimais, sendo assim possível a sua aplicação na terapia celular da medicina veterinária eqüina.

6.1.5 Implante das Células-Tronco Mesenquimais

O implante celular foi realizado com facilidade, segundo a técnica de injeção intratendínea amplamente discutida pela literatura (GAUGHAN et al., 1998; DAHLGREN et al., 2001; BARREIRA et al., 2008; ALVES, 2008; OLIVEIRA, 2008).

Deve ser desejado um pequeno volume para o implante intratendíneo pois, segundo Redding (1998), volumes superiores a 1mL quando injetados dentro do tendão, promovem lesão de fibras por compressão.

A visualização da agulha no momento do implante das células-tronco mesenquimais foram facilitados pelo uso do aparelho GE Logiq 3, através do acompanhamento em tempo real do momento exato do implante celular, foi possível notar a mudança da ecogenicidade da lesão. A grande concentração celular foi identificada como sendo mais ecóica, descartando erros de interpretação, como o aumento da ecogenicidade imediatamente após o implante ocorrer em função da melhor evolução da lesão.

Não houve aumento de volume significativo e sensibilidade dolorosa após o implante das células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo, assim como nos resultados descritos por Fortier e Smith (2007) que indicaram que o implante de células mesenquimais provenientes de medula óssea e cultivadas em laboratório não provocaram piora na lesão ou mesmo reação tendínea, não havendo o aumento de sua área. O não aumento do volume e da sensibilidade dolorosa após o implante celular realizado neste experimento diverge aos resultados encontrados por Oliveira (2008) que descreveu que houve discreto aumento de volume além do já existente após o implante com as células mononucleares da medula óssea.

Pode ser observado um aumento da área da lesão e da porcentagem da área da lesão após 15 dias do implante das células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (45º dia do experimento), mostrando que houve o início de uma reação tendínea, mas que retornam ao patamar do grupo controle após 45 dias (90º dia do experimento), (Figura 13 e Figura 14).

Embora estes dados não apresentem diferença significativa estatisticamente, estão de acordo com os resultados encontrados por Oliveira (2008), que demonstrou o aumento significativo da área do tendão após 15 dias do implante com as células mononucleares derivadas da medula óssea.

Mesmo seguindo as recomendações de Dahlgren (2008) de utilizar a agulha 21G para evitar o extravasamento da solução contendo as células progenitoras, pôde-se observar durante o implante celular no experimento realizado através do auxílio do ultra-som o vazamento das células-tronco pelo espaço formado entre o tendão e a agulha com o extravasamento destas para áreas adjacentes ao tendão. Provavelmente não só o calibre da agulha foi responsável pela vazão das células para áreas próximas a desejada, mas também a viscosidade da solução em que as células-tronco foram diluídas (soro autólogo).

6.2 ANÁLISE DO REPARO TENDÍNEO

6.2.1 Análise Clínica e Ultrassonográfica

Diferentemente do que foi descrito na literatura (WILLIAMS, 1984; SPURLOCK et al., 1989; ALVES 1998) que induziram tendinite pela administração intratendínea de colagenase na dose de 0,5mL, sendo a concentração 2,5mg/mL, neste trabalho optou-se por realizar a indução de lesão com a mesma concentração de colagenase, porém em um volume de 1,0mL, de acordo com Yamada e colaboradores (2009). Este volume demonstrou a obtenção de uma lesão mais adequada como modelo para o estudo da reparação tendínea.

Como relatado por Foland e colaboradores (2003), a administração da colagenase provocou alterações clínicas locais como aumento de volume e sensibilidade à palpação em todos os animais implantados, bem como claudicações nos membros anteriores (em graus variados). Estes efeitos foram similares aqueles observados em lesões de ocorrência natural e aguda, decorrentes do exercício excessivo.

O aumento de volume na região após administração de colagenase foi interpretado como edema decorrente do processo inflamatório instalado. Este se iniciou após a administração de colagenase e permaneceu até o final do experimento em todos os membros do GA (biópsia no 60º dia do experimento), entretanto nos membros do GB (biópsia no 150º dia do experimento), mesmo que muito sutil, ainda houve aumento de volume tanto nos membros tratados quanto nos membros controles, o que corrobora com os relatos de Williams (1984) e Gift et al. (1992).

Quanto à atividade locomotora, após a administração de colagenase, observou-se claudicação moderada (grau 2 em média) por até 15 dias, apresentando diminuição mais pronunciada a partir dos 45 dias tanto no grupo tratado, quanto no grupo controle (Figura 10). Estes dados estão de acordo com Foland et al. (1992), que relataram aparecimento imediato de claudicação moderada após aplicação de colagenase, e com Marxen et al. (2004), quando após 24 horas da lesão observou-se claudicação entre 2 e 3, reduzindo gradualmente até os 45 dias, momento em que foi observada a completa ausência de claudicação.

As imagens ultrassonográficas das lesões induzidas no presente experimento possibilitaram a delimitação de suas bordas, estando este resultado de acordo com os achados de Genovese et al. (1986); Alves (1994); Denoix (1996); Marxen et al. (2004); Crovace (2007). Porém, na presente pesquisa, diversas lesões não se encontravam circunscritas no centro do tendão, e apesar de bem definidas, possuíram formato mais alongado, semelhante ao apresentado por Redding et al. (1999), sendo ainda similares às lesões de ocorrência natural. Esta lesão mais difusa pode ser resultado de um volume considerável de líquido (1mL) injetado no interior do tendão, que encontra grande resistência neste tecido extremamente denso.

A lesão induzida no presente experimento com colagenase (2,5mg/mL; 1,0mL) apresentou os maiores valores de comprometimento das fibras no corte transversal na avaliação aos 30 dias após a indução da lesão, com comprometimento de até 62,14% das fibras (em apenas um dos membros de um animal) no corte transversal no grupo tratado, tendo em média 18,74% de comprometimento de fibras, e no grupo controle o valor máximo foi de 57,14% (sendo a média 19,80%). Este achado vem de encontro com o observado por

Sutter (2007), que descreve um aumento da área lesada aos 30 dias após a lesão, como resposta ao trauma, ou efeito anabólico da terapia, reduzindo aos 60 dias. De maneira semelhante, lesões induzidas pela aplicação de colágeno estavam mais severas ao redor dos 17 aos 23 dias (MARXEN et al., 2004).

Aos 150 dias houve uma redução da porcentagem de área lesada, atingindo valores médios de 1,28% no grupo tratado e 4,95% no grupo controle, sendo que em alguns membros houve a completa dissolução da lesão tendínea, estes dados são semelhantes ao obtido por ALVES (1998) aos 150 dias, que houve diminuição da lesão, ficando próximo de um tendão sadio. Dados estes que contrariam o que foi sugerido por Gillis (1996) e Reef (1998) que propõem um período mínimo para a cicatrização tendínea de três meses. A completa cicatrização tendínea ocorre em um longo período de tempo, levando de 1 a 2 anos (GOODSHIP et al., 1994; RICHARDSON et al., 2007). Segundo Sharma e Maffulli (2005; 2006), após a décima semana da lesão, ocorre o estágio de maturação da cicatriz tendínea, período esse que tem duração de até 1 ano. Ainda, durante o final deste estágio é que declina o metabolismo dos tenócitos e a vascularização do tendão.

As lesões encontravam-se bem caracterizadas aos 15 dias após a indução, porém atingiram sua máxima definição aos 30 dias (momento do implante celular), quando se apresentaram anecóicas ou hipoeecóicas em ambos os grupos, dados estes semelhantes aos descritos por Oliveira (2008). O valor da ecogenicidade média máxima neste momento foi grau 2,43 para os grupos tratado e controle.

As imagens anecóicas e hipoeecóicas, segundo Henry et al. (1986); Dyson (1989); Reef et al. (1989); Genovese et al. (1990); Alves et al. (1993); Goodship e Birch (1996); Reef et al. (1996), são compatíveis com áreas de hemorragia, edema e tecido de granulação inicial na fase aguda da lesão. A partir dos 30 dias a lesão foi gradualmente se apresentando mais ecóica, resultante do processo de reparação. A melhora da ecogenicidade foi significativa ao longo do tempo para ambos os grupos, porém sem diferenças entre eles.

Aos 150 dias, houve uma importante melhora da ecogenicidade apresentada, sendo grau 2 no grupo tratado, e 2,25 no grupo controle, mostrando que este tempo não foi suficiente para o retorno da ecogenicidade

observada em um tendão sadio. Dado semelhante foi relatado por Spurlock et al. (1989), que avaliaram a lesão até 10 meses após a sua indução. O escore médio final da lesão no grupo tratado foi grau 1, sendo que o grupo controle teve grau ligeiramente maior, sendo 1,5. Resultados descritos por Alves (1998) aos 120 dias após a lesão, o grau de ecogenicidade variou entre 1 e 2, e dados semelhantes foram observados aos 150 dias (MARXEN et al., 2004).

Henry et al. (1986) descreveram que o aumento mais significativo da ecogenicidade das lesões ocorre com a produção de colágeno, resultante da organização dos fibroblastos durante o processo de cicatrização. Há uma correlação direta entre a quantidade de colágeno e a intensidade da ecogenicidade.

As imagens permaneceram hipoeecóicas ao final do experimento, moderadamente definidas e com melhor organização linear que nos primeiros meses do experimento, porém ainda não totalmente restabelecidas. Marr et al. (1983) apresentaram alterações semelhantes nos períodos de 1 a 5 meses após a indução da lesão. Acredita-se que o protocolo de exercícios adotado promove o estresse longitudinal das fibras tendíneas, sendo observada a melhora na organização das fibras tendíneas em ambos os grupos, concordando com o período mínimo de 90 dias para avaliar esta característica, descrito por Gillis (1996) e Alves (1998).

O alinhamento de fibras observado no corte longitudinal não foi semelhante ao encontrado em tendão sadio, porém com melhora no paralelismo e preenchimento da lesão em todos os membros. Este alinhamento observado ainda mostra fase de reorganização tecidual, conforme descrito por Marxen et al. (2004).

A terapia celular instituída neste experimento não demonstrou diferença estatística significativa entre o grupo tratado e o grupo controle quanto a avaliação clínica e ultrassonográfica, estes dados são diferentes aos descritos por Mountford (2006) e Crovace (2007), que alegam que o uso das células-tronco mesenquimais promovem a melhora clínica e ultrasonográfica da cicatrização tendínea. Entretanto, os dados deste experimento são compatíveis com Nixon e colaboradores (2008), que alegam não haver diferença significativa na avaliação ultrassonográfica entre o grupo tratado e o grupo controle após o implante das células nucleadas derivadas do tecido adiposo

equino. Oliveira (2008), realizou o implante das células mononucleares derivadas da medula óssea e descreveu que não houve diferença na avaliação ultrassonográfica entre o grupo tratado e o grupo controle.

6.2.2 Avaliação por ultrassonografia Power Doppler

Não foi observado fluxo vascular ao exame ultrassonográfico Power Doppler nos tendões dos membros anteriormente à indução da lesão, dado que concorda ao apresentado por Richards e colaboradores (2001).

O verdadeiro início da formação de vasos deve ocorrer, provavelmente, anterior à sua observação de fluxo sanguíneo no exame Power Doppler, assim como o seu completo desaparecimento ocorra em uma fase posterior (RISSELADA et al., 2006).

A identificação do fluxo sanguíneo apresentou-se em dois momentos do experimento, no 45º dia e no 60º dia, apresentando maior intensidade aos 45 dias após a indução da lesão. Entretanto, a partir do 75º dia do experimento não foi mais observado a presença de neovascularização através do exame do aparelho Power Doppler.

Em um estudo semelhante a este utilizando as células mononucleares da medula óssea (dentre essas as células-tronco mesenquimais) realizado por Oliveira (2008), observou maior fluxo sanguíneo com o exame do Power Doppler no 60º dia do experimento, dado semelhante ao encontrado neste estudo. Entretanto, Oliveira (2008) também observou a presença de fluxo de sangue no grupo controle (membros que não foram tratados com as células mononucleares derivados da medula óssea), fato este diferente ao encontrado no presente experimento. Oliveira (2008) também verificou a presença de vasos ao redor do local lesado até o 108º dia após a terapia com as células mononucleares da medula óssea do experimento realizado, dado este diferente do verificado neste estudo.

A avaliação da eficácia das terapias pode ser feita através do acompanhamento através do Power Doppler, observando a dinâmica do fluxo vascular (POZOR e McDONNEL, 2004), desde sua formação até a resolução

do processo cicatricial, associado ao exame ultrassonográfico convencional (STROUSE et al., 1999). No entanto, Zanetti et al. (2003) consideraram a análise da ecogenicidade mais importante do que a detecção de neovascularização com o exame Power Doppler.

6.2.3 Análise Histopatológica e Imunoistoquímica

Ao exame macroscópico, foi possível identificar o local da lesão por inspeção visual nos animais que foram biopsiados aos 60 dias após a indução da lesão (GA), também foi possível estabelecer o local lesado nos animais que foram biopsiados aos 150 dias após a indução da lesão (GB), entretanto neste grupo houve dificuldade para a localização macroscópica da área lesada. Estes dados são divergentes ao que foi observado por Williams (1984), que após eutanásia identificou as lesões tendíneas no interior dos tendões ao 6º, 9º e 14º mês após a indução experimental de tendinite.

Alves (1998) identificou o local prévio da lesão em animais mantidos em repouso e em animais sem tratamento com FBAPN, sendo que em alguns animais foi necessário o uso de imagem ultrassonográfica para a correta identificação da região, sendo esses dados de acordo com o presente experimento. A dificuldade de localização foi caracterizada como ocorrência de remodelamento das fibras colágenas. O que pode ser observado durante o procedimento cirúrgico, foi um ligeiro aumento de volume e fibrose local (característica mais acentuada no GA, 60º dia após a indução da lesão), sendo que em alguns animais também foi notada uma coloração mais esbranquiçada no local em que ocorreu a lesão, e este, ao corte, apresentou aspecto mais gelatinoso. A área afetada foi facilmente identificada aos 150 dias por Marxen et al. (2004) como uma região hiperêmica, paratendão espessado e opaco, além de evidente neovascularização. Adesões do paratendão ao TFDS também foram notadas.

Neste experimento, definiu-se a região a ser biopsiada através de uma marcação sobre a pele feita na altura da lesão, associado às imagens ultrassonográficas realizadas após a indução da lesão.

Os resultados obtidos na avaliação histopatológica (H.E. e Tricrômio de Masson) realizada no 60^o e no 150^o dia após a indução da lesão mostraram que todos os grupos possuíam fibroplasia, entretanto esta era mais evidente no grupo controle da biópsia realizada no primeiro momento, de maneira semelhante aos relatos existentes na literatura (SILVER et al., 1983; PEACOCK, 1984; GOODSHIP et al., 1994; ROBBINS et al., 1994).

MARXEN e colaboradores (2004) descreveram que, independentemente do tratamento aplicado à lesão tendínea, foram observados graus intensos de vascularização aos 150 dias, com grande número de vasos residuais e recém formados por todo fragmento tendíneo, esses dados divergem os encontrados no presente experimento, onde também foi notada vascularização aos 150 dias após o implante das células-tronco mesenquimais (GB), entretanto a intensidade de vasos foi mais intensa no GA (60^o dia após a indução da lesão).

Em ambos os grupos foram observadas ocorrências pertinentes à fase de fibroplasia, com aumento da densidade das fibras, mas esta ainda menor se comparada ao tendão sadio, concordando com o descrito por Spurlock et al. (1989), após 10 meses da indução da lesão.

O estágio de fibroplasia é caracterizado pela presença de um grande número de fibroblastos, com proliferação do endotendão e paratendão (STROMBERG e TUFUESSON, 1969; STRONBERG, 1971; SILVER et al., 1983). A fibroplasia foi uma característica muito marcante nos animais biopsiados aos 60 dias após a indução da lesão (GA), entretanto o grupo controle (G2A) apresentou maior celularidade se comparada ao grupo tratado (G1A).

Os fibroblastos nos grupos tratados (G1A e G1B), apesar de ainda existir uma grande celularidade se comparado ao tendão sadio, apresentaram núcleos mais alongados, e a matriz contendo fibras de colágeno corou-se mais fortemente (Tricrômio de Masson) do que nos grupos controles (G2A e G2B). As células e as fibras encontravam-se mais claramente alinhadas, iniciando uma organização em paralelo, e as ondulações foram mais presentes nos grupos tratados (G1A e G1B) em relação aos grupos controles.

Nixon e colaboradores (2008) realizaram um trabalho utilizando a fração vascular estromal do tecido adiposo eqüino para o implante após sete dias da indução da lesão com colagenase, sendo realizada a avaliação histológica do

tendão depois da biópsia realizada na sexta semana após o implante celular. Na avaliação histológica deste estudo foi observado melhora significativa quanto à melhor organização das fibras tendíneas e menor infiltrado inflamatório, dados similares aos encontrados no presente trabalho.

A redução do infiltrado celular inflamatório sugere que as células-tronco mesenquimais possam ter um efeito antiinflamatório na regeneração do tendão ou possam ter algum outro tipo de ação antiinflamatória através da estabilização ou da minimização da degeneração em andamento das fibras tendíneas (Nixon et al., 2008).

Os vasos não foram identificados em um grande número na maioria dos cortes histológicos, diferentemente do que foi identificado aos 150 dias nas lesões em eqüinos tratadas com glicosaminoglicanos polisulfatados, quando foi descrita uma vascularização em grande intensidade (MARXEN et al., 2004). Os vasos presentes aos 150 dias após a indução da lesão se alongavam no sentido da força exercida sobre o tecido tendíneo.

Pool (1996) relatou que a diminuição da celularidade e vascularização são indicativas de progressiva maturação do tecido de granulação, pois a deposição de colágeno exerce pressão mecânica sobre as delicadas paredes de capilares neoformados, levando à diminuição da vascularização. Assim, no presente trabalho foi possível notar a ocorrência da fase de maturação do tecido em reparação, com menor quantidade de vasos, e menor celularidade do grupo tratados em relação ao grupo controle.

Os mecanismos de diferenciação das células precursoras mesenquimais em tenócitos vêm sendo pesquisados, no entanto há dificuldade no reconhecimento das fases deste processo, quando analisadas as células por sua morfologia. Morfologicamente, a célula-tronco mesenquimal é similar ao fibroblasto e possui marcadores de superfície celular conhecidos em humanos (PITTENGER et al., 1999; MARTIN et al., 2002), porém o mesmo não acontece com os eqüinos, quando pouco se sabe sobre os seus possíveis marcadores. Baseado neste fato, foi relatada por Richardson (2005) a necessidade de marcações para colágeno tipo I, sintetizado pelos tenócitos para identificar a célula por sua função, além de sua diferenciação através de marcadores de superfície, como foi utilizado experimento, com o uso de marcadores específicos para colágeno tipo I e III, através da reação por imunistoquímica.

Paralelamente, foi realizada a pesquisa com marcadores para fatores de crescimento endotelial vascular (Vascular Endothelial Growth Factor- VEGF), visando identificar a presença ou não de angiogênese nas fases de cicatrização tendínea testadas nos diferentes momentos da avaliação (GA-biópsia aos 60 dias e GB-biópsia aos 150 dias).

Alves (2008), que identificou em uma fase inicial da cicatrização tendínea uma forte marcação para VEGF, acompanhado de um grande número de vasos em tendões flexores digitais superficiais tratados com células da fração mononuclear e por Petersen e colaboradores (2002), que também descreveram uma forte intensidade na imunomarcação para VEGF acompanhado de uma alta densidade vascular nas primeiras 12 semanas após enxerto para reconstrução tendínea, em um modelo experimental em ovinos. Estes dados são semelhantes aos encontrados nesse experimento, que apresentou marcação para o VEGF nos dois momentos que foi realizado a biópsia tendínea (GA e GB). Infelizmente não foi possível quantificar esta marcação em função da formação de “dobras” nas lâminas devido a recuperação antigênica que foi realizada com o uso de calor, através de banho maria, 20 minutos, em solução pré aquecida de TRIS-EDTA (pH 9,0).

Trabalhos publicados na avaliação de tecido tendíneo de eqüinos, como o apresentado por Williams e colaboradores (1980), descreveram o uso de anticorpos para colágeno tipo I e III de bovinos, produzidos em coelhos (DUANCE et al., 1977). Porém, a técnica realizada na identificação dos colágenos foi a imunofluorescência, utilizando tecido tendíneo congelado. Este mesmo texto descreve a maior extratividade de colágeno tipo I no tecido lesado que no tecido sadio, sendo esta diferença refletida no menor número de ligações cruzadas presentes no tecido neoformado. Essa pode ser a possível explicação para a maior expressão do colágeno tipo I no grupo tratado que foi biopsiado aos 60 dias após a indução da lesão (G1A, 7,39%) em relação ao grupo tratado que foi biopsiado após 150 dias da indução da lesão (G1B, 7,26%), pois o G1B apresenta um tecido tendíneo reparado mais semelhante ao tecido sadio.

Nixon e colaboradores (2008) observaram que houve maior concentração na formação de colágeno tipo III no grupo tratado em relação ao grupo controle, havendo concentração de colágeno no grupo tratado mais

evidente apenas ao redor de regiões que apresentavam alta celularidade residual, sendo estes dados semelhantes aos encontrados.

Foi possível a obtenção de reação adequada, considerando que o tecido lesado avaliado possuiu um menor número de ligações cruzadas, porém houve dificuldade na contagem pontual da marcação, além de formação de fundo. Assim, se fez necessária a utilização do programa Leica Qwin, através de câmera acoplada ao microscópio, para identificação da marcação e contagem de sua porcentagem por campo. Entretanto, ainda se faz necessário o aperfeiçoamento das técnicas imunoistoquímicas realizadas, principalmente quanto ao marcador VEGF, que neste experimento apresentou a formação de “dobras” do tendão, impossibilitando a correta verificação da porcentagem de marcação.

Novas pesquisas sobre a marcação e identificação das fibras colágenas no tecido tendíneo ainda se fazem necessárias para uma avaliação mais adequada da resposta cicatricial tendínea. Um novo método para a avaliação da cicatrização do tendão é a identificação da expressão gênica que pode ser benéfica para confirmar a diferenciação celular para um fenótipo de tendão, além de quantificar a expressão gênica dos colágenos tipo I, III e V, tendo assim um dado mais fidedigno quanto a resposta cicatricial instituída durante o tratamento (TAYLOR et al., 2009).

O efeito do tratamento com as células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo, aplicadas às lesões tendíneas induzidas neste experimento, possibilitou um melhor reparo tendíneo, sob aspectos analisados histologicamente, com menor celularidade no grupo tratado em relação ao grupo controle, maior arranjo paralelo das fibras colágenas, menor intensidade de infiltrado inflamatório perivascular, maior deposição de matriz extracelular (colágeno, corado em vermelho no Tricrômio de Masson).

Esta consideração está de acordo com dados divulgados por Herthel (2002) e Thomas (2003), que sugeriram este efeito, porém baseados em análise clínica, ultrassonográfica e funcional das estruturas tendo-ligamentares. Barreira (2005) e Oliveira (2008) avaliaram histologicamente lesões tratadas com células-tronco mesenquimais contidas na fração mononuclear após a sua indução, e sugeriram a aceleração do processo de reparação. Em trabalho publicado por Mountford et al. (2006), foram encontradas diferenças

significativas ao exame histopatológicos de um animal com lesões clínicas, sendo uma lesão tratada (19 meses após implante de células mesenquimais cultivadas em laboratório), e outra sem tratamento. A lesão tratada possuía aspecto próximo ao normal, enquanto a lesão não tratada apresentou processo inflamatório persistente.

Nixon e colaboradores (2008) realizaram a terapia do tendão flexor digital superficial em eqüinos com a administração de células nucleadas derivadas do tecido adiposo e observaram histologicamente melhor organização das fibras tendíneas e redução do infiltrado inflamatório, sendo estas observações semelhantes as encontradas neste experimento.

Durante o processo cicatricial, a fase proliferativa inicial é marcada por um pico na expressão de colágeno tipo III. Posteriormente, na fase de organização, a fibra colágena do tipo III é substituída por fibra colágena tipo I (MATSUMOTO et al., 2002). Os resultados da imunistoquímica revelaram uma maior quantidade de colágeno tipo I se comparada ao tipo III, tendendo à melhor cicatrização. Porém, a quantidade de colágeno tipo III marcada ainda foi alta, representando a continuidade do processo de cicatrização.

Crovace et al. (2007) descreveram a presença de colágeno tipo I maduro em animais tratados com implantes de células da fração mononuclear e de células mesenquimais cultivadas, apresentando arquitetura tendínea normal, nas fases entre 16 e 21 semanas após a indução de lesão; e grupo placebo apresentando maior quantidade de colágeno tipo III e menor organização, porém sem citar os valores observados. Hankemeier et al. (2005) também demonstraram uma melhora da qualidade do tecido cicatricial e de sua resistência pela proporção apresentada entre colágeno tipo I e colágeno tipo III, avaliando-se lesões ligamentares em humanos tratados com células mesenquimais. Na análise bioquímica de lesões centrais tendíneas em eqüinos, foi caracterizado um alto nível de colágeno tipo III em relação ao colágeno tipo I, sendo mantida a quantidade total de colágeno (BIRCH et al., 1998).

Em tendões normais de eqüinos, houve uma clara imunomarcagem para colágeno tipo I, exceto em região de endotendão, onde a imunoreatividade para colágeno tipo III foi evidente (SÖDERSTEN, 2006). Em mesmo trabalho, o tendão lesado apresentou a maioria das estruturas fibroblásticas marcadas

para colágeno tipo I, tanto em regiões mais organizadas como as de menor organização; a marcação para colágeno tipo III foi observada não só restrita à área endotendínea, mas por todo o corte, inclusive nas áreas necrosadas.

A marcação para fibras colágenas do tipo I foi difusa, como também para colágeno tipo III. Satomi et al. (2008) descreveram a marcação via imunofluorescência para colágeno tipo I e III na tendinose em humanos com distribuição semelhante, sendo a fibra colágena tipo I marcada de forma discreta e difusa, e para fibra colágena tipo III distribuição também difusa, porém mais proeminente. Em disfunções do tendão tibial posterior em humanos, um estudo bioquímico apresentou um valor de 53,6% para colágeno tipo III, ainda 26,4% para colágeno tipo V e queda de 40,4% na cadeia alfa-1, como também redução de 42,5% na cadeia alfa-2 do colágeno tipo I, não ocorrendo alteração na quantidade total de colágeno (GONÇALVES et al., 2002).

Nixon et al. (2008) descreveu que não houve diferença da expressão imunistoquímica de colágeno tipo I entre o grupo tratado e o grupo controle após o implante das células mononucleares derivadas do tecido adiposo eqüino. Entretanto, o presente estudo mostra diferença significativa quanto a expressão do colágeno tipo I, com maior expressão no grupo tratado em relação ao grupo controle.

Com a avaliação realizada neste trabalho, foi possível sugerir que o grupo submetido à terapia celular apresentou melhores parâmetros avaliados, representando uma diferença estatisticamente significativa com maior concentração do colágeno tipo I nos grupos tratados, menor concentração do colágeno tipo III no grupo tratado em relação ao grupo controle (GB).

Acredita-se que a utilização desta terapia, combinada ao esquema de atividade física controlada e com acompanhamento de avaliações clínicas e ultrassonográficas seriadas, possa acelerar o processo de reparação tendínea, contribuindo de maneira decisiva para a redução do período de reparação e melhorando a sua qualidade, evitando recidivas. Black et al. (2007) acreditavam que não existe evidência para dizer que as células-tronco se diferenciem, mas formula a hipótese que estas células expressem citocinas ou fatores de crescimento que promovem o reparo, ou mecanismos endógenos no tecido ao qual são implantadas. Segundo os citados autores, estes

mecanismos tróficos, ao invés da diferenciação em si, responderiam aos benefícios atribuídos à terapia celular.

Nosso trabalho mostrou que o uso das células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo melhorou a velocidade de reparação da lesão e a qualidade do tecido neoformado, porém, novos estudos devem ser desenvolvidos objetivando novos meios de avaliação do tecido tendíneo neoformado, como na avaliação da expressão gênica dos fibroblastos do tendão de eqüinos (TAYLOR et al., 2009).

Ainda são necessárias pesquisas utilizando células-tronco adultas provenientes de outras fontes de tecido adulto na espécie eqüina, sejam elas da medula óssea, sangue total, sangue do cordão umbilical, cordão umbilical, de forma a avaliar a real ação destes tratamentos e comparando qual a melhor fonte de células-tronco mesenquimais para a instituição da terapia celular em casos de tendinite.

7. CONCLUSÕES

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

1- A terapia celular tendínea com células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo, melhorou a organização tecidual e acelerou o processo de cicatrização tendínea. A realização do procedimento foi seguro e não apresentou nenhum risco aos animais durante o período de acompanhamento.

2- A técnica utilizada para o isolamento e o cultivo das células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo eqüino mostrou-se viável.

3- A caracterização imunofenotípica da superfície das células progenitoras adultas derivadas do tecido adiposo esboçaram expressão ao anticorpo monoclonal espécie específico *mouse anti-horse* CD44 e reação cruzada inter-espécie ao anticorpo monoclonal *mouse anti-rat* CD90-FITC.

4- O exame ultrassonográfico Power Doppler se mostrou eficiente para o acompanhamento da dinâmica vascular, apresentando a visualização de vascularização dos membros tratados em dois momentos do experimento (45º dia e 60º dia).

5- O tecido neoformado apresentou uma maior expressão na avaliação imunohistoquímica comparando os grupos tratados aos grupos controles quanto ao colágeno tipo I nos dois momentos em que foi realizada a biópsia (GA e GB). Menor expressão do colágeno tipo III na biópsia realizada no 150º dia do experimento no grupo tratado (G1B). Houve expressão do fator de crescimento vascular endotelial em ambos momentos que foi realizado a biópsia (GA e GB).

8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; WALTER, P. **Biologia molecular da célula**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 1463p.

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

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

ALVES, A.L.G. **Contribuições para o estudo da tendinite eqüina**. 2008. 162p. 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. 92p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

ALVES, A.L.G.; RODRIGUES, M.A.M.; AGUIAR, A.J.A.; THOMASSIAM, 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. **J. Equine Vet. Sci.**, v.21, n.7, p.335-340, 2001a.

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

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. **Arch. Vet. Sci.**, v.7, n.2, p.45-51, 2002.

ALVES, A.L.G.; SAITO, M.E.; KOHAYAGAWA, A.; AMORIM, R.L.; MOTA, L.S.; OLIVEIRA, P.G.G.; HUSSNI, C.A.; THOMASSIAN, A.; WATANABE, M.J. Expression of vascular endothelial growth factor and angiogenesis in experimental superficial digital flexor tendonitis after autologous implant of bone marrow mesenchymal stem cell. In: CONGRESS OF THE WORLD EQUINE VETERINARY ASSOCIATION WEVA, 10., Moscow. **Proceedings...Moscow: WEVA, 2008a.** p. 521-522.

ANDRES, B.M.; MURREW, G.A.C. Treatment of tendinopathy: what works, what does not, and what is on the horizon. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, v.466, n.7, p1539-1554, 2008.

ASPENBERG, P.; FORSLUND, C. Enhanced tendon healing with GDF 5 and 6. **Acta Orthop. Scand.**, v.70, n.1, p.51-54, 1999.

AWAD, H.A.; BUTLER, D.L.; BOIVIN, G.P.; SMITH, F.N.L.; MALAVIYA, P.; HUIBREGSTE, B.; CAPLAN, A.I. Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon. **Tissue Eng.**, v.5, n.3. p.267-277,1999.

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

BARREIRA, A.P.B. **Implante autólogo de células mesenquimais no tratamento de tendinites induzidas experimentalmente em eqüinos: avaliação clínica, ultrassonográfica, histopatológica e imunoistoquímica.** 2005. 98f. Dissertação (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

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. **Int. J. Appl. Res. Vet. Med.**, v.6, n.1, p.46-54, 2008.

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

BASSETT, C.A.L.; HERRMANN, I. Influence of oxygen concentration and mechanical factors on differentiation of connective tissue in vitro. **Nature**, v.190. p.460-461, 1961.

BIRCH, H.L. **An investigation into the cellular basis of tendon degeneration.**1993. Thesis (Doctoral) - University of Bristol, Bristol.

BIRCH, H.L.; WILSON, A.M.; GOODSHIP, A.E. The effect of exercise-induced localised hyperthermia on tendon cell survival. **J. Exp. Biol.**, v.200, n.1, p.1703-1708, 1997.

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 Vet. J.**, v.30, n.6, p.534-539, 1998.

BOESEN, M.H.; NANNI, S.; LANGBERG, H.; BOESEN, M.; FALK-RONNE, J.; BLIDDAL, H.; TORP-PEDERSEN, S. Colour Doppler ultrasonography and sclerosing therapy in diagnosis and treatment of tendinopathy in horses-a research model for human medicine. **Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.**, v.15, p.935-939, 2007.

BOYUM, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. **Scand. J. Clin. Invest.**, v.21, suppl. 97, p.77-89, 1968.

BRAMLAGE, L.R. Tendinitis, the approach to treatment. **Equine diagnostic ultrasound**. Baltimore: William e Wilkins, 1998. 677p.

BROFMAN, P.R.; CARVALHO, K.A.; GUARITA-SOUZA, L.C.; REBELATTO, C.; HANSEN, P.; SENEGAGLIA, A.C.; MYAGUE, N.; FURUTA, M.; FRANCISCO, J.C.; OLANDOSKI, M. Transplante celular: análise funcional imunocitoquímica e histopatológica em modelo experimental de miocardiopatia isquêmica utilizando diferentes células. **Rev. Bras. Cir. Cardiovasc.**, v.19, n.3, p.261-266, 2004.

CAMINOTO, E.H.; ALVES, A.L.G.; AMORIM, R.L.; THOMASSIAN, A.; HUSSNI, C.A.; NICOLETTI, J.L.M. Ultrasound and immunohistochemical evaluation of the effects of extracorporeal shock wave treatment in the hindlimbs of horses with experimentally induced suspensory ligament desmitis. **Am. J. Vet. Res.**, v.66, n.5, p.892-896, 2005.

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

CARTER, D.R.; BEAUPRE, G.S.; GIORE, N.J.; HELMES, J.A. Mechanobiology of skeletal regeneration. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, Suppl. 355, n.1, p.41-55, 1998.

CARVALHO, H.F.; FELISBINO, S.L.; KEENE, D.R.; VOGEL, K.G. Identification, content, and distribution of type VI collagen in bovine tendon. **Cell. Tissue Res.**, v.325, n.2, p.315-324, 2006.

CHEN, J.C.J.; GOLDHAMER, D.J. Skeletal muscle stem cell. **Reprod. Biol. Endocrinol.**, v.1, p.1-7, 2003. Disponível em:
<<http://www.rbej.com/content/1/1/101>>. Acesso em: 15 maio 2009.

CHEN, Y.J.; WANG, C.J.; YANG, K.D.; KUO Y.R.; HUANG, H.C.; HUANG, Y.T.; SUN, Y.C.; WANG, F.S. Extracorporeal shock waves promote healing of collagenase-induced Achilles tendinitis and increase TGFbeta1 and IGF-I expression. **J. Orthop. Res.**, v.22, p.854–861, 2004.

CHONG, A.K.S.; ABEL, D.A.; GOH, J.C.H.; HUI, J.H.P.; LIM, A.Y.T.; LEE, E.H.; LIM, B.H. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells influence early tendon-healing in a rabbit achilles tendon model. **J. Bone Jt. Surg. Am.**, v.89, p.74-81, 2007.

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

CRAYCHEE, T.J. Ultrasonographic evaluation of equine musculoskeletal injury. In: NYLAND, T.G.; MATTON, J.S. (Eds.). **Veterinary diagnostic ultrasound**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1995. p. 265-304.

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, n.1, p.281-283, 2007.

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

DAHLGREN, L.A.; VAN DER MEULEN, M.C.; BERTRAM, J.E.; STARRAK, G.S.; NIXON, A.J. Insulin-like growth factor-I improves cellular and molecular aspects of healing in a collagenase induced model of flexor tendinitis. **J. Orthop. Res.**, v.20, p.910-919, 2002.

DAHLGREN, L.A. Pathobiology of tendon and ligament injuries. **Clin. Tech. Equine Pract.**, v.6, n.1, p.168-173, 2005a.

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

DAHLGREN, L.A.; VAN DER MEULEN, M.C.; BERTRAM, J.E.; STARRAK, G.S.; NIXON, A.J. Insulin-like growth factor-I improves cellular and molecular aspects of healing in a collagenase induced model of flexor tendinitis. **J. Orthop. Res.**, v.20, p.910-919, 2002.

DAVIS, W.M. The clinical application of scar remodeling in disease status. In: DUBAI INTERNATIONAL EQUINE SYMPOSIUM, 1996, Dubai. **Proceedings...** Dubai: Neyenesch Printers, 1996. p.407-416.

DeUGARTE, D.A.; MORIZONO, K.; ELBARBARY, A.; ALFONSO, Z.; ZUK, P.A.; ZHU, M.; DRAGOO, J.L.; ASHJIAN, P.; THOMAS, B.; BENHAIM, P.; CHEN, I.; FRASER, J.; HEDRICK, M.A. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. **Cells Tissue Organs.**, v.174, n.3, p.101-109, 2003.

DENOIX, J.M. Functional anatomy of tendons in the distal limbs (manus and pes). **The Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.10, n.2, p.273-322, 1994.

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

DIGGLE, P.J.; LIANG, K.Y.; ZEGER, S.L. **Analysis of longitudinal data**. New York: Oxford Science Publications, 1994.

DUANCE, V.C.; RESTALL, D.J.; ROSS, R.; BORNSTEIN, P. **Biochemistry**, v.16, p.3242, 1977.

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

DYSON, S.J. Treatment of superficial digital flexor tendinitis: A comparison of conservative management, sodium hyaluronate and glycosaminoglycan polysulfate. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AAEP ,43., 1997. Phoenix. **Proceedings...**Phoenix, 1997. p.297-300.

DYSON, S.J. Medical management of superficial digital flexor tendonitis: a comparative study in 219 horses (1992-2000). **Equine Vet. J.**, v.36, n.5, p.415-419, 2004.

FENWICK, S.A.; HAZLEMAN, B.L.; RILEY, G.P. The vasculature and its role in the damaged and healing tendon. **Arthritis Res.**, v.4, n.4, p.252-260, 2002.

FOLAND, J.W.; TROTTER, G.W.; POWERS, B.E.; WRIGLEY, R.H.; SMITH, F.W. Effect of sodium hyaluronate in collagenase induced superficial digital flexor tendinitis in horses. **Am. J. Vet. Res.**, v. 53, n.12, p. 2371-2376, 1992.

FORTIER, L.A. Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. **Vet. Surg.**, v.34, p.415-423, 2005.

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

FORTIER, L.A.; SMITH, R.K. Evidence for stem cell in cartilage regeneration. In: CONVENTION OF THE AAEP,2007, Orlando, Florida, USA. **American Association of Equine Practitioners Annual Convetion**, 2007.p.329-334.

FRANK, C.B. Ligament structure, physiology and function. **J. Musculoskelet. Neuronal. Interact.**, v.4, n.2, p.199-201, 2004.

FRISBIE, D.D.; KAWCAK, C.E.; WERPY, N.M.; MCILWRAITH, C.W. Evaluation of bone marrow derived stem cells and adipose derived stromal vascular fraction for treatment of osteoarthritis using an equine experimental model. **Annual convention of the American Association of Equine Practitioners**, 52., 2006, San Antonio. Texas, USA, 2006.

GAUGHAN, E.M. Managing tendonitis in horses. **Vet. Med.**, v.89, p.789-794,1994.

GAUGHAN, E.M.; DeBOWES, R.M.; GIFT, L.J. Medical Management of Flexor Tendon Disorders in Horses. **Equine diagnostic ultrasound**. Baltimore: William e Wilkins, 1998. p. 572-576.

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

GENOVESE, R.L. Sonographic response to intralesional therapy with Beta-Aminopropionitrile Fumarate for clinical tendon injuries in horses. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION EQUINE PRACTITIONERS, 38.,1992, **Proceedings...**1992. p.265-272.

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

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

GILLIS, C. Tendon and ligament healing. In: RANTANEN N.W.; HAUSER, M.L.; RANTANEN, M.R. (Eds.) DUBAI INTERNATIONAL EQUINE SYMPOSIUM, 1., Dubai, 1996. **Proceedings...** Dubai: Neyenesch Printer, 1996. p.417-421.

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

GIMBLE, G.M.; GUILAK, F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. **Cytotherapy**, v.5, n.5, p.362-369. 2003.

GONÇALVES-NETO, J.; WITZEL, S.S.; TEODORO, W.R.; CARVALHO-JÚNIOR, A.E.; FERNANDES, T.D.; YOSHINARI, N.H. Changes in collagen matrix composition in human posterior tibial tendon dysfunction. **Jt. Bone Spine**, v.69, p.189-194, 2002.

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

GOODSHIP, A.E.; SILVER, I.A.; WILSON, A.M. Treatment of tendonitis in horses. **Vet. Rec.**, v.130, n.6, p.127, 1992.

GOODSHIP, A.E.; BIRCH, H.L. The pathophysiology of the flexor tendons in the equine athlete. In: RANTANEN N.W.; HAUSER, M.L.; RANTANEN, M.R. (Eds.) DUBAI INTERNATIONAL EQUINE SYMPOSIUM, 1., Dubai, 1996. **Proceedings...** Dubai: Neyenesch Printer, 1996. p. 83-107.

GUIMARÃES, M. Novas ramificações: brasileiros dominam técnica para transformar células adultas em embrionárias. **Pesq. FAPESP.**, n.156, p.45-47, 2009.

HANKEMEIER, S. Tissue engineering of ligaments by human bone marrow stromal cells in a liquid fibrin matrix: histological, biomechanical, and molecular biological results of a study with immunodeficient rats. In: ORTHOPAEDIC RESEARCH SOCIETY MEETING, 51. Washington, 2005. p.157.

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

HENRY, G.A.; PATTON, C.S.; GOBLE D.O. Ultrasonography evaluation of iatrogenic injuries of the accessory (carpal check) ligament and superficial digital flexor tendon. **Vet. Radiol.**, v.27, p.132-140, 1986.

HERTHEL, D.J. Enhanced suspensory ligament healing in 100 horses by stem cells and other bone marrow components. **AAEP Proc.**, v.47, p.319-321, 2001.

HOLLANDER, M.; WOLFE, D.A. **Nonparametric statistical methods**. Canada: John Wiley & Sons, 1973.

HUMPHRIES, R.K.; EAVES, A.C.; EAVES, C.J. Self-renewal of hematopoietic stem cells during mixed colony formation in vitro. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.78, n.6, p. 2629-2633, 1981.

JUNCOSA-MELVIN, N.; BOIVIN, G.P.; GOOCH, C.; GALLOWAY, M.T.; WEST, J.R.; DUNN, M.G.; BUTLER, D.L. The effect of autologous mesenchymal stem cells on the biomechanics and histology of gel-collagen sponge constructs used for rabbit tendon repair. **Tissue Eng.**, v.12, n.2, p.369-379, 2007.

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

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.

KRISTOFFERSEN, M.; ÖHBERG, L.; JOHNSTON, C.; ALFREDSON, H. Neovascularization in chronic tendon injuries detected with colour Doppler ultrasound in horse and man: implications for research and treatment. **Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.**, v.13, n.6, p.505-508, 2005.

LASLETT, A.L.; FILIPCZYK, A.A.; PERA, M.F. Characterisation and culture of human embryonic stem cells. **Trends Cardiovasc. Med.**, v.13, n.7, p.295-301, 2003.

LIU, S.H.; YANG, R.S.; AL-SHAikh, R.; LANE J.,M. Collagen in tendon, ligament, and bone healing: a current review. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, v.318, p.265-278, 1995.

MAIA, L. **Plasma rico em plaquetas no tratamento de tendinite em eqüinos: avaliação clínica, ultrasonográfica e histopatológica.** Viçosa, 2008, 88p., dissertação de mestrado, UFV, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

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

MARTIN D.R.; COX, N.R.; HATHCOCK, T.L.; NIEMEYER, G.P.; BAKER, H.J. Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. **Exp. Haematol.**, v.30, n.8, p.879-886, 2002.

MARXEN, S.; LACERDA-NETO, J.C.; CANOLA, J.C.; MORAES, J.R.E.; RIBEIRO, G. Intralesional polysulphated glycosaminoglycan as treatment of equine collagenase induced tendinitis: clinical, ultrasonographic and histopatologic evaluation. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.56, n.6, p.701-708, 2004.

MATSUMOTO, F.; TRUDEL, G.; UHTHOFF, H. High collagen type I and low collagen type III levels in knee joint contracture. **Acta Orthop. Scand.**, v.73, n.3, p.335-343, 2002.

McGANN, C.J.; ODELBERG, S.J.; KEATING, M.T. Mammalian myotube dedifferentiation induced by newt regeneration extract. **Proc. Natl. Acad. USA**, v.98, n.24, p.13699-13704, 2001.

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

MONTGOMERY, R.D. Healing of muscle, ligaments and tendons. **Sem. Vet. Med. Surg. (Small animal)**, v.4, n.4, p.304-311, 1989.

MORRIS, D.D.; WHITLOCK, R.H. Relapsin idiopathic thrombocytopenia in a horse. **Equine Vet. J.**, v.15, p. 73-75, 2003.

MOUNTFORD, D.R.; SMITH, R.K.W.; PATTERSON-KANE, J.C. Mesenchymal stem cell treatment of suspensory ligament branch desmitis: post mortem findings in a 10 year old Russian Warmblood gelding – a case report. **Pferdeheilkunde**, v.22, n.5, p.559-563, 2006.

MUNOEKA K.; HAN. M.; GARDINER, D.M. Perspectivas para regeneração de membros humanos. **Scient. Am. Brasil**, n.72, p.48-55, 2008.

MUSCHLER, G.F.; MIDURA, R.J.; NAKAMOTO, C. Practical modeling concepts for connective tissue stem cell and progenitor compartment kinetics. **J. Biomed. Biotechnol.**, v. 43, p.170-193, 2003.

NELL, T.; BERGAN, J.; HOEIJMARKERS, M.; VAN LAAR, P.; HORSPOOL, L.J.I. Comparison of vedaprofen and meloxicam in dogs with musculoskeletal pain and inflammation. **J. Small Anim. Pract.**, v. 43, n. 5, p. 208-212, 2002.

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

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

ODELBERG, S.J.; KOLLHOFF, A.; KEATING, M.T. Dedifferentiation of mammalian myotube induced by msx1. **Cell**, v.103, n.7, p.1099-1109, 2000.

OEDAYRAJSINGH-VARMA, M.J.; HAM, S.M.; KNIPPENBERG, M.; HELDER, M.N.; KLEIN-NULEND, J.; SCHOUTEN, T.E.; RITT, M.J.P.F.; VAN MILLIGEN, F.J. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure. **Cytotherapy**, v.2, p.166-177, 2006.

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

OLIVEIRA, P.G.G. **Implante autólogo de células mononucleares provenientes de medula óssea no tratamento de tendinites induzidas experimentalmente em eqüinos: avaliação a longo prazo – 120 dias.** Botucatu, 2008, 164p., dissertação de mestrado, UNESP, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, São Paulo.

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

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

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

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

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

PETERSEN, W.; UNTERHAUSER, F.; PUFE, T.; ZANTOP, T.; SÜDKAMP, N.P.; WEILWE, A. The angiogenic peptide vascular endothelial growth factor (VEGF) is expressed during the remodeling of free tendon grafts in sheep. **Arch. Orthop. Trauma Surg.**, v.123, n.4, p.168-174. 2003.

PITTINGER, M.F.; MACKAY, A.M.; BECK, S.C.; JAISWAI, R.K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J.D.; MOORMAN, M.A.; SIMONETTI, D.W.; CRAIG, S.; MARSHAK, D.R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v.284, p.143-147, 1999.

POOL, R.R. Pathologic changes in tendinitis of athletic horses. In: RANTANEN N.W.; HAUSER, M.L.; RANTANEN, M.R. (Eds.). DUBAI INTERNATIONAL EQUINE SYMPOSIUM, 1., Dubai, 1996. **Proceedings...** Dubai: Neyenesch Printer, 1996. p.109-117.

POZOR, M.A.; MCDONNELL, S.M. Color Doppler ultrasound evaluation of testicular blood flow in stallions. **Theriology**, v.61, p.799-810, 2004.

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

REDDING, W.R.; BOOTH, L.C.; POOL, R.R. The effects of polysulphated glycosaminoglycan on the healing of collagenase induced tendinitis. **Vet. Comp. Orthop. Traumatol.**, v.12, p. 48-55, 1999.

REEF, V.B.; GENOVESE, R.L.; BYRD, J.W.; REED, K.P.; DAVIS, W.M. Treatment of superficial digital flexor tendon injuries with beta-aminopropionitrile fumarate (BAPN-F): sonographic evaluation of early tendon healing and remodelling. In: RANTANEN N.W.; HAUSER, M.L.; RANTANEN, M.R. (Eds.). DUBAI INTERNATIONAL EQUINE SYMPOSIUM, 1., Dubai, 1996. **Proceedings...** Dubai: Neyenesch Printer, 1996. p.423-430.

REEF, V.B.; GENOVESE, R.L.; DAVIS, W.M. Initial long term results of horses with superficial digital flexor tendonitis treated with intralesional beta-aminopropionitrile fumarate. **Proc. Am. Assoc. Equine Pract.**, v.43. p.310-305, 1997.

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

RICHARDS, P.J.; DHEER, A.K.; MCCALL, I.M. Achilles tendon (TA) size and power Doppler ultrasound (PD) changes compared to MRI: a preliminary observational study. **Clin. Radiol.**, v.56, p.843-850, 2001.

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

RICHARDSON, L.E.; DUDHUA, J.; CLEGG, P.D.; SMITH, R. Stem cells in veterinary medicine- attempts at regenerating equine tendon after injury. **Trends Biotechnol.**, v.25, n.9, p.409-416, 2007.

RILEY, G.P. Gene expression and matrix turnover in overused and damaged tendons. **Scand. J. Med. Sci. Sports**, v.15, n.4, p.241-251, 2005.

RISSELADA, M.; KRAMER, M.; SAUNDERS, J.M.; VERLEYEN, P.; BREE, H.V. Power Doppler assessment of the neovascularization during uncomplicated fracture healing of long bones in dogs and cats. **Vet. Radiol. Ultrasound**, v.47, n.3, p.301-306, 2006.

RODEO, S.A.; POTTER, H.G.; KAWAMURA, S.; TURNER, A.S.; KIM, H.J.; ATKINSON, B.L. Biologic augmentation of rotator cuff tendon healing with use of a mixture of osteoinductive growth factors. **J. Bone Jt. Surg Am.**, v.89, p.2485–2497, 2007.

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

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

ROSS, M.W. Surgical management of superficial digital flexor tendinitis. **AAEP Proc.**, v.43, p.291-296, 1997.

SATOMI, E.; TEODORO, W.R.; PARRA, E.R.; FERNANDES, T.D.; VELOSA, A.P.P.; CAPELOZZI, V.L.; YOSHINARI, N.H. Changes in histoanatomical

distribution of types I, III and V collagen promote adaptative remodeling in posterior tibial tendon rupture. **Clinics**, v.63, n.1, p.9 -14, 2008.

SHARMA, P.; MAFFULLI, N. Tendon injury and tendinopathy: healing and repair. **J. Bone Jt. Surg.**, v.87A, n.1, p.187-202, 2005.

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

SHI, Y.Y.; NACAMULI, R.P.; SALIM A.; LONGAKER MT. The osteogenic potential of adipose-derived mesenchymal cells is maintained with aging. **Plast. Reconstr. Surg.**, v.117, p.1686-1696, 2005.

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

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

SMITH, R.K.W. Pathophysiology of tendon injury. In: ROSS, M.W.; DYSON, S.J. (Eds.). **Diagnosis and management of lameness in the horse**. Philadelphia: Saunders, 2002a. p.616-628.

SMITH, R.K.; BIRCH, H.L.; GOODMAN, S.; HEINEGARD, D.; GOODSHIP, A.E. The influence of ageing and exercise on tendon growth and degeneration-hypotheses for the initiation and prevention of strain-induced tendinopathies. **Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.**, v.133, n.4, p.1039-1050, 2002b.

SMITH, R.K.; 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. Stem cell therapy for tendon and ligament injuries – clinical results. *ESVOT CONGRESS*,12., 2004, Monique. **Proceedings...** Monique, 2004. p.187-188.

SMITH, R.K.W.; GOODSHIP, A.E. Tendon and ligament physiology. In: HINCHCLIFF, K.W.; KANEPS, A.J.; GEOR, R.J. (Eds.). **Equine sports medicine and surgery: basic and clinical sciences of the equine athlete.** Edinburgh: Saunders, 2004. p.130-151.

SMITH, R.K.W.; WEBBON, P.M. Harnessing the stem cell for the treatment of tendon injuries: heralding a new dawn?, **Br. J. Sports Med.**, v.39, p.582-584, 2005.

SÖDERSTEN, F. **Cartilage Oligometric Matrix Protein (COMP), thrombospondin-4 (TSP-4) and type I and III collagens in tendon.** 2006. 35f. Thesis (Doctoral) - Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.

SPEIRS, V.C. **Exame clínico de equinos.** Porto Alegre: Artmed,1999. p.319-321.

STASHAK, T.S. Disease and problems of tendons, ligaments and tendon sheaths. In: STASHAK, T.S. **Adams lameness in the horse.** 5.ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2002. p 594-640.

STROUSE, P.J.; DIPIETRO, M.A.; TEO, E.H.J.; DOI, K.; CHRISP, C.E. Power Doppler evaluation of joint effusions: investigation in a rabbit model. **Pediatr. Radiol.**, v.29, n.8, p.617-623, 1999.

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

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

TASSO, R.; AUGELLO, A.; CARIDA' M.; POSTIGLIONE F.; TIBILLETTI, M.G.; BERNASCONI, B.; ASTIGIANO, S.; FAIS, F.; TRUINI, M.; CANCEDDA, R.; PENNESI, G. Development of sarcomas in mice implanted with mesenchymal stme cells seeded onto bioscaffolds. **Carcinogenesis**, v. 30, p. 150-157, 2009.

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

TAYLOR, S.E.; VAUGHAN-THOMAS, A.; CLEMENTS, D.N.; PINCHBECK, G.; MACRORY, L.C.; SMITH, R.K.W.; CLEGG, P.D. Gene expression markers of tendon fibroblasts in normal and diseased tissue compared to monolayer and three dimensional culture systems. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 27, 2009.

TERSLEV, L.; TORP-PEDERSEN, S.; QVISTGAARD, E.; DANNESKIOLD-SAMSOE, B.; BLIDDAL, H. Estimation of inflammation by Doppler ultrasound: quantitative changes after intra-articular treatment in rheumatoid arthritis. **Ann. Rheum. Dis.**, v.62, n.11, p.1049-1053, 2003.

THOMOPOULOS, S.; ZAEGEL, M.; DAS, R.; HARWOOD, F.L.; SILVA, M.J.; AMIEL, D.; SAKIYAMA-ELBERT, S.; GELBERMAN, R.H. PDGF-BB released in tendon repair using a novel delivery system promotes cell proliferation and collagen remodeling. **J. Orthop. Res.**, v.25, p.1358–1368, 2007.

TUAN, R.S.; BOLAND, G.; TULI, R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. **Arthr. Rheum.**, v.54, p.3075-3078, 2006.

VERONEZI, R.C.; NUNES, P.G.; CASSOL, D.M.S.; TOMA, S.B.; THOMASSIAN, A.; ALVES, A.L.G. Avaliação da eficácia e segurança do meloxicam administrado por via oral em equinos. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v.1, n.4, p.11-17, 2006.

VILARTA, R.; VIDAL, B. Anisotropic and biomechanical properties of tendons modified by exercise and denervation: aggregation and macromolecular order in collagen bundles. **Matrix**, v.9, p. 55-61, 1989.

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.

VOGEL, K.G.; KELLER, E.J.; LENHOFF, R.J.; CAMPBELL, K.; KOOB, T.J. Proteoglycan synthesis by fibroblast cultures initiated from regions of adult bovine tendon subjected to different mechanical forces. **Eur. J. Cell. Biol.**, v.41, n.1, p.102-112, 1986.

WAKITANE, S.; GOTO, T.; PINEDA, S.J.; YOUNG, R.G.; MANSOUR, J.M.; CAPLAN, A.I.; GOLDBERG, V.M. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. **J. Bone Jt. Surg. Am.**, v.76, p.579-592, 1994.

WAKITANI, S.; SAITO, T.; CAPLAN, A.I. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. **Muscle Nerve**, v.18, n.12, p. 1417-1426, 1995.

WAKITANI, S.; TAKAOKA, K.; HATTORI, T.; MIYAZAWA, N.; IWANAGA, T.; TAKEDA, S.; WATANABE, T.K.; TANIGAMI, A. Embryonic stem cells injected into the mouse knee joint form teratomas and subsequently destroy the joint. **Rheumatology**, v.42, p.162-165, 2003.

WALTHER, M.; HARMS, H.; KRENN, V.; RADKE, S.; FAEHNDRICH, T.P.; GOHLKE, F. Correlation of power Doppler sonography with vascularity of the tissue of the knee joint in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. **Arthr. Rheum.**, v.44, p.331-338, 2001.

WEBBON, P.M. A histological study of macroscopically normal equine digital flexor tendons. **Equine. Vet. J.**, v.10, p.253-259, 1978.

WHITCOMB, M.B. Ultrasonographic Evaluation of the Metacarpus, Metatarsus, and Pastern. **Clin. Tech. Equine Pract.**, v.3, p.238-255, 2004.

WILLIAMS, I.F.; HEATON, A.; McCULLAGH, K.G. Cell morphology and collagen types in equine tendon scar. **Res. Vet. Sci.**, v.28, p. 302-310, 1980.

WILLIAMS, I.F. Studies on the pathogenesis of equine tendonitis following collagenase injuri. **Res. Vet. Sci.**, v.36, p.326-338, 1984.

WILLIAMS, R.B.; HARKINS, L.S.; HAMMOND, C.J.; WOOD, J.L. Racehorse injuries, clinical problems and fatalities recorded on British racecourses from flat racing and National Hunt racing during 1996, 1997 and 1998. **Equine Vet. J.**, v.33, n.5, p.478-486, 2001.

WILSON A.M.; McGUIGAN, M.P.; SU, A.; VAN DEN BOGERT, A.J. Horses damp the spring in their step. **Nature**, v.414, p. 895-899, 2001.

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

WILSON, J.H.; ROBINSON, R.A.; JENSEN, R.C.; McARDLE. Equine soft tissue injuries associated with racing: Descriptive statistics from American racetracks. In: DUBAI INTERNATIONAL EQUINE SIMPOSIUM, 1996, Dubai. **Proceedings...** Dubai: Neyenesch Printers, 1996. p.1-21.

WOOD, A.K.W.; SEHGAL, C.M.; POLANSKY, M. Sonography brightness of the flexor tendons and ligaments in the metacarpal region of horses. **Am. J. Vet. Res.**, v.54, n.12, p.1969-1974, 1993.

WOOD, A.K.W.; SEHGAL, C.M.; REEF, V.B. Three-dimensional sonographic imaging of the equine superficial digital flexor tendon. **Am. J. Vet. Res.**, v.55, n.11, p.1505-1508, 1994.

WOO, S.L.Y.; HILDEBRAND, K.; WATANABE, N.; FENWICK, J.A.; PAPAGEORGIOU, C.D.; WANG, J.H.C. Tissue engineering of ligament and tendon healing. **Clin. Ortop. Rel. Res.**, v.367 (Supl.), p.S312-S323, 1999.

WOO, S.L.Y.; AN, K.N.; FRANK, C.B.; LIVESAY, G.A.; MA, C.B.; ZEMINSKI, J.; WAYNE, J.S.; MYERS, B.S. Anatomy, biology and biomechanics of tendon and ligament. In: BUCKWALTER, J.; EINHORN, T.; SIMON, S. **Orthopaedic basic research**. 2.ed. Rosemont: American Academy of Orthopaedic Surgeons, 2000. p.581-616.

WOO, S.L.Y.; AN, K.N.; ARNOCKY, S.P.; WAYNE, J.S.; FITHIAN, D.C.; MYERS, B.S. Anatomy, biology, and biomechanics of tendon, ligament, and meniscus. In: SIMON, S. (Ed.). **Orthopaedic basic science**. Rosemont: American Academy of Orthopaedic Surgeons, 2004. p. 45-87.

WOO, S.L.Y.; ABRAMOWITZ, S.D.; KILGER, R.; LIANG, R. Biomechanics of knee ligaments: injury, healing, and repair. **J. Biomech.**, v.39, n.1, p.1-20, 2006.

YAMADA, A.L.M.; ALVES, A.L.G.; HUSSNI, C.A.; NICOLETTI, J.L.M.; THOMASSIAN, A.; WATANABE, M.J.; CARNEIRO, R. Avaliação ultrassonográfica de tendinite do flexor digital superficial, induzida experimentalmente em eqüinos. **Ciência Rural**, 2008.

YOSHIKAWA, H.; OISHI, H.; UEKI, H.; MURANAKA, M.; OYAMADA, T.; YOSHIKAWA, T. Distribution of C cells of fractured racehorses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.13, p.9-17, 2002.

YOSHIKAWA, H.; UEKI, H.; MURANAKA, M.; OYAMADA, T.; YOSHIKAWA, T. Distribution of C cells in thyroids and association with age and sex in racing horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.13, p.39-45, 2001.

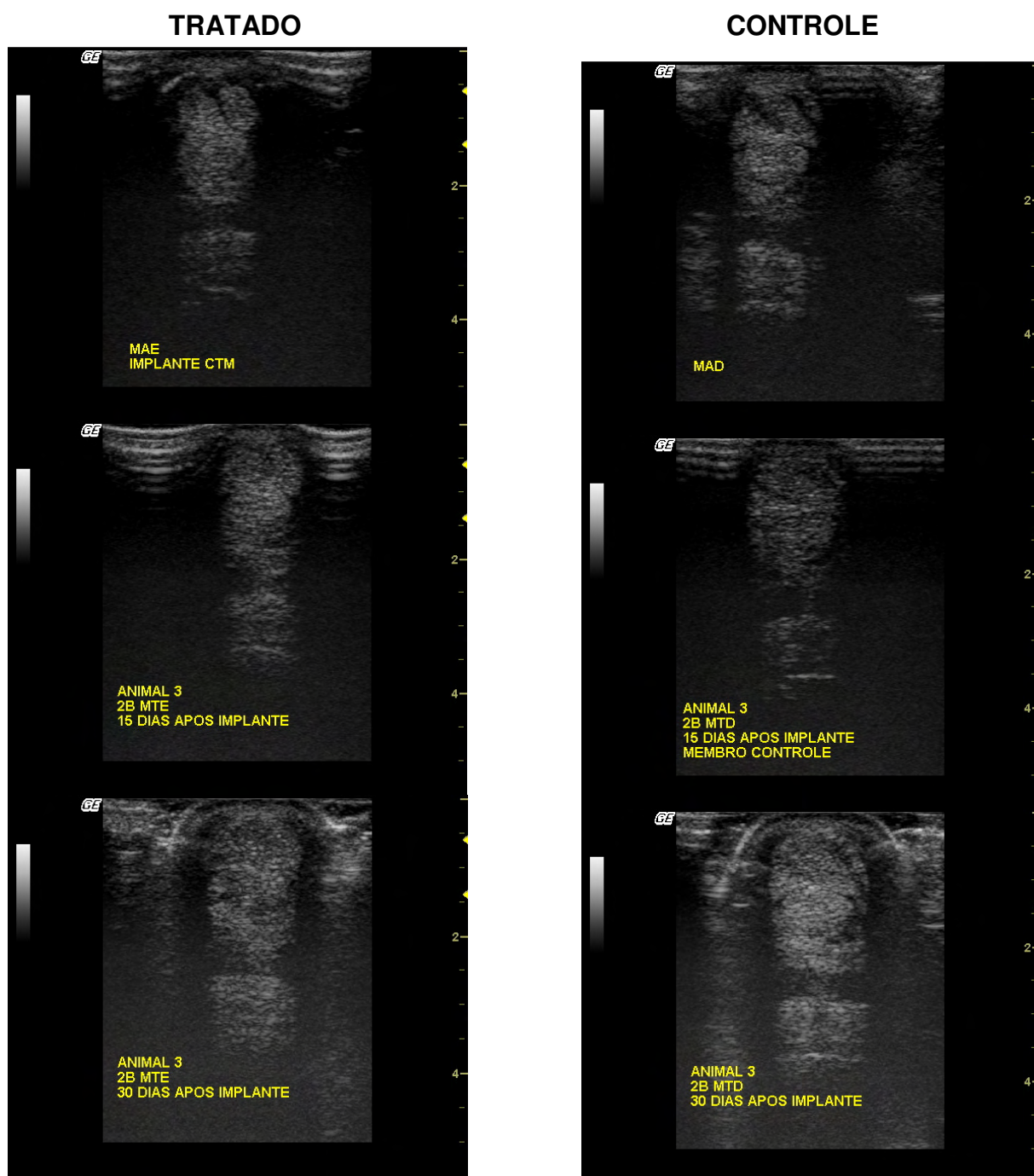
YOUNG, R.G.; BUTLER, D.L.; WEBWE, W.; CAPLAN, A.I.; GORDON, S.L.; FINK, D.J. Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. **J. Orthop. Res.**, v.16, p.406-413, 1998.

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

ZANETTI, M.; METZDORF, A.; KUNDERT, H.P.; ZOLLINGER, H.; VIENNE, P.; SEIFERT, B.; HODLER, J. Achilles Tendons: Clinical Relevance of Neovascularization Diagnosed with Power Doppler US. **Radiology**, v.227, n.2, p.556-560, 2003.

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

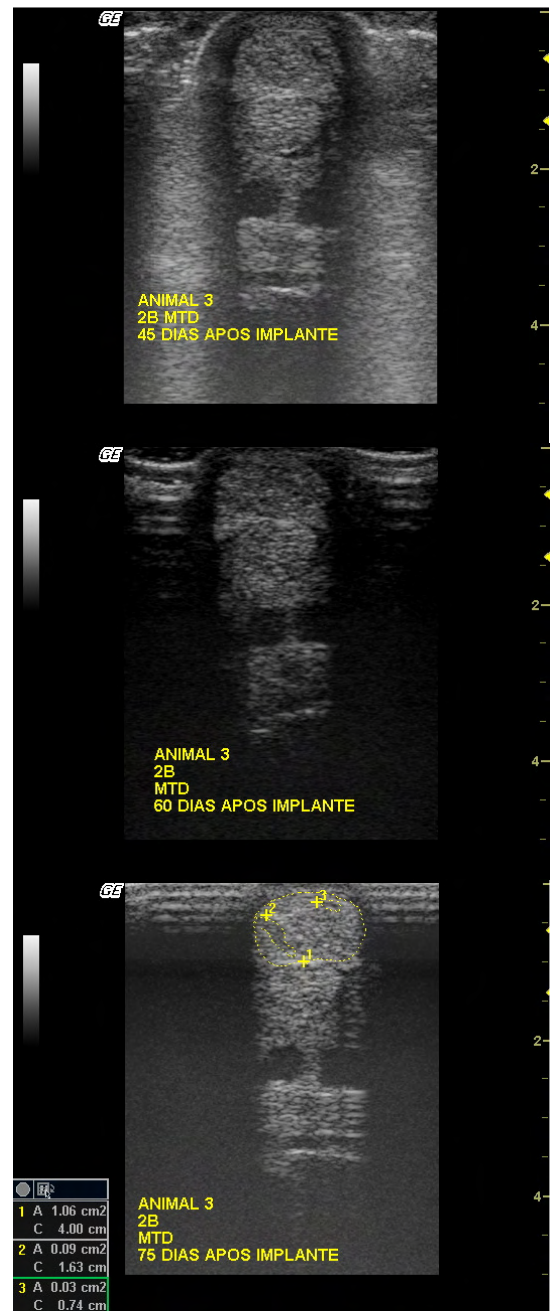
ANEXO 1: Acompanhamento ultrassonográfico do animal 3, corte transversal, aos dias 30, 45, 60, após indução de lesão.



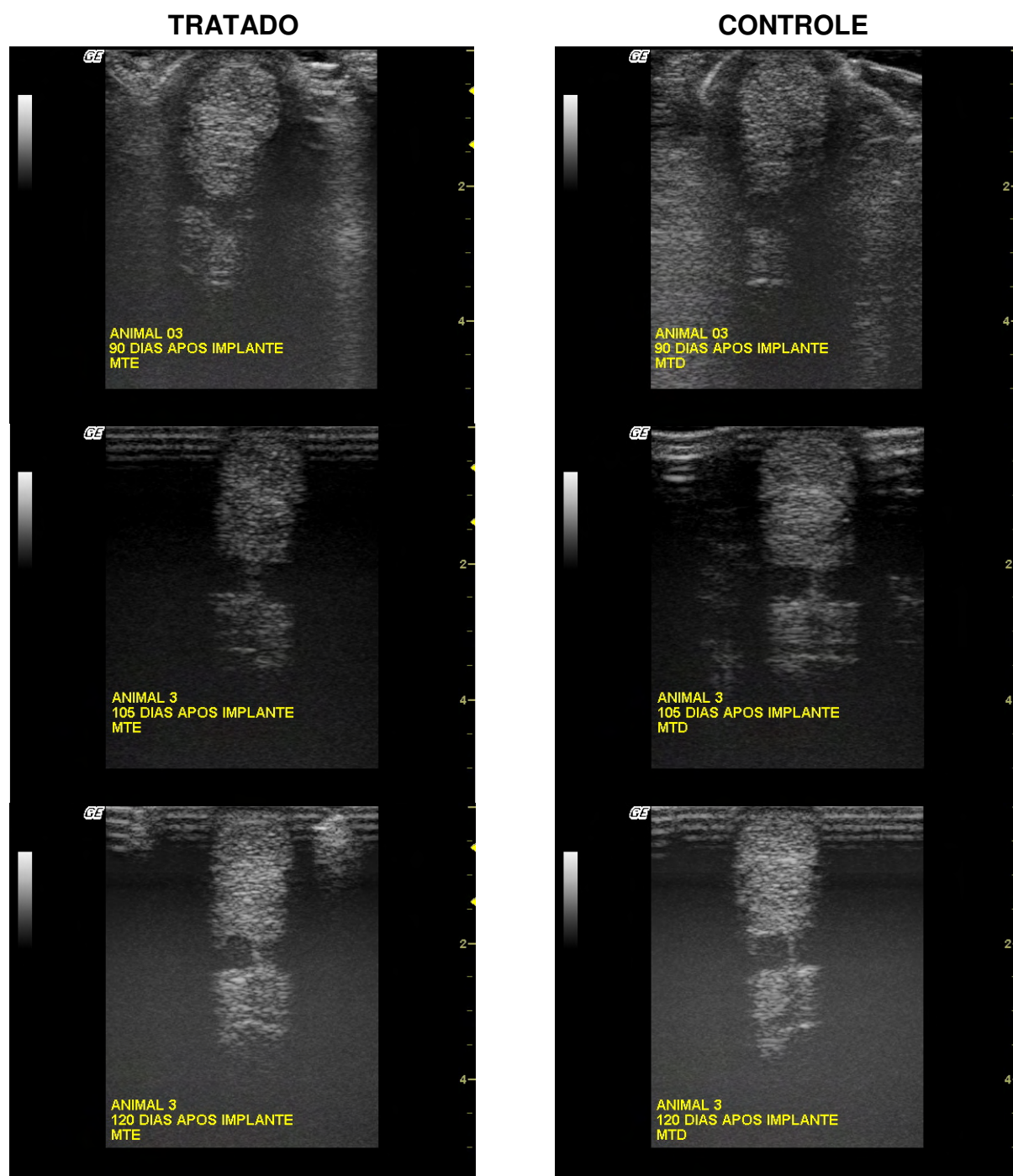
ANEXO 2: Acompanhamento ultrassonográfico do animal 3, corte transversal, aos dias 75, 90 e 105 após indução de lesão.

TRATADO

CONTROLE



ANEXO 3: Acompanhamento ultrassonográfico do animal 3, corte transversal, aos dias 120,135 e 150 após indução de lesão.



ANEXO 4: Instruções aos autores artigos científicos.

1. Original research papers (Full-length, Short Communications and Technical Reports).
2. Review articles (Mini-reviews and full-length Review Articles, and Book Reviews)
3. Scientific meeting Reports

Original research papers:

These should report the results of original research. The material should not have

been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Full-length papers should conform to the traditional format with headings for Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion section.

A Short Communication is a concise but complete description of a limited investigation, which will not be included in a later paper. Short Communications should be as completely documented, both by reference to the literature and description of the experimental procedures employed, as a regular paper. They should not occupy more than 6 printed pages with figures, tables and references (about 12 manuscript pages including no more than a total of 4 figures and tables) and should contain an Abstract of not more than 200 words. Headings should be Introduction, Materials and Methods with the Results and Discussion combined. The maximum total text word count in these sections is 3000.

A Technical Report is a description of:

(A) a new gene or its expressed sequence (mRNA) that is comprehensive at least with regard to the coding sequence or the complete mature expressed protein, with annotation (leader/signal sequence, start, stops, and other features), comparison to other species (e.g. by cladogram, percent similarity of gene and deduced amino acid), evidence of deposition into a publicly available gene bank (e.g. GenBank with accession number); or (B) a new monoclonal antibody that convincingly shows specificity for a new target molecule or allows significant improvement of existing procedures or diagnostics (ELISA, flow

cytometry, Western blotting, tissue sections); or (C) availability of a functional recombinant cytokine or chemokine with clear evidence that it has biological activity commensurate with the native molecule. A Technical Report should not occupy more than 4 printed pages including text with no headings and of not more than 1500 words, no more than 3 figures and tables, an Abstract of not more than 200 words, and References.

Reviews:

Mini-reviews and opinions should cover subjects in specialised areas of veterinary immunology which are either topical, or of emerging importance, or in need of an update. They should not exceed 3000 words and be easy to read. Articles containing provocative opinions and hypotheses not yet firmly supported by experimental evidence should be suitable, provided that any biases expressed are acknowledged by the authors.

Review Articles in a traditional, more comprehensive style are also published in the journal. Authors wishing to submit these, or Mini-reviews/opinions are asked to first submit a title plus abstract for advice on suitability to the Review Articles Editor Dirk Werling Dwerling@RVC.AC.UK.

Book Reviews will be included in the journal on a range of relevant books which are not more than 2 years old.

Meeting Reports

These will be considered for publication. The decision to publish rests purely with the Editors-in-Chief. The subject matter should be within the aims and scope of the journal. Reports may be very brief summaries of recognised International Committee recommendations and decisions, or longer reports of relevant scientific meetings. Special issues containing full papers presented at a conference/workshop will also be considered.

Submission of manuscripts

Submission to *Veterinary Immunology and Immunopathology* now proceeds online via Elsevier Editorial System - <http://ees.elsevier.com/vetimm>. Authors will be guided step-by-step through uploading files directly from their computers. Authors should select a set of classifications for their papers from a given list, as well as a category designation (Original Research Paper, Short Communication, and so on).

Electronic PDF proofs will be automatically generated from uploaded files, and used for subsequent reviewing.

Authors should send queries concerning the submission process or journal procedures to AuthorSupport@elsevier.com. Authors can check the status of their manuscript within the review procedure using Elsevier Editorial System. Authors submitting hard copy papers will be asked to resubmit using Elsevier Editorial System.

Submission of an article is understood to imply that the article is original and is not being considered for publication elsewhere. Submission also implies that all authors have approved the paper for release and are in agreement with its content. Upon acceptance of the article by the journal, the author(s) will be asked to transfer the copyright of the article to the Publisher. This transfer will ensure the widest possible dissemination of information.

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Acknowledgements

All contributors who do not meet the criteria for authorship as defined above should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support. Authors should disclose whether they had any writing assistance and identify the entity that paid for this assistance.

Conflict of interest

At the end of the text, under a subheading "Conflict of interest statement" all authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding.

Role of the funding source

All sources of funding should be declared as an acknowledgement at the end of the text. Authors should declare the role of study sponsors, if any, in the study design, in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. If the study sponsors had no such involvement, the authors should so state.

Ethics

Circumstances relating to animal experimentation must meet the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals as issued by the Council for the International Organizations of Medical Sciences. They are obtainable from: Executive Secretary C.I.O.M.S., c/o WHO, Via Appia, CH-1211 Geneva 27, Switzerland, or at the following URL:

http://www.cioms.ch/frame_1985_texts_of_guidelines.htm. Unnecessary cruelty in animal experimentation is not acceptable to the Editors of *Veterinary Immunology and Immunopathology*.

Sequence data submitted to a publicly accessible database must quote an accession number in the text (Methods section). Patents should also be referenced in the text, if appropriate.

Preparation of manuscripts

1. Manuscripts should be written in English. Authors whose native language is not English are strongly advised to have their manuscripts checked by an Englishspeaking colleague prior to submission.

Language Editing: Elsevier's Authors Home provides details of some companies who

can provide English language and copyediting services to authors who need assistance *before* they submit their article or *before* it is accepted for publication.

Authors should contact these services directly. For more information about language editing services, please email authorsupport@elsevier.com.

Please note that Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our terms & conditions <http://www.elsevier.com/termsandconditions>.

2. Manuscripts should have numbered lines, with wide margins and double spacing throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc., should be numbered. However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

3. Manuscripts in general should be organized in the following order:

Title (should be clear, descriptive and not too long)

Name(s) of author(s)

Complete postal address(es) of affiliations

Full telephone, Fax No. and e-mail address of the corresponding author

Present address(es) of author(s) if applicable

Complete correspondence address including e-mail address to which the proofs should be sent

Abstract

Keywords (indexing terms), normally 3-6 items. Please refer to last index (Vol. 100/3-4).

Introduction

Material studied, area descriptions, methods, techniques

Results

Discussion

Conclusion

Acknowledgements and any additional information concerning research grants, etc.

References

Tables

Figure captions

Tables (separate file(s))

Figures (separate file(s)).

4. Titles and subtitles should not be run within the text. They should be typed on a separate line, without indentation. Use lower-case letter type.

5. SI units should be used.

6. Elsevier reserves the privilege of returning to the author for revision accepted manuscripts and illustrations which are not in the proper form given in this guide.

7. A number of standard accepted abbreviations can be used in the body of a manuscript without further explanation (see list below), but must be explained if used in the Title or Abstract. Non-standard abbreviations should be explained when first used in the Abstract, and again when first used in the body of a manuscript, and should also be explained in an abbreviations list to follow the list of keywords.

List of standard abbreviations:

Ab Antibody

Ag Antigen

AIDS Acquired immunodeficiency syndrome

APC Antigen-presenting cell

BCG Bacillus Calmette Guerin

BSA Bovine serum albumin

C Complement

CFU Colony-forming unit

ConA Concanavalin A

cpm Counts per minute

CSF Colony-stimulating factor

CTL Cytotoxic T lymphocyte

DMSO Dimethylsulfoxide

EDTA Ethylenediaminetetraacetic acid

ELISA Enzyme-linked Immunosorbent assay

Fab Monovalent antigen-binding fragment

F(ab1)2 Divalent antigen-binding fragment
FBS Fetal bovine serum
FCS Fetal calf serum
Fc Γ Receptor for the Fc Γ part of the IgG
FITC Fluorescein Isothiocyanate
H chain Heavy chain of Ig
HIV Human immunodeficiency virus
HLA Human histocompatibility leukocyte antigen
IFN Interferon
Ig Immunoglobulin
IL Interleukin
i.d. Intradermal
i.m. Intramuscular
i.p. Intraperitoneal
IU International unit
i.v. Intravenous
KDD Kilodalton (mol. mass)
KLH Keyhole limpet hemocyanin
L chain Light chain of Ig
LAK Lymphokine-activated killer (cell)
LPS Lipopolysaccharide
mAb Monoclonal antibody
MHC Major histocompatibility complex
MLR Mixed lymphocyte (leukocyte) reaction
M Φ Macrophage
Mr Relative molecular mass
n Number in study or group
ND Not determined
NK Natural killer (cell)
OD Optical density (transmission through turbid suspensions)
OVA Ovalbumin
p Probability
PAGE Polyacrylamide gel electrophoresis
PBL Peripheral blood lymphocytes

Abstracts

The abstract should be clear, descriptive and not longer than 400 words.

Tables

1. Authors should take notice of the limitations set by the size and lay-out of the journal. Large tables should be avoided. Reversing columns and rows will often reduce the dimensions of a table.
2. If many data are to be presented, an attempt should be made to divide them over two or more tables.
3. Tables should be numbered according to their sequence in the text. The text should include references to all tables.
4. Each table should occupy a separate page of the manuscript. Tables should never be included in the text.
5. Each table should have a brief and self-explanatory title.
6. Column headings should be brief, but sufficiently explanatory. Standard abbreviations of units of measurement should be added between parentheses.
7. Vertical lines should not be used to separate columns. Leave some extra space between the columns instead.
8. Any explanation essential to the understanding of the table should be given as a footnote at the bottom of the table.

Illustrations

1. All illustrations (line drawings and photographs) should be submitted as separate files, preferably in TIFF or EPS format.
2. Illustrations should be numbered according to their sequence in the text. References should be made in the text to each illustration.
3. Illustrations should be designed with the format of the page of the journal in mind. Illustrations should be of such a size as to allow a reduction of 50%.
4. Lettering should be big enough to allow a reduction of 50% without becoming illegible. Any lettering should be in English. Use the same kind of lettering throughout and follow the style of the journal.
5. If a scale should be given, use bar scales on all illustrations instead of numerical scales that must be changed with reduction.

6. Each illustration should have a caption. The captions to all illustrations should be typed on a separate sheet of the manuscript.

PBMC Peripheral blood mononuclear cells

PCR Polymerase chain reaction

PBS Phosphate-buffered saline

PHA Phytohemagglutinin

PKC Protein kinase C

PMA Phorbol 12-myristate 13-acetate

PMN Polymorphonuclear (cell, leukocyte)

PPD Purified protein derivative of tuberculin

PWM Pokeweed mitogen

r Recombinant

R Receptor (e.g. IL-2R)

RBC Red blood cells

RFLP Restriction fragment length polymorphism

RIA Radioimmunoassay

RNase Ribonuclease

s.c. Subcutaneous

SD Standard deviation

SDS Sodium dodecyl sulfate

SEM Standard error of the mean

SRBC Sheep red blood cells

SV40 Simian virus 40

TCR T cell receptor

Th T helper (cell)

TGF Transforming growth factor

TNF Tumor necrosis factor

Ts T suppressor (cell)

U Unit

V region Variable region

1°, 2°, 3° Primary, secondary, tertiary

2-D Two dimensional

3-D Three dimensional

7. Explanations should be given in the figure legend(s). Drawn text in the illustrations should be kept to a minimum.

8. Photographs are only acceptable if they have good contrast and intensity.

9. If you submit usable colour figures, Elsevier would ensure that these figures appeared free-of-charge in colour in the electronic version of your accepted paper, regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. Colour illustrations can only be included in print if the additional cost of reproduction is contributed by the author: you would receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.

Please note that because of technical complications which may arise by converting colour figures to 'grey scale' (for the printed version, should you not opt for colour in print), you should submit in addition usable black and white figures corresponding to all colour illustrations.

10. Advice on the preparation of illustrations can be found at the following URL:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

Preparation of supplementary data

Elsevier now accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published free of charge online alongside the electronic version of your article in Elsevier web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data are provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

References

1. All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. The manuscript should be carefully

checked to ensure that the spelling of author's names and dates are exactly the same in the text as in the reference list.

2. In the text refer to the author's name (without initial) and year of publication, followed – if necessary – by a short reference to appropriate pages. Examples: "Since Peterson (1988) has shown that..." "This is in agreement with results obtained later (Kramer, 1989, pp. 12–16)".

3. If reference is made in the text to a publication written by more than two authors the name of the first author should be used followed by "et al.". This indication, however, should never be used in the list of references. In this list names of first author and co-authors should be mentioned.

4. References cited together in the text should be arranged chronologically. The list of references should be arranged alphabetically on author's names, and chronologically per author. If an author's name in the list is also mentioned with coauthors the following order should be used: publications of the single author, arranged according to publication dates – publications of the same author with one co-author – publications of the author with more than one co-author. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 1974a, 1974b, etc.

5. Use the following system for arranging your references:

a. *For periodicals*

Harp, J.A., Walters, T.E., Goff, J.P., 2004. Lymphocyte subsets and adhesion molecule expression in milk and blood of periparturient dairy cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 102, 9-17.

b. *For edited symposia, special issues, etc., published in a periodical* Miller, L.C., Fox, J.M., 2004. Apoptosis and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. In: Murtaugh, M.P., Rowland, R.R.R. (Eds), *Immunology and Immunopathology of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS)*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 102, 131-142.

c. *For books*

Gershwin, M., Naguwa, S., 2005. *Allergy and Immunology Secrets*, Elsevier, 352 pp.

d. *For multi-author books*

Butler, J.E., 1981. A concept of humoral immunity among ruminants and an approach to its investigation. In: Butler, J.E., Nielson, K., Duncan, J.R. (Eds.), The

Ruminant Immune System, Plenum Press, New York, pp. 3-55.

6. Abbreviate the titles of periodicals mentioned in the list of references in accordance with BIOSIS Serial Sources, published annually by BIOSIS. The correct abbreviation for this journal is *Vet. Immunol. Immunopathol.*

7. In the case of publications in any language other than English, the original title is to be retained. However, the titles of publications in non-Latin alphabets should be transliterated, and a notation such as "(in Russian)" or "(in Greek, with English abstract)" should be added.

8. Work accepted for publication but not yet published should be referred to as "in press".

9. References concerning unpublished data and "personal communications" should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text.

10. Web references may be given. As a minimum, the full URL is necessary. Any further information, such as Author names, dates, reference to a source publication and so on, should also be given.

11. Articles available online but without volume and page numbers may be referred to by means of their Digital Object identifier (DOI) code.

Formulae

1. Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used.

2. For simple fractions use the solidus (/) instead of a horizontal line.

3. Equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. In general only equations explicitly referred to in the text need be numbered.

4. The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Also powers of e are often more conveniently denoted by exp.

5. Levels of statistical significance which can be mentioned without further explanation are * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.

6. In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g., Ca^{2+} not as Ca^{++} .

7. Isotope numbers should precede the symbols, e.g., ^{18}O .
8. The repeated writing of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound are being described as the end product of a gravimetric determination (e.g., phosphate as P_2O_5).

Footnotes

1. Footnotes should only be used if absolutely essential. In most cases it should be possible to incorporate the information in normal text.
2. If used, they should be numbered in the text, indicated by superscript numbers, and kept as short as possible.

Nomenclature

1. Authors and editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the *International Code of Botanical Nomenclature*, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature*.
2. All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.
3. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.
4. For chemical nomenclature, the conventions of the *International Union of Pure and Applied Chemistry* and the official recommendations of the *IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature* should be followed.

Copyright

If excerpts from other copyrighted works are included, the Author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article.

Elsevier has preprinted forms for use by Authors in these cases: contact Elsevier's

Rights Department, Oxford, UK: phone (+1) 215 239 3804 or +44(0)1865 843830, fax +44(0)1865 853333, e-mail healthpermissions@elsevier.com.

Requests may also be completed online via the Elsevier homepage

<http://www.elsevier.com/permissions>.

Material in unpublished letters and manuscripts is also protected and must not be published unless permission has been obtained.

Upon acceptance of an article, authors will be asked to sign a "Journal Publishing

Agreement"(for more information on this and copyright see

<http://www.elsevier.com/authors>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail (or letter) will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a Journal Publishing Agreement form.

Authors Rights

As an author you (or your employer or institution) may do the following:

- make copies (print or electronic) of the article for your own personal use, including for your own classroom teaching use
- make copies and distribute such copies (including through e-mail) of the article to research colleagues, for the personal use by such colleagues (but not commercially or systematically, e.g., via an e-mail list or list server)
- post a pre-print version of the article on Internet websites including electronic preprint servers, and to retain indefinitely such version on such servers or sites
- post a revised personal version of the final text of the article (to reflect changes made in the peer review and editing process) on your personal or institutional website or server, with a link to the journal homepage (on elsevier.com)
- present the article at a meeting or conference and to distribute copies of the article to the delegates attending such a meeting
- for your employer, if the article is a 'work for hire', made within the scope of your employment, your employer may use all or part of the information in the article for other intra-company use (e.g., training)
- retain patent and trademark rights and rights to any processes or procedure described in the article
- include the article in full or in part in a thesis or dissertation (provided that this is not to be published commercially)

- use the article or any part thereof in a printed compilation of your works, such as collected writings or lecture notes (subsequent to publication of your article in the journal)
 - prepare other derivative works, to extend the article into book-length form, or to otherwise re-use portions or excerpts in other works, with full acknowledgement of its original publication in the journal
- Funding body agreements and policies Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors who publish in Elsevier journals to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>).

Proofs

One set of page proofs will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post). Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 available free from

<http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs. The exact system requirements are given at the Adobe Site:

<http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post.

Only typesetter's errors may be corrected; no changes in, or additions to, the edited manuscript will be allowed.

Elsevier will do everything possible to get your article corrected and published as quickly and accurately as possible. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication. Subsequent corrections will not be possible, so please ensure your first sending is complete.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, be provided with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

Author Services

Questions arising after acceptance of the manuscript, especially those relating to proofs, should be directed to Elsevier Ireland, Elsevier House, Brookvale Plaza, East

Park, Shannon, Co. Clare, Ireland, Tel.: (+353) 61 709600, Fax: (+353) 61 709111/113.

Authors can also keep a track of the progress of their accepted article, and set up email alerts informing them of changes to their manuscript's status, by using the Copyright © 2009 Elsevier B.V. All rights reserved. "Track your accepted article" option on the journal's homepage <http://www.elsevier.com/locate/vetimm> For privacy, information on each article is password-protected. The author should key in the "Our Reference" code (which is in the letter of acknowledgement sent by the Publisher on receipt of the accepted article) and the name of the corresponding author.

Anexo 5: Trabalho enviado para publicação.

Veterinary Immunology and Immunopathology

Isolation and immunophenotypic characterization of mesenchymal stem cells derived from equine species adipose tissue

Armando de Mattos Carvalho¹

Ana Liz Garcia Alves¹

Marjorie Assis Golim²

Andrei Moroz²

Carlos Alberto Hussni¹

Patrícia Galvão Gomes de Oliveira¹

Elenice Deffune²

¹ Department of Veterinary Surgery and Anesthesiology, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University, Botucatu, São Paulo, Brazil.

²Blood Center, Botucatu Medical School, São Paulo State University, Botucatu, São Paulo, Brazil.

Corresponding author: Armando de Mattos Carvalho, Department of Veterinary Surgery and Anesthesiology, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brazil, Rubião Júnior, no number, zip code: 560, telephone: (5514) 38116252, fax: (5514) 38116072, e-mail: armandomc@fmvz.unesp.br

Abstract

The purpose of this work was to isolate and cultivate mesenchymal stem cells (MSC) derived from equine adipose tissue and conduct cellular characterization with the following markers: CD90, CD44 and CD13. Adipose tissue collection was performed at the base of the horses' tails, followed by immediate isolation and cultivation of the MSC and posterior characterization by flow cytometry for the interspecies reaction test using mouse anti-rat CD90 monoclonal antibody (mAb), fluorescein isothiocyanate (FITC), and tests with specific mAb mouse anti-horse CD13 and mouse anti-horse CD44. The technique used for isolation and cell cultivation proved to be safe and viable. The CD90 mAb expressed cross reaction with MSC derived from equine adipose tissue and CD44 showed greater expression in cells as the number of culture passages increased. Although marker CD13 expresses reaction in other studies involving MSC in different species, it presented no expression in the experiment realized. The results obtained revealed the immunophenotypic characterization of the surface of isolated and cultivated MSC, classifying these cells as a promising type of progenitor cells that can be applied in equine cellular therapy.

Keywords: immunophenotypic characterization; equine; adipose tissue; mesenchymal stem cells

1. Introduction

Isolation of MSC derived from equine species has been reported in a number of different tissues, including bone marrow (Smith et al., 2003), fat tissue (Vidal et al., 2007), umbilical cord blood (Koch et al., 2007) and peripheral blood (Koerner et al., 2006). Equine MSC derived from adipose tissue show the capacity to differentiate appropriate culture conditions using specific hormones and growth factors in mesodermal tissue lines, such as bone, cartilage and fat (Vidal et al., 2007).

In the equine species, several research groups worldwide are studying the use of cellular therapy in the treatment of tendinitis, involving different sources of stem cells, such as the mononuclear fraction of bone marrow (Barreira et al., 2008), MSC culture derived from bone marrow and implantation of MSC derived from adipose tissue (Fortier and Smith, 2008). The efficacy and safety of these treatments and the basic characteristics of stem cells used remain largely unknown (Koch et al., 2008).

The stromal vascular fraction cells of adipose tissue have received growing attention from researchers due to their relative abundance, ease of acquisition and high proliferative capacity with great potential for differentiation into multi-line cells (De Ugarte et al., 2003).

Stromal cells derived from adipose tissue present positive expression for the following surface markers: CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD49 (d), CD49 (e), CD54, CD55, CD59, CD73, CD90, CD105, CD106, CD146 and CD166 (Schäffler and Büchler, 2007).

Minimum criteria for the characterization of human MSC were created. These should present adherence to the plastic when maintained under culture conditions, express the markers CD105, CD73 and CD90, present no expression for the markers CD45, CD34, CD14 or CD11b, CD79a or CD19 and the HLA-DR surface molecules, and present the capacity to differentiate into osteoblasts, adipocytes and chondroblasts *in vitro* (Dominici et al., 2006).

Independent research groups have obtained highly compatible, though not identical, profiles of the expression of surface proteins of adult stem cells derived from adipose tissue. Certain discrepancies exist, for example, a study by Gronthos et al., (2001) detected CD34 and CD106 in adipose tissue-derived adult stem cells, while Zuk et al., (2001) did not obtain the same result.

One major difficulty in characterizing MSC cells in veterinary medicine is due to the low number of specific monoclonal antibodies available and evidence that certain markers from other species do not present a cross reaction with the equine species (Taylor et al. 2007). A study by Mambelli et al. (2009), did not obtain reactivity between the human MSC marker CD29 and MSC derived from equine adipose tissue.

The objectives of present work were the isolation and immunophenotypic characterization of the surface of MSC derived from equine adipose tissue. An expressive number of specific MSC markers for the equine species are not yet available; thus, the interspecies reaction test was conducted using mouse anti-rat CD90- FITC (Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA) monoclonal antibody, as well as tests with specific monoclonal antibodies mouse anti-horse CD13 (AbD Serotec, Kidlington, Oxford, UK) and mouse anti-horse CD44 (AbD Serotec, Kidlington, Oxford, UK).

2. Materials and methods

The experimental protocol was approved by the Committee of Ethics and Animal Welfare of the School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University, Brazil, and was performed under international guidelines for the care and use of experimental animals. Eight mares of undefined breed, aged between 2 and 3 ½ years-old, were used.

2.1 Adipose Tissue Harvest

The region above the dorsal gluteal muscle, at the base of the tail, was chosen as the adipose tissue collection site due to the availability of the material, the absence of large veins and easy access. The mares were sedated with xylazine (1mg/kg, i.v.) followed by infiltration of the skin and subcutaneous tissues with anesthetic 2% lidocaine chloride using an inverted L-block. An incision of approximately 10cm in length was performed parallel to and approximately 15cm below the spinal column, permitting visualization of a layer of adipose tissue between the skin and musculature. Approximately 5mL of adipose tissue was collected and stored in a sterile 50mL conic tube containing RPMI-1640 medium (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA),

such that the sample was entirely immersed. The skin was sutured with nylon suture in simple separated stitches.

2.2 Isolation of stromal vascular fraction cells

After acquiring the sample materials, these were submitted to successive washes with PBS in sterile Falcon tubes. In order to isolate the cells, the extra cellular matrix was then delicately submitted to mechanical separation using a no. 15 scalpel blade and the digestive action of 0.02% of type I collagenase (Gibco, Grand Island, NY, USA) in RPMI-1640 medium, in a humidified heater at 37°C, under 5% CO₂ for 12 h, followed by neutralization of the enzyme with Knockout DMEM (Dulbecco`s modified Eagle`s medium, Gibco, Grand Island, NY, USA) containing 10% FBS. This solution was centrifuged with a relative centrifugal force (RCF) of 260g for 10 min and the supernatant was aspirated and added to PBS and homogenized for future centrifugation. Following this procedure, the number of cells was quantified in a hemocytometer to evaluate cellular viability by the Trypan Blue 0.02% (Gibco, Grand Island, NY, USA) exclusion test.

2.3 Cell cultivation

The cell culture plates were maintained in a heater at 37°C and 5.0% CO₂ and the cultured medium used was Knockout DMEM and 10% FBS (Fig. 1a). The medium was changed every three days and when minimum confluence of 70% of the plate occurred (Fig. 1b), trypsinization was conducted, based on a technique previously described in horses (Vidal et al. 2007). 100 µL was collected and transferred to a hemolysis tube for cell counts, where the number of cells was quantified by hemocytometer to evaluate cellular viability by the Trypan Blue exclusion test. The remainder was transferred to three 25cm² culture plates that were further incubated at 37°C and 5.0% CO₂. Cell cultivation was maintained up to the fourth passage using samples from one horse and up to the second passage for the remaining horses, after which cell counts and MSC characterization were conducted.

2.4 Flow cytometry analysis

Flow cytometry was performed in FACSCalibur (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) equipment from the first to the fourth passage using the mouse anti-rat CD90-FITC mAb, to evaluate interspecies expression, and the specific

monoclonal antibodies mouse anti-horse CD13 and mouse anti-horse CD44, which were marked with goat anti-mouse IgG-FITC IgG (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) secondary mAb (Fig. 2).

3. Results and discussion

The technique used for the isolation and cultivation of MSC derived from equine adipose tissue proved to be safe and viable regarding the expansion of cell numbers. Flow cytometry analysis revealed the expression of CD90 in all the passages tested (1st - 4th), determining interspecies cross reaction between rat and horse. CD44 also expressed a reaction with MSC in all the passages; however, greater expression was observed as the number of passages increased. In relation to analysis of the surface marker CD13, no reaction was obtained with MSC derived from equine adipose tissue (Table 1). Analysis of the results of markers CD90 and CD44 revealed compatibility with the results obtained in experiments using MSC derived from human adipose tissue (Dickera et al., 2005; Mitchell et al., 2006; Kern et al., 2006; Tapp et al., 2009). Marker CD13 also expressed when used on fresh vascular fraction cells and those derived from human adipose tissue, according to studies by (Schäffler & Büchler 2007; Mitchell et al., 2006; Kern et al., 2006; Tapp et al., 2009). However, in this work, it presented no reaction, showing incompatibility with the data obtained in studies performed on human tissue. A specific monoclonal antibody to identify mesenchymal stem cells is not yet available; thus, it is important to conduct such characterization using the largest number of markers that present a reaction (CD44, CD90 and CD105) and that present no reaction (CD34 and CD45). No test using a negative marker was performed in this study due to the lack of a specific marker for the equine species, which makes the information regarding negative expression inconclusive at this time.

The study revealed that cultivated MSC derived from equine adipose tissue show similar characterization in these cells to markers used in studies involving other species; however, no correlation was determined when marker CD13 was used for immunophenotypic characterization of the surface of MSC. This discrepancy could be explained by the different cell isolation methods used, the period of cell culture prior to analysis, the use of monoclonal antibodies detecting different epitopes of the same surface protein and

different degrees of sensitivity used during flow cytometry analysis (Gimble and Guilak, 2003).

Our data, taken together with previously published, strongly suggest that stem cells isolated from equine adipose tissue are a promising candidate for cellular therapy in equine veterinary medicine. These findings will also provide biological, technical, and procedural knowledge for further studies toward technological advance in cellular therapy on horse health.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (process 07-53496-2).

References

Barreira, A.P.B., Alves, A.L.G., Saito, M., Amorim, R.L., Kohayagawa, A., Menarim, B.C., Mota, L.S., 2008. Autologous implant of bone marrow mononuclear cells as treatment of induced equine tendinitis. *Intern J Appl Res Vet Med.* 6,46-54.

De Ugarte, D.A., Alfonso, Z., Zuk, P.A., Elbarbary, A., Zhu, M., Ashjian, P., Benhaim, P., Hedrick, M.H., Fraser, J.K., 2003. Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. *Immunology Letters.* 89,267-270.

Dickera, A., Blanck, K.L., Aströma, G.A., Van Harmelen, V., Götherström, C., Blomqvist, L., Arner, P., Rydén, M., 2005. Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue. *Experimental Cell Research.* 308,283-290.

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Krause, D.S., Deans, R.J., Keating, D.J., Prockop, R.J., Horwitz, E.M., 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 8,315-317.

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

Gimble, J.M., Guilak, F., 2003. Adipose-derived adult stem cells: isolation characterization, and differentiation potential. *Cytoterapy.* 5,362-369.

Giovannini, S., Brehm, W., Mainini-Varlet, P., Nestic, D., 2007. Multilineage differentiation potential of equine blood-derived fibroblast-like cells. *Differentiation.* 76,118-129.

Gronthos, S., Franklin, D.M., Leddy, H.A., Robey, P.G., Storms, R.W., Gimble, J.M., 2001. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J. Cell Physiology.* 189,54-63.

Kern S., Eichler H., Stoeve, J., Klüter, H., Bieback, K., 2006. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells.* 24,1294-1301.

Koch T.G., Berg L.C., Betts D.H. 2008. Concepts for the clinical use of stem cells in equine medicine. *Can Vet J.* 49,1009-1017.

Koch, T.G., Heerkens, T., Thomnsen, P.D., Betts D.H., 2007. Isolation of mesenchymal stem cells from equine umbilical cord blood. *BMC Biotechnology.* 7, 26.

Mambelli L.I., Santos E.J.C., Frazão P.J.R., Lislely I., Chaparro, M.B., Kerkis, A., Zoppa, A.L.V., Kerkis, I., 2009. Characterization of equine adipose tissue-derived progenitor cells before and after cryopreservation. *Tissue Engineering: Part C.* 15,87-94.

Mitchell J.B., Micintosh K., Zvonic S., Garrett, S, Floyd, Z.E., Kloster. A., Halvorsen, Y.D., Storms R.W., Goh, B., Kilroy, G., Wu, X., Gimble, J.M., 2006. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in

stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells*. 24,376–385.

Schäffler A., Büchler C., 2007. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells-basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells*.25, 818-827.

Tapp H., Hanley E.N.J., Patt J.C., Gruber, H.E., 2009. Adipose-derived stem cells: characterization and current application in orthopaedic tissue repair. *Experimental Biology and Medicine*. 234,1-9.

Taylor S.E., Smith R.K.W., Clegg P.D., 2007. Mesenchymal stem cell therapy in equine musculoskeletal disease: scientific fact or clinical fiction? *Equine Vet J*. 39,172-180.

Vidal, M.A., Kilroy, G.E., Lopez M.J., Johnson, J.R., Moore, R.M., Gimble, J.M., 2007. Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Veterinary Surgery*. 36,613-622.

Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H., Huang, J., Futrell, J.W., Katz, A.J., Benhaim, P., Lorenz H.P., Hedrick, M.H., 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering*.7,211-228.

Tables

Expression of MSC derived from equine adipose tissue				
Marker	P0	P1	P2*	P3*
CD 13	6.31% ±4.95	6.30% ± 3.27	2.08%	2.82%
CD 44	45.23% ± 40.01	70.33% ± 29.62	30.63%	75.85%
CD90	95.15% ± 2.90	95.15% ± 3.71	90.84%	95.49%

Table 1. P0, 1st passage; P1, 2nd passage; P2, 3rd passage; P3, 4th passage; *test performed only on samples from one horse.

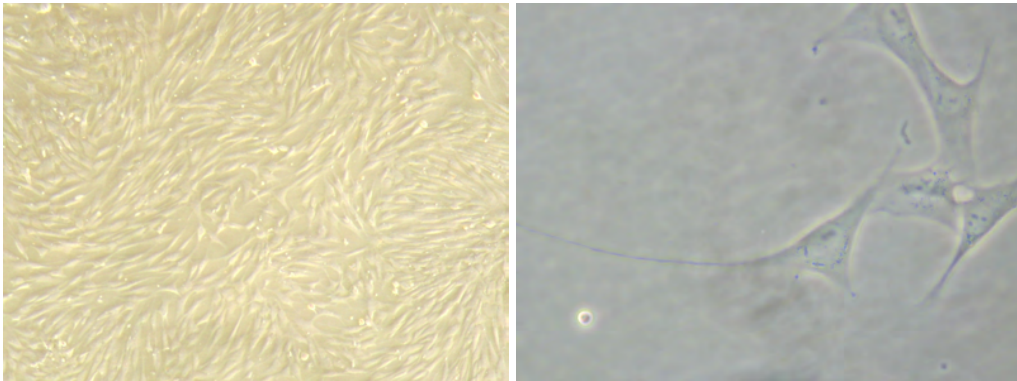
Figure captions

Fig. 1. (a) Image of MSC derived from equine adipose tissue in the 2nd passage with 70% confluence, prior to trypsinization. (b) MSC presenting fibroblastoid characteristics and adherence to the plastic.

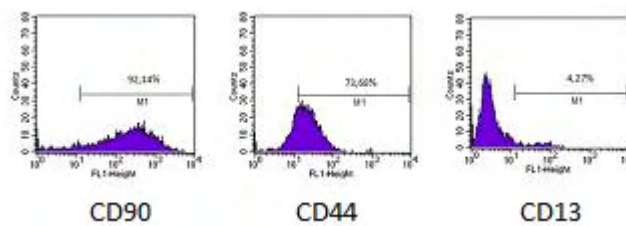


Fig. 2. Immunophenotypic analysis of MSC derived from equine adipose tissue. Histogram representing the flow cytometry performed on the MSC in the 1st passage using the following markers: CD90, CD 44 and CD13.