

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

**IMPLANTE AUTÓLOGO DE CÉLULAS MONONUCLEARES
PROVENIENTES DE MEDULA ÓSSEA NO TRATAMENTO
DE TENDINITES INDUZIDAS EXPERIMENTALMENTE EM
EQÜINOS: AVALIAÇÃO A LONGO PRAZO – 120 DIAS.**

PATRICIA GALVÃO GOMES DE OLIVEIRA

Botucatu - SP
Junho 2008

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

**IMPLANTE AUTÓLOGO DE CÉLULAS MONONUCLEARES
PROVENIENTES DE MEDULA ÓSSEA NO TRATAMENTO
DE TENDINITES INDUZIDAS EXPERIMENTALMENTE EM
EQÜINOS: AVALIAÇÃO A LONGO PRAZO – 120 DIAS.**

PATRICIA GALVÃO GOMES DE OLIVEIRA

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

Orientadora: Profa. Ana Liz Garcia Alves

Botucatu – SP
Junho 2008

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

Oliveira, Patrícia Galvão Gomes de.

Implante autólogo de células mononucleares provenientes de medula óssea no tratamento de tendinites induzidas experimentalmente em eqüinos: avaliação a longo prazo – 120 dias / Patrícia Galvão Gomes de Oliveira. – Botucatu : 164 p., 2008

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2008.

Orientador: Ana Liz Garcia Alves

Assunto CAPES: 50500007

1. Eqüino - Doenças - Estudos experimentais 2. Tendinite

CDD 636.10896

Palavras-chave: Eqüino; Célula tronco; Fração mononuclear; Medula óssea; Tendão

Composição da Banca Examinadora

Profa. Ana Liz Garcia Alves

Prof. Sergio Luis Felisbino

Profa. Raquel Yvonne Arantes Baccarin

DEDICATÓRIA

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

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

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

Aos meus pequenos Haroldo e Meg, pelo amor incondicional dos meus animais.

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

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Ana Liz Garcia Alves, profissional admirável e pessoa gentil, que me deu a oportunidade de desenvolver um trabalho apaixonante. Sua capacidade e dedicação ao trabalho serão sempre um exemplo para mim.

Aos pós graduandos Veridiana, Brunna, Marcos, Armando, Roberta e Alexandre, por serem sempre prestativos, pela ajuda em todos os momentos, e principalmente, pelo companheirismo.

Aos residentes Guilherme, Ana Lúcia, Rodrigo e Mayra sempre dispostos a auxiliar no desenvolvimento do projeto. Não diferente, aos alunos de iniciação científica Karoline e Leandro, que sempre cuidaram dos animais e se interessaram por aprender.

Aos funcionários Zitão e Melissa, muito gentis e colaboradores. Obrigada pela paciência na rotina.

À Profa. Dra. Renée Laufer Amorim, pela importante cooperação, juntamente com a sua equipe, para a realização dos histopatológicos e imunoistoquímicas.

À Profa. Ligia de Souza Mota, prontamente disposta a nos ceder seu Laboratório de Pesquisas do Departamento de Genética do Instituto de Biociências.

À FAPESP, pela concessão de bolsa para Mestrado.

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

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE ANEXOS	
RESUMO	
ABSTRACT	
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	04
2.1 ESTRUTURA E FUNÇÃO DOS TENDÕES	04
2.2 FISIOPATOLOGIA DA TENDINITE	06
2.3 TRATAMENTO DAS TENDINITES	10
2.3.1 Tratamentos Atuais	10
2.3.2 Tratamentos com Células Tronco (CT)	13
2.3.3 Fontes de Células Tronco	16
2.3.4 Punção Aspirativa de Medula Óssea em Eqüinos	19
2.3.5 Separação da Fração Mononuclear	23
2.4 AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE REPARAÇÃO	24
2.4.1 Avaliação Clínica e Ultra-Sonográfica	24
2.4.2 Avaliação Histopatológica e Imunoistoquímica	27
2.5 EXAME ULTRA-SONOGRÁFICO POWER DOPPLER	28
3. OBJETIVOS	29
4. MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS	30
4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	30
4.3 ADMINISTRAÇÃO DE COLAGENASE	31
4.4 PUNÇÃO ASPIRATIVA DE MEDULA ÓSSEA	32
4.5 SEPARAÇÃO DA FRAÇÃO MONONUCLEAR	34
4.6 IMPLANTE DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA	36
4.7 ATIVIDADE FÍSICA	36
4.8 ACOMPANHAMENTO FÍSICO E ULTRA-SONOGRÁFICO	37
4.9 AVALIAÇÃO POR ULTRA-SONOGRAFIA POWER DOPPLER	38

4.10 BIÓPSIA	38
4.11 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA	39
4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
5. RESULTADOS	42
5.1 TÉCNICAS DE MANIPULAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS	42
5.1.1 Administração de Colagenase	42
5.1.2 Punção Aspirativa de Medula Óssea	43
5.1.3 Separação da Fração Mononuclear	44
5.1.4 Implante das Células da Fração Mononuclear	46
5.2 ANÁLISE DO REPARO TENDÍNEO	48
5.2.1 Avaliação Clínica	48
5.2.2 Análise Ultra-Sonográfica	53
5.2.3 Avaliação por Ultra-Sonografia Power Doppler	62
5.2.4 Biópsia	65
5.2.5 Análise Histopatológica e Imunoistoquímica	65
6. DISCUSSÃO	71
6.1 TÉCNICAS DE MANIPULAÇÃO DAS CÉLULAS MESENQUIMAIS	71
6.1.1 Punção Aspirativa de Medula Óssea	71
6.1.2 Separação da Fração Mononuclear	72
6.1.3 Implante das Células da Fração Mononuclear de Medula Óssea	74
6.2 ANÁLISE DO REPARO TENDÍNEO	75
6.2.1 Análise Clínica e Ultra-Sonográfica	75
6.2.2 Avaliação por Ultra-Sonografia Power Doppler	80
6.2.3 Análise Histopatológica e Imunoistoquímica	81
7. CONCLUSÕES	88
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Imagem ultra-sonográfica de uma lesão induzida experimentalmente no TFDS, cortes longitudinal e transversal.	07
FIGURA 2: Imagem ultra-sonográfica de uma lesãooclínica no TFDS, cortes longitudinal e transversal.	07
FIGURA 3: Esquema do delineamento experimental. GA- grupo tratamento; GB- grupo controle; US- avaliação ultra-sonográfica.	31
FIGURA 4: Punção de medula óssea.	34
FIGURA 5: Agulha utilizada (modelo Komiyashiki).	34
FIGURA 6: Seta indica o local da punção, realizada na região de 5ª esternebra.	34
FIGURA 7: Etapas da separação da fração mononuclear. a) filtração e diluição da amostra com PBS; b) frasco Histopaque utilizado; b) amostra depositada sobre Histopaque®; d) formação do halo esbranquiçado (seta) contendo células mononucleares.	35
FIGURA 8: Aumento de volume observado após 3 dias da aplicação de colagenase.	43
FIGURA 9: Amostra de medula óssea depositada em placa de Petri.	44
FIGURA 10: Teste de viabilidade celular com azul de tripan (%). Seta vermelha indica célula não viável; setas amarelas mostram células viáveis.	45
FIGURA 11: A seta indica uma provável célula mesenquimal, com seus prolongamentos (HE 1000X).	46
FIGURA 12: Visualização da agulha no interior do TFDS. Imagem feita com aparelho GE LOGIQ 3.	47
FIGURA 13: Imagem ultra-sonográfica nos momentos pré (esquerda) e pós (direita) implante celular.	47

FIGURA 14: Perfis individuais (linha negra) e médios (linha vermelha) do escore de claudicação ao longo das avaliações.	48
FIGURA 15: Membro apresenta aumento de volume no momento da biópsia, aos 120 dias do experimento.	50
FIGURA 16: Perfil médio do perímetro da canela ao longo das avaliações dos grupos tratado e controle.	52
FIGURA 17: Perfis médios da área do tendão (cm ²) ao longo das avaliações dos grupos tratado e controle.	54
FIGURA 18: Perfis médios da área da lesão (cm ²) ao longo das avaliações dos grupos tratado e controle.	56
FIGURA 19: Perfis médios da porcentagem (%) da área lesada ao longo das avaliações dos grupos tratado e controle.	58
FIGURA 20: Perfis individuais (linha preta) e médios (linha vermelha) do grau de ecogenicidade ao longo das avaliações dos grupos tratado e controle.	60
FIGURA 21: Perfis médios da porcentagem (%) de redução da lesão ao longo das avaliações dos grupos tratado e controle.	62
FIGURA 22: Exame US Power Doppler membro controle: a) 40 dias; b) 90 dias; c) 120 dias.	64
FIGURA 23: Exame US Power Doppler membro tratado: a) 40 dias; b) 90 dias; c) 120 dias.	64
FIGURA 24: Acesso ao TFDS. Grande presença de fibrose pode ser observada. O tendão é apresentado com auxílio de pinça, e com o bisturi, retirou-se um pequeno fragmento.	65
FIGURA 25: Tendão sadio (HE 200X).	66

FIGURA 26: a) tendão do grupo controle, apresentando grande número de vasos, de parede espessa (HE, 200X); b) tendão do grupo tratado, apresentando vasos alongados, com endotélio delgado (HE, 200X). 67

FIGURA 27: a) tendão tratado apresentando alinhamento das fibras e hiper celularidade (HE 100X); b) tendão controle apresentando organização tecidual irregular e hiper celularidade (HE, 100X). 67

FIGURA 28: Corte histopatológico a) tendão tratado apresentando núcleos alongados e ondulações das fibras (HE, 400X); b) coloração de Tricrômio de Masson, identificando a presença de fibras colágenas em tendão do grupo tratado (400X); c) tendão do grupo controle com núcleos mais arredondados, sem padrão de ondulações (HE, 400X); d) coloração irregular das fibras do tendão controle (Tricrômio de Masson, 400X). 68

FIGURA 29: a) imunoistoquímica para colágeno tipo I – tratado (400X);
b) imunoistoquímica para colágeno tipo I – controle (400X);
c) imunoistoquímica para colágeno tipo III – tratado (400X);
d) imunoistoquímica para colágeno tipo III – controle (400X). 70

FIGURA 30: Marcação para VEGF. Pode ser observada uma marcação fraca, concentrada na região do endotélio dos vasos (200X). 71

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Número de células obtidas, viabilidade celular e número de células viáveis por animal.	45
TABELA 2: Medidas do escore de claudicação segundo grupo e dia de avaliação.	49
TABELA 3: Resultado da análise de variância para perímetro da canela.	51
TABELA 4: Médias da área do tendão (cm ²) segundo grupo e dia de avaliação.	53
TABELA 5: Resultado da análise de variância para a área do tendão.	54
TABELA 6: Médias da área da lesão (cm ²) segundo grupo e dia de avaliação.	55
TABELA 7: Resultado da análise de variância para a área da lesão.	56
TABELA 8: Porcentagem (%) de área lesada segundo grupo e dia de avaliação.	58
TABELA 9: Resultado da análise de variância para porcentagem (%) de área lesada.	59
TABELA 10: Médias do grau de ecogenicidade segundo grupo e dia de avaliação.	60
TABELA 11: Médias da porcentagem (%) de redução da lesão segundo grupo e dia de avaliação.	61
TABELA 12: Média dos escores de sinais ultra-sonográficos Power Doppler nos grupos tratado e controle nos diferentes momentos analisados.	64
TABELA 13: Medidas dos marcadores colágeno tipo I, colágeno tipo III e VEGF por grupo.	69

ANEXOS

ANEXO 1: Acompanhamento ultra-sonográfico do animal 1, corte transversal, aos dias 30, 60, 90 e 120 após indução de lesão.

ANEXO 2: Acompanhamento ultra-sonográfico do animal 2, corte transversal, aos dias 30, 60, 90 e 120 após indução de lesão.

ANEXO 3: Acompanhamento ultra-sonográfico do animal 3, corte transversal, aos dias 30, 60, 90 e 120 após indução de lesão.

ANEXO 4: Acompanhamento ultra-sonográfico do animal 4, corte transversal, aos dias 30, 60, 90 e 120 após indução de lesão.

ANEXO 5: Acompanhamento ultra-sonográfico do animal 5, corte transversal, aos dias 30, 60, 90 e 120 após indução de lesão.

ANEXO 6: Acompanhamento ultra-sonográfico do animal 6, corte transversal, aos dias 30, 60, 90 e 120 após indução de lesão.

ANEXO 7: Acompanhamento ultra-sonográfico do animal 1, corte longitudinal, aos dias 30, 60, 90 e 120 após indução de lesão.

ANEXO 8: Acompanhamento ultra-sonográfico do animal 2, corte longitudinal, aos dias 30, 60, 90 e 120 após indução de lesão.

ANEXO 9: Acompanhamento ultra-sonográfico do animal 3, corte longitudinal, aos dias 30, 60, 90 e 120 após indução de lesão.

ANEXO 10: Acompanhamento ultra-sonográfico do animal 4, corte longitudinal, aos dias 30, 60, 90 e 120 após indução de lesão.

ANEXO 11: Acompanhamento ultra-sonográfico do animal 5, corte longitudinal, aos dias 30, 60, 90 e 120 após indução de lesão.

ANEXO 12: Acompanhamento ultra-sonográfico do animal 6, corte longitudinal, aos dias 30, 60, 90 e 120 após indução de lesão.

ANEXO 13: Análise estatística para escore de claudicação.

ANEXO 14: Análise estatística para perímetro da canela.

ANEXO 15: Análise estatística para escore de ecogenicidade.

ANEXO 16: Análise estatística para área do tendão.

ANEXO 17: Análise estatística para área da lesão.

ANEXO 18: Análise estatística para percentual de área lesada.

ANEXO 19: Análise estatística para percentual (%) de redução da lesão.

ANEXO 20: Tabela de escores ultra-sonografia Power Doppler.

ANEXO 21: Análise estatística para marcadores de imunoistoquímica.

ANEXO 22: Artigo científico enviado para publicação para a Revista Veterinária e Zootecnia Botucatu.

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.

RESUMO

A lesão do tendão do músculo flexor digital superficial é uma importante afecção que leva à claudicação em eqüinos atletas, com prevalência de 13 a 30% de acordo com a atividade eqüestre. Sua instalação pode comprometer a carreira do potro por serem lesões debilitantes, podendo inclusive haver recidivas. Os tratamentos propostos são diversos, mas efeitos como melhora da qualidade da matriz tendínea não foram confirmados por estudos controlados. Recentemente, os avanços médicos demonstram crescente interesse na utilização das células-tronco em terapia de doenças degenerativas, em cicatrizações lentas ou ineficazes. O objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade da cicatrização tendínea de animais tratados com o implante autólogo de células da fração mononuclear proveniente de medula óssea, 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 6 eqüinos, seguida de implante autólogo em apenas um membro de cada animal. Os animais foram avaliados por parâmetros clínicos e ultra-sonográficos e após biópsia, realizada no 120º dia do experimento, sendo verificadas características histológicas e imunoistoquímicas. A terapia com implante autólogo das células da fração mononuclear acelerou o processo de cicatrização tendínea, melhorando a organização tecidual e com expressão significativa para colágeno tipo I. O procedimento foi seguro e não apresentou risco aos animais.

Palavras-chave: eqüino; célula-tronco; fração mononuclear; medula óssea; tendão.

OLIVEIRA, P.G.G. Autologous implant of mononuclear cells from bone marrow as treatment of experimentally induced tendinitis in equine: long term evaluation – 120 days. Botucatu, 2008, 164p., master dissertation, UNESP, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, São Paulo.

ABSTRACT

The superficial digital flexor tendonitis (SDFT) is an important cause of lameness in athletic horses, with incidence from 13 to 30 %, depending of the exercise modality. Its occurrence can compromise yearlings animals carrers being debilitant, inclusive the possibility of reinjury. Many treatments have been proposed, but effects as a higher quality of the tendineous matrix haven't been confirmed by controlled studies. Recently, medical interest has been directed to the stem cells therapy of degenerative diseases and cases of deficient and slow healing process. This study aims to evaluate the influence of autologous implant of the mononuclear cells from the bone marrow, focusing on the collagen fibers type I and type III characteristics, evaluated by immunohistochemic, present on the healing tendon. Induced collagen lesions were in both forelimbs SDFT from six horses, followed by autologous implant in one forelimb from each animal. The horses were evaluated by clinical and ultrasonographic exams during the hole period, and by histopathologic and immunohistochemistry patterns after biopsy on the 120th day. The therapy with autologous implant of the mononuclear fraction has accelerated healing process, improving the tissue organization, having a higher expression of collagen type with. The procedure was safe, not presenting any risk for the animals.

Key-words: equine; stem cell; mononuclear fraction; bone marrow; tendon.

1. INTRODUÇÃO

Lesões tendíneas e ligamentares afetando, principalmente, os tendões digitais (superficial e profundo) e o aparato suspensório são importantes causas de claudicação em cavalos atletas (WILLIAMS et al., 2001), resultando em queda de desempenho, e até mesmo o afastamento das pistas. Estas lesões variam de um leve esforço a uma ruptura parcial ou total, geralmente afetando o tendão flexor digital superficial (TFDS). Os quadros de tendinite possuem alta incidência, e necessitam de um longo período de reabilitação (GOODSHIP et al., 1994). Os atuais tratamentos são de baixa eficácia na modulação do tecido cicatricial, ocorrendo variações em sua força e resistência, resultando em uma função reduzida do novo tecido e o predispondo à recidivas. Como consequência geral, os prejuízos relacionados a este tipo de lesão são marcantes na criação de eqüinos.

Estas lesões são relacionadas com o exercício, pois durante trabalho constante o tendão é submetido a um estiramento que excede a sua capacidade elástica, ocorrendo a lesão. A tendinite também é descrita como um processo degenerativo gradual em indivíduos com rotina de exercícios intensos, causando alterações subclínicas, ou microlesões, que vão se acumulando, resultando na tendinite. Outros fatores em eqüinos como genética, desvios de aprumos, ferrageamento inadequado, pista irregular ou pesada, sobrepeso, entre outros, também podem influenciar na instalação desta enfermidade.

Através da utilização da ultra-sonografia 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 do tratamento com antiinflamatórios (sistêmicos e locais) demonstrar efeitos desejados, ainda não há oferta de um fármaco que resulte na melhoria da qualidade do tecido cicatricial, ou mesmo na redução do período de cicatrização. Desta forma, a terapêutica deste tipo de lesão tem se mostrado frustrante para a classe veterinária que trabalha com a espécie eqüina.

Com a proposta de melhorar a qualidade do tecido cicatricial, além de certa função antiinflamatória, foram testadas a utilização de injeções intralesionais de glicosaminoglicanos (GAG), dentre eles o ácido hialurônico. Apesar da melhora clínica e ultra-sonográfica, foram freqüentes os casos de recidiva. Outro fármaco, o fumarato de beta-aminopropionitrila, que associado a um programa de reabilitação, sugería promover um melhor alinhamento fibrilar, não se encontra atualmente disponível no mercado.

Métodos fisioterapêuticos como ultra-som, laser, campo magnético pulsátil, dentre outros, propõem influência na cicatrização, mas sem comprovação em estudos publicados. Recentemente, a terapia por ondas de choque extra-corpóreo (shock wave) tem revelado bons resultados na analgesia e reparo tendíneo.

Algumas técnicas cirúrgicas podem ser indicadas em situações específicas, sendo exemplo o “splitting” tendíneo nos casos de drenagem de hematomas; a desmotomia do anular, quando a região afetada está próxima ao bolete, descromprimindo o tendão inflamado; a desmotomia do acessório do TFDS, que aumenta a extensão da unidade músculo-tendínea e é preconizada para a redução dos casos de recidiva.

Experimentos com infiltração intralesional com fatores de crescimento (TGF- β e IGF-1) na terapia tendínea têm apresentado resultados promissores. Essas substâncias são citocinas liberadas no processo inflamatório, tendo ação moduladora na migração, proliferação e síntese celular durante o processo de cicatrização.

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

As células tronco embrionárias são as mais versáteis, mas envolvem diversas questões éticas e religiosas quanto à pesquisa e aplicação. Também existem limitações quanto ao seu uso devido à resposta imune do receptor e à formação de tumores (teratomas). No organismo adulto as células tronco podem ser classificadas em hematopoiéticas e mesenquimais, sendo a primeira

responsável por produzir as células constituintes do sangue, e a segunda responsável pela remodelação e cicatrização dos tecidos de uma forma geral.

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 se utilizam de 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 (semelhante ao utilizado na presente pesquisa) possui a vantagem de permitir a realização do implante no momento do diagnóstico, com menor tempo de preparo das células e custo reduzido, e ainda aumenta a concentração de células tronco mesenquimais para o implante direto após a coleta de medula óssea.

O conhecimento sobre a cicatrização 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 a necessidade de estudos controlados que confirmem a real contribuição deste método terapêutico na qualidade da cicatrização tendínea e recuperação da sua função.

Este trabalho tem como objetivo avaliar a possibilidade de uso das células mononucleares no tratamento de tendinites em eqüinos, através do acompanhamento clínico e ultra-sonográfico dos animais, além das características morfológicas do tecido cicatricial formado. Realizamos biópsia tendínea para

avaliação histopatológica, avaliando a organização tecidual, e observação das fibras colágenas tipo I e III presentes no tecido cicatricial via imunoistoquímica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ESTRUTURA E FUNÇÃO DOS TENDÕES

Os tendões têm como função transferir a força biomecânica dos músculos para os ossos, promovendo a movimentação do esqueleto. Os ligamentos possuem função similar, mas para tal, unem duas extremidades ósseas (SMITH e WEBBON, 1996). Em eqüinos, a grande massa muscular está localizada proximalmente, de forma a reduzir o peso nos membros e facilitar sua locomoção, tornando a movimentação mais eficiente. Essa característica que foi sendo adquirida ao longo do tempo e permitiu que cavalos com grande capacidade para a corrida sobrevivessem, ao fugir de seus predadores, ocorrendo desta maneira uma seleção natural. Atualmente, observa-se que os eqüinos possuem membros e tendões longos, como é o caso dos flexores superficial e profundo, do tendão extensor digital comum e do ligamento suspensório. Os tendões flexores (especialmente o TFDS) e o ligamento suspensório nos eqüinos possuem outra fundamental característica, a de dar sustentação à articulação metecarpo-falangeana, atuando como uma mola, que absorve e fornece energia nas diferentes fases do passo. Com isso, contribuem com a alta eficiência da locomoção, e também absorvem o impacto sofrido sobre o membro (WILSON, 2001).

O tendão é um tecido conjuntivo denso altamente organizado, composto predominantemente por fibroblastos, os tenócitos, envolvidos por matriz extracelular (MEC), com seu componente fibroso (fibras colágenas) e não fibroso (sob a forma de gel) (ALBERTS et al., 2004). A matriz extracelular (MEC) é composta por uma variedade de proteínas e polissacarídeos secretados localmente formando uma rede organizada, em estreita associação com a superfície celular que a produz. A matriz pode tornar-se calcificada, como em

ossos e dentes; transparente como na córnea; ou ainda adotar formas de cordões, como em tendões, conferindo grande força mecânica (ALBERTS et al., 2004).

Existem 4 ou 5 classes de macromoléculas extracelulares que compõem a matriz. Acreditava-se que a MEC dos vertebrados servia simplesmente como substância inerte na estabilização da estrutura física dos tecidos, mas após diversas pesquisas, foi demonstrado que esta é ativa e desempenha um papel complexo na regulação do comportamento das células vizinhas, influenciando seu desenvolvimento, migração, proliferação, forma e função (ALBERTS et al., 2004; RICHARDSON, 2005).

As fibras colágenas do tipo I são mais abundantes neste tecido (75 a 95 %). O colágeno do tipo III é o segundo mais abundante e pode ser encontrado ao redor das fibras do tipo I e no endotendão. Com a idade, é observado o aumento de sua quantidade, especialmente na área central do terço médio da região metacarpiana (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).

As moléculas de colágeno se organizam em fibrilas e são estabilizadas por ligações cruzadas, responsáveis pela estabilidade estrutural das fibrilas, determinando a força mecânica dos tendões. Tanto o tipo, quanto o número das ligações, se modificam com a idade e com a função do tecido (GOODSHIP et al., 1994). Os feixes de colágeno são alinhados com a força de ação dos músculos sobre os tendões e exibem aspecto ondulado quando observados ao microscópio. A morfologia de ondulação é relacionada com o comportamento elástico do tendão e sua intensidade varia de acordo com o segmento tendíneo e idade do animal. Sob carga igual, as fibras colágenas com menor ondulação, quando comparadas às mais onduladas, sofrerão maior tensão e poderão se romper precocemente (WILINK et al., 1992; PATTERSON-KANE et al., 1998). O tendão tem uma estrutura hierárquica típica, composta por bandas de fibrilas colágenas, dispostas juntas em fibras envoltas pelo endotendão, e rodeadas pelo epitendão (FENWICK et al., 2002).

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

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

A nutrição da estrutura tendínea é obtida por difusão, através das bainhas sinoviais e pelo afluxo sanguíneo proveniente da junção músculo-tendínea, da inserção óssea e do 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 tendinite é uma importante causa de claudicação em eqüinos (ROONEY e GENOVESE, 1981; GILLIS et al., 1993; GOODSHIP et al., 1994; PATTERSON-KANE et al., 1998), sendo a lesão do TFDS a mais freqüente, com prevalência variando de 13 a 17% em cavalos de PSI de corrida (ROONEY e GENOVESE, 1981; OIKAWA e KASASHIMA, 2002), chegando a 30% em cavalos de caça europeus (GOODSHIP, 1993). 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).

O TFDS no cavalo opera próximo ao seu limite funcional durante o exercício intenso, sofrendo tensão máxima de 16% durante o galope (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). Outro possível fator seria a sobrecarga constante sofrida pelo membro durante o exercício, o que geraria uma hipóxia localizada, e assim, uma isquemia tecidual e formação de microlesões.

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

Durante a fase inicial da cicatrização, a congestão e acúmulo de fluidos no local promovem isquemia e necrose de tenócitos. A extensão da necrose está relacionada ao grau de comprometimento vascular (SILVER et al., 1983). Em resposta à lesão tecidual, tem início uma resposta inflamatória intensa, com hemorragia e edema intratendíneo, e a infiltração de macrófagos e polimorfonucleares, para remoção de tecido necrótico e deposição de fibrinas (WOO et al., 1999; WOO et al., 2000; STASHAK, 2002). Fatores de crescimento e

citocinas (PDGF, TGF- β , TGF α , entre outros) são liberados pela invasão de macrófagos e plaquetas, tendo como resposta a proliferação de células fibroblásticas e o início da síntese de colágenos tipo I e III para que se forme o tecido cicatricial (WOO et al., 1999). As células endoteliais dos capilares lesados aumentam de tamanho e adquirem atividade mitótica pronunciada, resultando na formação de brotos vasculares, que determinam o trajeto dos fibroblastos, juntamente com os cordões de fibrina (ALBERTS et al., 2004). À medida que a lesão é preenchida pelas células reparadoras recém formadas, o exsudato inflamatório é reabsorvido. A fibrina é fagocitada progressivamente e digerida por enzimas, especialmente as proteases e catepsinas (ALBERTS et al., 2004).

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

O novo tecido é menos organizado e fraco em comparação com o tecido tendíneo íntegro. Isto se deve a uma diferença na composição da matriz e sua inadequada organização (WILLIAMS et al., 1980; MONTGOMERY, 1989; GOODSHIP et al., 1994). A celularidade é inicialmente aumentada em comparação a um tendão normal, porém a quantidade de colágeno cai de 64% para 37% em um tendão lesado (WILLIAMS et al., 1980). O novo colágeno formado no interior da cicatriz tem menos ligações cruzadas, além de uma maior quantidade de colágeno tipo III (sendo inferior a 1% no tendão normal, atingindo 20-30% no tecido cicatricial). O colágeno tipo III possui um menor diâmetro de fibra, o que promove uma maior elasticidade, porém menor resistência quando comparado ao tipo I. Estas alterações produzem uma cicatriz mais frágil, que predispõe à recidivas (SMITH et al., 2002a). A concentração de colágeno retorna ao valor próximo do normal, no entanto, as propriedades mecânicas são inferiores devido a persistente deficiência estrutural e a composição da matriz (WOO et al., 1999). A completa cicatrização do tendão leva de 1 a 2 anos, porém o tendão

jamais recupera sua resistência e morfologia iniciais. Como este tempo de cicatrização é longo, o animal deve ser submetido a um programa de reabilitação durante todo este período, a fim de minimizar a perda da elasticidade tendínea e, conseqüentemente, diminuir a ocorrência de recidivas (GILLIS, 1996). Caso o animal seja confinado sem cumprir o programa de reabilitação, ou simplesmente solto à pasto, ocorre a diminuição da elasticidade tendínea, resultando em prejuízo a sua função. O exercício também irá colaborar com uma melhor organização das fibras do novo tecido, melhorando a sua qualidade. Devido a um inadequado programa de reabilitação, constatou-se que em cavalos PSI que retornam ao treinamento após a recuperação de tendinites, cerca de 70% não chegam a competir (OIKAWA e KASASHIMA, 2002).

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

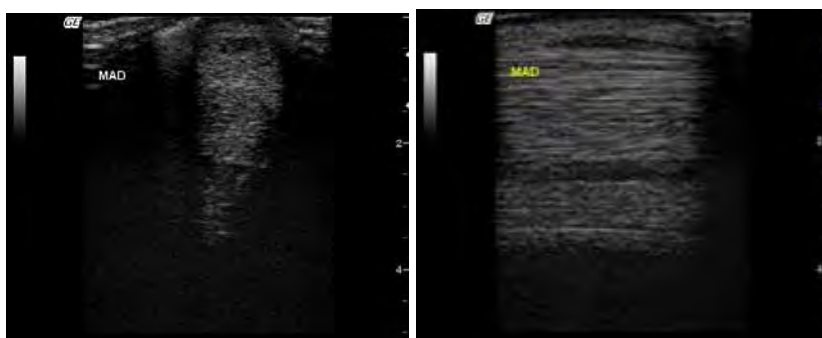


FIGURA 1: Imagem ultra-sonográfica de uma lesão induzida experimentalmente no TFDS, cortes transversal e longitudinal.



FIGURA 2: Imagem ultra-sonográfica de uma lesão clínica no TFDS, cortes transversal e longitudinal.

2.3 TRATAMENTO DAS TENDINITES

Com o progressivo conhecimento adquirido sobre a biologia básica dos tendões, e com o auxílio da ultra-sonografia, que permite 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 Atuais

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).

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 à 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). No entanto, este confinamento não deve perpetuar-se ao longo de todo o período de cicatrização tendínea. Gillis, em 1996, estabeleceu um protocolo de exercício progressivo, controlado e gradativo para lesões tendo-ligamentares em eqüinos, o qual vem sendo respeitado até hoje. Após a realização de repouso inicial, o qual é dependente da gravidade da lesão, o protocolo consta na evolução das seguintes fases:

- caminhada ao passo puxado, associado ou não à natação;
- caminhada ao passo montado;
- inserção de trote ou marcha;
- inserção de galope;
- e, por fim, o animal é liberado para trabalho normal

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

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

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). A aplicação de frio deve ser realizada diversas vezes ao dia, com duração de 20-30 minutos em cada aplicação.

A administração de antiinflamatórios não esteróides (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 possui ação rápida, mas com alto custo (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 e vem obtendo bons resultados em enfermidades músculo-esqueléticas agudas e crônicas (NELL et al., 2002).

Em casos de marcante edema, pode-se realizar a administração sistêmica de AINEs em associação ao dimetilsulfóxido (DMSO) (HENNINGER, 1992; Reef, 2001).

Na fase subaguda é recomendada a terapia local de contraste quente e frio. O DMSO pode ser utilizado sozinho ou em associação a massagens (REEF, 2001). Outras técnicas de fisioterapia como ultra-som e laser terapia são também utilizadas, sendo que estes possuem resultados com comprovação científica em humanos e animais de laboratório, porém 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 cicatrização tendínea. No entanto, Dyson (1997) contraria esta idéia ao mostrar que nenhum destes tratamentos trouxe mais 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 .

Experimentos com infiltração intralesional com fatores de crescimento (TGF- β e IGF-1) na terapia tendínea têm apresentado resultados promissores (ASPENBERG e FORSLUND, 1999).

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 a 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.

O uso de células tronco mononucleares (BARREIRA, 2005; BARREIRA et al., 2008) e mesenquimais (CTM) 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). A engenharia tecidual e o uso das células tronco mesenquimais em lesões músculo esqueléticas tem mostrado resultados promissores.

As células tronco mesenquimais (contidas nas células mononucleares) são conhecidas por serem células multipotentes, que podem se diferenciar em células do tecido esquelético. É esta propriedade que promove interessantes possibilidades de utilização das CTMs no tratamento de lesões e doenças músculo-esqueléticas.

2.3.2 Células Tronco (CT)

Diversos cientistas procuram descobrir o real poder das células tronco na cura ou regeneração de órgãos e tecidos. A imprensa vem reverberando conquistas, com o incentivo de alguns pesquisadores envolvidos, criando uma

grande expectativa para uma nova era, a da medicina regenerativa. Apesar do conhecimento anterior da existência das células tronco, atualmente vem sendo divulgadas informações detalhadas sobre estas células, as quais participam do processo de crescimento, remodelação e cicatrização tecidual, e que apenas recentemente foram melhor identificadas no indivíduo adulto (SOARES e SANTOS, 2002; CHEN e GOLDHAMER, 2003; RICHARDSON, 2005).

Há décadas as células tronco vêm sendo utilizadas em transplantes de medula óssea para o tratamento de leucemia. Mas atualmente, o campo para o uso destas células tem se mostrado muito maior.

Células tronco são genericamente definidas como sendo células indiferenciadas capazes de se auto-renovar através de replicações, mantendo um *pool* de reserva celular; e podem ainda se diferenciar em uma linhagem celular específica. As células tronco podem ser genericamente classificadas em embrionária e adulta, dependendo da fase de desenvolvimento de que foram obtidas.

Apesar de um grande número de células poder ser reconhecida em tecidos adultos, todas derivam de uma única célula-ovo, e esta tem a propriedade de formar todos os tecidos do indivíduo adulto. As células dividem-se formando células idênticas, mas, muito precocemente, diferentes grupos celulares vão adquirindo características especializadas e restringindo sua capacidade de diferenciação (ZAGO e COVAS, 2006). A maioria dos tecidos adultos possui reserva de células com capacidade de multiplicar-se naquele tecido a que pertencem e ao mesmo tempo mantém esta própria reserva de células indiferenciadas. Estas células tronco tecido-específicas são as responsáveis pela manutenção da integridade dos tecidos adultos, pelo reparo de tecidos lesados e pela remodelação dos tecidos e órgãos. Estas células progenitoras capazes de diferenciar-se em tecidos adultos especializados são denominadas células tronco.

Hoje está bem demonstrado que numerosos tecidos (ou talvez todos) têm células tronco, que constituem uma reserva da qual o organismo lança mão para repor células maduras, ou quando ocorre lesão ou remodelação de tecidos. Assim, são bem reconhecidas CT de pele, da mucosa intestinal, do epitélio olfativo,

cérebro, fígado, gordura, córnea, retina, polpa dentária, pulmões, músculo esquelético e músculo cardíaco. Algumas CT são muito ativas (sangue), ao passo que outras são menos ativas nos adultos, como as cerebrais. Por outro lado, a existência de células tronco em um tecido não garante que esta célula seja capaz de reparar aquele tecido quando lesado.

Células, tecidos ou órgão lesados por doença ou trauma podem ser recuperados espontaneamente pelo organismo. Isso exige interrupção ou abrandamento da agressão, seguido de remodelação do tecido lesado, via de regra utilizando células tronco tecido-específicas de que o organismo dispõe. Exemplo seria a recuperação de área de pele que sofreu queimadura, quando ocorrerá reposição dos tecidos lesados, sofrendo processo de cicatrização. A capacidade de regeneração de diferentes tecidos varia muito, assim como sofre influência decisiva da idade. Como regra geral, crianças e pacientes jovens têm uma recuperação de tecidos mais rápida e eficiente do que adultos idosos (ZAGO e COVAS, 2006).

O termo terapia celular descreve um conjunto, de limites pouco precisos, de métodos e abordagens tecnológicas que visam a utilização de células para o tratamento de doenças. O principal foco atual de interesse da terapia celular é a medicina regenerativa, em que se busca a substituição de células ou tecidos lesados de forma a restaurar sua função (LEVEMBERG et al., 2003).

Desta forma, a terapia celular procura empregar células tronco, dirigindo sua diferenciação no sentido de um tecido específico, para repor ou reparar células lesadas ou destruídas. Também é necessária a produção de estruturas supramoleculares, ou seja, matriz extracelular que providencie a organização espacial plenamente funcional dos novos tecidos gerados e sua integração sistêmica (LEVEMBERG et al., 2003). Esta terapia vem sendo atualmente testada em humanos e em alguns animais em casos de infarto do miocárdio; no diabetes tipo I; em casos de lesão de medula espinhal; em enfermidades pulmonares; no tratamento de leucemias; na reconstituição de tecido epitelial intensamente comprometido, como em queimados; nas grandes perdas ósseas; em disfunções musculares; na recuperação de cartilagem e nas tendinites.

Na clínica médica humana, já existem alguns serviços que vem tratando diversas enfermidades com células tronco.

Muitas questões ainda devem ser respondidas. O uso destas células tronco podem não produzir os resultados desejados. Mesmo em tecidos de mesma linhagem, as células tronco nem sempre funcionam. As tentativas de que células retiradas do sangue ou da medula óssea gerem novos tecidos, particularmente no coração, até agora produziram resultados conflitantes. Houve melhora de alguns pacientes mesmo quando não se encontraram evidências de que as CT contribuíram com novos exemplares das células cardíacas. Isso pode ser devido ao fato de que estas células secretam substâncias sinalizadoras de crescimento e colaboram para a formação de vasos sanguíneos. Assim, as CT podem não produzir novas células, mas é possível que façam um trabalho de base para que as ainda desconhecidas células progenitoras do próprio coração possam conseguí-lo (BROFMAN et al., 2004).

A salamandra, um pequeno anfíbio, é capaz de regenerar um membro que foi totalmente amputado, ou um órgão inteiro, ao pegar células normais, diferenciadas, e fazê-las retornar ao estado indiferenciado (MUNEOKA et al., 2008). McGann et al. (2000) e Odelberg et al., 2001, conseguiram fazer células musculares regredirem ao utilizarem extrato de membros de salamandra em regeneração.

A engenharia tecidual necessita de 3 componentes básicos; uma estrutura de base onde a célula possa sobreviver (promovendo proteção e nutrição), um ambiente adequado (humoral e mecânico) e um tipo celular (TUAN, 2006).

2.3.3 Fontes de Células Tronco

Células tronco embrionárias são provenientes de embriões produzidos através de fertilização *in vitro*, e acumulados em clínicas de reprodução humana. São considerados totipotentes aqueles que possuem capacidade de formar células de qualquer tipo de tecido, ou mesmo o organismo inteiro. Esta propriedade é restrita ao embrião jovem, no estágio de mórula (FORTIER, 2005).

Será pluripotente a célula capaz de formar tecido de seu respectivo folheto embrionário (ectoderma, mesoderma, endoderma), sendo esta a célula obtida do embrião no estágio de blastocisto (LASLETT et al., 2003). O potencial uso destas células para certas doenças e terapias celulares é enorme, porém, envolve diversas questões éticas, principalmente em relação ao embrião humano (WATT e HOGAN, 2000), e seu uso tem sido associado com a formação de tumores (WAKITANI et al., 2003), mais especificamente, o teratoma.

As primeiras células tronco bem caracterizadas foram as progenitoras das células do sangue. As células maduras e diferenciadas do sangue exercem funções essenciais para a manutenção da vida, sendo elas os eritrócitos, neutrófilos, monócitos, linfócitos e plaquetas. Todas essas células têm uma vida limitada na circulação sanguínea, variando de algumas horas a alguns meses. As células tronco hematopoéticas são raras; além de se localizarem na medula óssea, essas células circulam no sangue adulto e, em especial, no sangue do feto. No momento do nascimento, o sangue fetal retido na placenta após a secção do cordão umbilical pode ser recuperado e constitui rica fonte de células tronco, que podem ser usadas para fins terapêuticos (ZAGO e COVAS, 2006).

As células tronco provenientes de tecidos adultos são denominadas células tronco somáticas (soma=corpo). Estas têm uma capacidade limitada de diferenciação, em geral restrita ao tecido que derivam. As fontes mais comuns de células tronco somáticas para fins terapêuticos são medula óssea, sangue periférico, o já mencionado sangue proveniente de cordão umbilical (placenta), células tronco cultivadas e expandidas *in vitro*, células proveniente de tecido adiposo e tecidos fetais de fetos abortados.

A punção de medula óssea é a forma tradicional pela qual se obtém células mesenquimais. 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 CT hematopoéticas e CT mesenquimais, que tem capacidade de se diferenciar em tecidos de origem da mesoderma. A suspensão celular pode ser transfundida para o receptor sem processamento adicional (apenas filtragem para eliminar fragmentos maiores), ou

pode-se proceder 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 e COVAS, 2006). Outra conhecida fonte de células tronco mesenquimais, e também muito utilizada, é o tecido adiposo (GIMBLE e GUILAK, 2003), sendo que não existe diferença significativa entre o aspirado medular e aquelas provenientes da gordura (DE URGATE et al., 2003).

A célula tronco mesenquimal (CTM) possui potencial limitado, sendo descritas como multipotentes. Esta célula pode se diferenciar em 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 CTM 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 ficoll-hipaque são células mesenquimais (PITTENGER et al., 1999). Ainda, em cultivo celular, as células mesenquimais se aderem ao fundo dos frascos, e se multiplacam em poucos dias. As células se mantêm quiescentes até receberem o estímulo do ambiente para que iniciem o processo de diferenciação. Este estímulo pode ocorrer durante o processo de cicatrização, pois este evento envolve uma complexa interação entre células inflamatórias, interleucinas, citocinas, proteínas da matriz extracelular e o desenvolvimento de novos capilares (PERIN et al., 2003). Em eqüinos com menos de 5 anos de idade, $1-2 \times 10^5$ células aderentes podem ser obtidas de 10 mL de aspirado de medula óssea após 3 dias de cultura (FORTIER, 2005).

Morfologicamente, a CTM 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.

Outro aspecto importante desta CT adulta é a sua possibilidade de realização de implantes autólogos (SMITH e WEBBON, 2005). Desta forma, se evitam complicações como a transmissão de doenças do doador para o receptor, e também se reduz a possibilidade de rejeição imune.

Atualmente, já existem empresas, tanto no Brasil como em outros países (exemplo são os Estados Unidos) que já vendem a tecnologia das células tronco comercialmente, sendo possível ser feita a coleta de material a campo (sangue proveniente de medula óssea ou tecido adiposo), que são enviados a estes laboratórios onde é feita a separação das células, sendo estas devolvidas ao veterinário para a implantação.

2.3.4 Punção Aspirativa de Medula Óssea em Eqüinos

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

Em animais jovens ou de pequeno porte (cães e gatos), a tuberosidade coxal e a cabeça do úmero são os locais de escolha para a obtenção de medula óssea, pois não há órgãos adjacentes e o osso é acessível abaixo da pele. No entanto, é difícil obter amostras da tuberosidade coxal de eqüinos (CAR e CLUE, 2000), como também do úmero, devido a grande massa muscular existente nestas regiões e pela densidade e espessura óssea existente.

Em grandes animais, a medula óssea pode ser coletada nas costelas, pois se localiza próximo à superfície e a posição da pessoa que irá proceder a coleta é segura. Porém, a pequena superfície óssea desta área dificulta o assentamento da agulha no interior da medula óssea (ROSE, 1993).

Em eqüinos, o esterno é o sítio de eleição para a realização da técnica de punção da medula óssea, pois a atividade hematopoiética persiste na esternobra

por toda a vida do animal, os ossos são cobertos por massa muscular delgada, e a cavidade medular é recoberta por uma fina camada de osso, facilitando o acesso a esta região. As desvantagens da punção neste local são a posição desconfortável e perigosa em que a pessoa que coleta a amostra tem que assumir; outro ponto é a relativa proximidade com os órgãos vitais, incluindo o coração (SPEIRS, 1999; THOMAS, 2003).

A correta contenção e tranquilização dos eqüinos minimiza possíveis complicações relacionadas ao procedimento. A preparação cirúrgica do local da punção, o uso de instrumentos esterilizados, luvas e antissepsia reduzem os riscos de infecções iatrogênicas. Se o paciente sofre de anomalias de coagulação, como trombocitopenia ou coagulação intravascular disseminada, pode ocorrer hemorragia. Neste caso, recorre-se ao controle da hemorragia por pressão local direta durante três a cinco minutos, ou até mesmo à transfusão de sangue. O clínico deve proceder a introdução da agulha com muito cuidado, de forma a se evitar a entrada na cavidade torácica. O risco de pneumotórax, hemorragia incontrolada ou laceração cardíaca podem ser diminuídos pela monitoração da agulha durante o procedimento (MORRIS, 1983).

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

São recomendadas agulhas especiais para a coleta de medula óssea. Entre elas estão incluídas as agulhas modelo Rosenthal, Illinois sternal, Jamshidi e Komiyashiki. A amostra deve ser coletada com solução anticoagulante (heparina, citrato de sódio ou EDTA), apesar de não ser necessário o uso de anticoagulante caso os esfregaços sejam preparados com prontidão após a coleta (KATHELEEN, 2000).

Contrariando descrição feita por Herthel (2002) e Thomas (2003), quando a punção do esterno de eqüinos é realizada com animal submetido a anestesia geral e posicionado em decúbito dorsal, Speirs (1999) e Smith (2003) preconizam a realiação deste procedimento com o animal mantido em apoio quadrupedal e sob

sedação. Em todas as situações, o osso é estabilizado em uma das mãos, e agulha posicionada no local com a outra mão, mantendo uma pressão firme sobre o local, rotacionando a agulha, permitindo a penetração no osso cortical. Uma vez a agulha fixada no interior do osso, o mandril é removido e uma seringa de 20 mL, com ou sem anticoagulante, é utilizada para a aspiração. Aplica-se uma pressão negativa por algumas vezes seguidas, até a coleta da alíquota desejada.

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

Após a obtenção da amostra, pode-se realizar o tratamento de tendinites ou desmites com o implante intralesional de medula óssea total, da fração mononuclear separa através do uso de Ficoll, de células mesenquimais cultivadas e expandidas *in vitro*, ou outros possíveis fracionamentos. Existe a possibilidade, em um futuro próximo, de que se realize o implante de células diferenciadas em tenócitos em laboratório.

Young e colaboradores, 1998, observaram a capacidade de células mesenquimais em se organizarem ao longo de linhas de tensão *in vitro*, comprovando seu potencial fibroblástico. Realizou-se, então, o implante de CTM em lesões no tendão de aquiles em animais de laboratório (coelhos), onde as CTM foram incluídas em um material biodegradável (gel de colágeno e fio Vycril), sendo presas à lesão de 1 cm de extensão. Observou-se a melhora na reparação biomecânica do grupo tratado, e as novas células apresentavam morfologia de fibroblastos, mas não foram totalmente caracterizadas como tenócitos.

Awad e colaboradores, 1999, utilizaram um modelo semelhante, mas na investigação de lesões localizadas no ligamento patelar. Os resultados indicaram melhora na aparência morfológica e também na biomecânica. Porém, não foi identificada melhora na microtextura entre os grupos.

Hankemeier e colaboradores, 2005, demonstraram a melhora em lesões do tendão patelar de ratos tanto na qualidade (considerando a relação colágeno tipo I/ colágeno tipo III) como na resistência do tecido de reparação.

Nos eqüinos, a ocorrência de tendinite possui, em um grande número de casos, uma localização central no tendão, o que pode facilmente conter o implante celular no seu interior, sem necessitar de um material para sua fixação.

Em 2001, Herthel promoveu o implante de todo o material proveniente do aspirado de medula óssea (20-30 mL) em lesões do ligamento suspensório de 100 cavalos, realizados em diversos pontos, relatando um maior grau de retorno ao exercício comparado ao grupo que não recebeu o implante medular.

A injeção de grandes volumes de medula óssea total no interior do tendão (30-50 ml) pode causar ruptura das fibras tendíneas ainda intactas, além de conter espículas e células de gordura que podem ser deletérios à cicatrização do tendão, bem como conter apenas um pequeno número de CTMs.

O implante celular (CTM cultivadas) em tendinites provocadas por estiramento em eqüinos, realizado por Smith et al., 2003, avaliou o tendão através de ultra-som em diversos momentos após a realização de implante. Os resultados mostraram um rápido preenchimento da lesão. No entanto, não foi possível concluir nestes casos clínicos se o tecido formado era semelhante ao normal, ou um tecido cicatricial. Dyson, 2004, promoveu estudo de 2 anos de duração, avaliando os animais que retornaram ao nível máximo de treinamento após uma lesão tendínea. Os animais tratados com células mesenquimais apresentaram uma taxa de recidiva de 18%, pequena se comparado a análises feitas em animais não tratados com CT, que foi de 56%.

As CTM têm potencial para produzir matriz tendínea ao invés de uma cicatriz com pouca funcionalidade. Os sinais envolvidos na diferenciação celular, no caso tenócitos, são desconhecidos. Alguns estudos propõem que a introdução de células mesenquimais em tecidos que necessitam de novas células, acrescido de um ambiente que exerce forças mecânicas, promove um estímulo mais adequado para uma melhor diferenciação (CARTER et al., 1998). A combinação deste estímulo mecânico e a proximidade com os tenócitos e matriz tendínea também são consideradas importantes (SMITH e WEBBON, 2005). Em um experimento anterior (BASSETT e HERMANN, 1961), foi estudada a influência, não só dos fatores mecânicos que envolvem a diferenciação celular, mas também

a concentração de oxigênio *in vitro*. Com um mecanismo que promove tensão e fornecimento de altas concentrações de oxigênio (35%), a osteogênese e condrogênese foram inibidas e as células se pareceram com fibroblastos, e se encontravam alinhadas em bandas paralelas de colágeno. Enquanto o tendão tradicionalmente é considerado um tecido submetido à relativa hipóxia, pode ser que uma tensão mais alta de oxigênio seja necessária para a diferenciação das células mesenquimais em tenócitos.

O momento perfeito para a realização do implante não é certo. Porém, deverá haver tempo suficiente para que se permita a ocorrência da fase de debridamento inflamatório inicial, e que se forme uma camada de granulação e angiogênese adequados, o que promove suporte para as CTM; ao contrário de uma fase anterior, com hemorragia e um grande processo inflamatório. O implante celular será realizado no período em que há uma grande quantidade de fatores de crescimento, encontrando-se em um meio propício para o enxerto.

2.3.5 Separação da Fração Mononuclear

O preparo dos esfregaços de medula óssea merece cuidadosa atenção, porque este irá certificar a proveniência do sangue, permitindo avaliar as características que confirmam que o material é realmente sangue medular, comprovando uma punção produtiva. O sangue proveniente da medula óssea contém gordura, espículas, megacariócitos, osteoblastos, osteoclastos, células mesenquimais, sendo algumas destas estritamente medulares hematopoeticamente ativas (HARVEY, 2001). É importante que sejam observadas as ilhas hematopoiéticas, muito características do sangue medular.

Os esfregaços, com ou sem anticoagulante, devem ser rapidamente secos ao ar, para melhor manutenção da morfologia celular. Diferentes corantes como o Romanowsky ou hematoxilina e eosina podem ser utilizados na avaliação de rotina da medula óssea aspirada. A concentração dos corantes precisa ser aumentada quando comparada à concentração utilizada para corar esfregaços de

sangue periférico, e esta concentração depende da celularidade do aspirado e da espessura de preparação dos esfregaços (BARTL, 1984; KATHLEEN, 2000).

Se o material da seringa incluir anticoagulante, expelí-lo numa placa de Petri para visualização das espículas, o que é um bom indício de coleta produtiva e proveniência de sangue medular. As espículas são observadas como fragmentos cinza, de forma irregular, semelhantes a pequenos cristais que se grudam no fundo da placa quando esta é inclinada. Elas são geralmente distinguíveis de glóbulos de gordura claros, brilhosos e esféricos (KATHLEEN, 2000).

A utilização de técnica semelhante à realizada para separação da fração mononuclear de ratos, coelhos e cães, que se inicia com centrifugação e retirada do soro (BARROS, 2001; BARROS et al., 2001; BITTENCOURT et al., 2006), se mostra inviável em eqüinos, pois o material fica muito denso e não se consegue promover a separação dos gradientes de densidade na etapa de uso do Ficoll, gerando um grande aglomerado celular branco-avermelhado no centro do tubo. Um protocolo específico para a separação das células mononucleares de eqüinos se fez necessário (BARREIRA, 2005).

2.4 AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE REPARAÇÃO

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

2.4.1 Avaliação Clínica e Ultra-Sonográfica

A avaliação clínica, quando realizada com o animal em estação, é feita pela inspeção e palpação da região afetada, na busca de sinais de inflamação, como o aumento de volume, calor e dor à compressão tendínea. Entretanto, é marcante a limitação estes 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 ultra-sonografia na avaliação de tendões e ligamentos de eqüinos, diversos artigos foram publicados sobre o exame ultra-sonográfico 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 ultra-sonográficos repetidos do tendão a fim de se evitar um atraso na cicatrização durante a reabilitação (DYSON, 2004).

O TFDS possui aparência ultra-sonográfica homogênea e ligeiramente menos intensa que o TFDP. Ao corte longitudinal, a estrutura possui aparência hiperecótica linear. A área tendínea avaliada pelo corte transversal é considerada normal entre 0,60 cm² e 1,20 cm², 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 ao 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 de inicia, ao corte transversal observa-se imagem hipoeecótica 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 anecóicas e hipoecóicas, 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 ecóica a sua aparência; sua ecotextura tende à heterogeneidade, com bordas irregulares, pouco diferenciadas das estruturas vizinhas. Ao 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 hipoecogenicidade e preservação do padrão de alinhamento de fibras pode ser uma evidência precoce de lesão (REEF, 1998).

De forma simplificada, pode-se classificar as lesões tendíneas pelo percentual de comprometimento de fibras no corte transversal, quando dividi-se a área da lesão pela área do tendão. Em tendinites focais, são classificadas de lesões leves aquelas com envolvimento focal de até 15% das fibras no corte transversal; as moderadas já atingem de 16 a 25%; e as 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 a 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.

2.5 EXAME ULTRA-SONOGRÁFICO POWER DOPPLER

O exame realizado através de ultra-sonografia 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 do fluxo sanguíneo. O exame Color Doppler permite apenas detectar a velocidade média, e possui um limite máximo de velocidade detectável. O exame Power Doppler, ao contrário, não fornece dados sobre direção do fluxo ou velocidade, porém é mais sensível à presença e volume de fluxo, independentemente da angulação, e assim possibilita a visualização de pequenos vasos (RISSELADA et al., 2006), sendo cinco vezes mais sensível que o Color Doppler. 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).

Em pacientes humanos, existem descrições de sua utilização para a avaliação de fluxo sanguíneo testicular, e ainda a possibilidade de diagnóstico em patologias associadas à alteração de irrigação sanguínea (POZOR e MCDONNEL, 2004). Ainda em humanos, esta técnica foi aplicada para a detecção de alterações provocadas pela artrite reumatóide, bem como a avaliação da resposta ao tratamento (TERSLEV et al., 2003). Diversos estudos mostraram que a ultra-sonografia Color e Power Doppler permitem acompanhar a resposta aos

tratamentos, como também possibilita a avaliação do grau de inflamação local. Este exame tem sido utilizado com frequência para identificar efusão articular em crianças que apresentam dor de quadril (STROUSE et al., 1999).

Até o presente momento, nenhum trabalho foi desenvolvido utilizando Doppler para a avaliação da evolução do processo cicatricial em tendões de cavalos. Conforme se desenvolve o processo de cicatrização tendínea, ocorre a neovascularização da região, que se reduz com a evolução do processo.

3. OBJETIVOS

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

1- Avaliar a eficácia da utilização do implante autólogo de células da fração mononuclear obtidas de medula óssea no tratamento da tendinite.

2- Acompanhamento do processo de cicatrização tendínea com exames clínicos, e com a observação das características ao exame ultra-sonográfico.

3- Avaliar a qualidade do tecido tendíneo neoformado com identificação das fibras colágenas tipo I e III, analisadas via imunoistoquímica ao final dos 120 dias. Checar se ocorre a sinalização para a formação de novos vasos aos 120 dias através da marcação para VEGF, também via imunoistoquímica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

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

4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

A pesquisa foi aprovada pela Câmara de Ética em Experimentação Animal (parecer número 18/2006). Foram utilizados 06 animais da espécie eqüina, cujos membros anteriores foram distribuídos em dois grupos de seis membros cada (GA e GB) e receberam diferentes tratamentos após indução de tendinite pela aplicação de collagenase¹. Os animais experimentais apresentaram idades entre 2 e 3 anos, sendo 4 fêmeas e 2 machos da raça árabe. Todos clinicamente sadios, sem alterações no sistema locomotor.

Ao entrarem 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, alimentado concentrado balanceado e feno de “coast-cross”.

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Ao dia zero do experimento, induziu-se a lesão no tendão flexor digital superficial (TFDS) de ambos os membros torácicos através da injeção intratendínea de collagenase (tipo 1). Os tendões lesados foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos: GA - tratamento e GB - controle. Ao 12º dia do experimento, o GA recebeu o implante das células da fração mononuclear, dentre elas as células mesenquimais. Os animais permaneceram por duas semanas confinados em baias e, após este período, foram submetidos ao esquema de

atividade física crescente, composta por caminhadas diárias, até o momento da biópsia.

Os animais foram acompanhados através de exames físicos e ultrasonográficos desde o dia zero até o 120º dia, quando foi realizada biópsia para verificação das características histopatológicas e imunoistoquímicas.

Grupo A – Tratamento: Constituído por 6 membros torácicos que receberam injeção de collagenase nos tendões flexores digitais superficiais. Doze dias após a indução da lesão, receberam o implante intralesional de células da fração mononuclear da medula óssea.

Grupo B – Controle: Constituído por 6 membros torácicos que receberam injeção de collagenase nos tendões flexores digitais superficiais. Este grupo não recebeu qualquer tipo de tratamento intralesional.

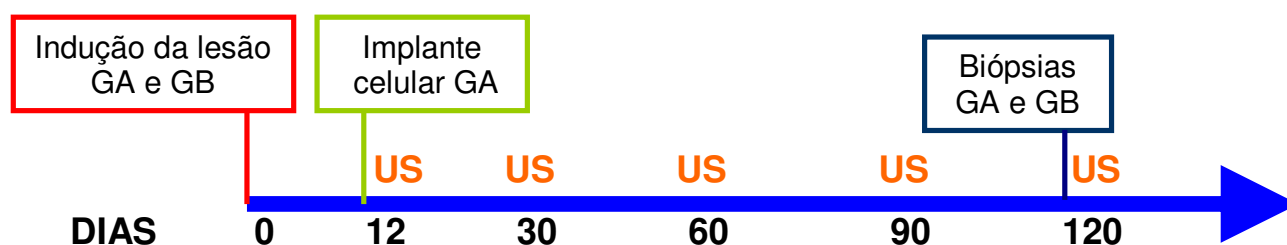


FIGURA 2: Esquema do delineamento experimental.
GA- grupo tratamento; GB- grupo controle; US- avaliação ultra-sonográfica.

4.3 ADMINISTRAÇÃO DE COLAGENASE

A administração de collagenase foi considerada como o início do experimento (dia 0). Todos os seis 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 1 mL de collagenase¹ 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 1,5 mL de lidocaína 2%³, sem vasoconstritor. A agulha utilizada foi a 30 X 0,80mm, sendo posicionada no local desejado, guiado por ultra-som (Aloka modelo SSD 900). Uma seringa de 3 mL, contendo 1 mL da solução de collagenase, foi então acoplada à agulha e o líquido injetado. Para o procedimento, foi necessário também o uso de anteparo de silicone (standoff) acoplado à probe do ultra-som para que se produzisse imagem de melhor qualidade destas estruturas mais superficiais, como os tendões.

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 acompanhada com exame físico diário (nos primeiros sete dias) e ultra-sonográfico (nos dias 7 e 12).

4.4 PUNÇÃO ASPIRATIVA DE MEDULA ÓSSEA

Leve sedação animal foi produzida com uso de xilazina 10% e bloqueio anestésico local em região das esternibras com 15 mL de lidocaína 2%⁴ sem vasoconstritor. Após tricotomia e antisepsia local, introduzimos agulha *Komiyashiki* 11G, no interior da medula óssea da 5ª esternebra e, sob auxílio de uma seringa de 20 mL, exerceu-se pressão negativa, sendo possível a coleta de sangue medular. O volume total coletado foi, em média, de 10-12 mL de material, separado em duas seringas de 20 mL, contendo 1 mL de heparina⁵ a 5% (5000UI/mL). O material foi imediatamente homogeneizado e acondicionado em caixa térmica contendo gelo reciclável.

¹ Collagenase Tipo 1- Sigma-Aldrich C-0130

² Sedazine- Fort Dodge

³ Cristália

⁴ Cristália

⁵ Cristália- 5000/mL



FIGURA 4: Punção de medula óssea.



Figura 5: Agulha utilizada (modelo Komiyashiki).



FIGURA 6: Seta indica o local da punção, realizada na região de 5ª esternebra.

4.5 SEPARAÇÃO DA FRAÇÃO MONONUCLEAR

As amostras foram encaminhadas em caixa térmica ao laboratório do Departamento de Genética e Citogenética Animal, e manipuladas em fluxo laminar de forma a ser evitada a sua contaminação.

Primeiramente, parte do material foi coletado com auxílio de tubo capilar para realização de esfregaço e confirmação de sua proveniência. Os pequenos cristais brancos visualizados foram coletados com auxílio de tubo capilar, colocados em lâminas e corados com kit Panótico rápido⁶, sendo observados ao microscópio. A confirmação da proveniência da medula óssea foi feita ao serem identificadas espículas e células sangüíneas novas, permitindo assim, que o material seguisse para a etapa de separação da fração mononuclear.

O sangue foi inicialmente filtrado em equipo de transfusão⁷ e posteriormente lavado com solução salina tamponada com fosfato Dulbecco's PBS (DPBS)⁸ (pH 7,2).

Em tubos tipo Falcon de 15 mL, foram colocados 2,5 mL de Histopaque®⁹ e neste se depositou volume suficiente da amostra para completar o tubo.

Os tubos foram centrifugados por 30 minutos a 500g, separando-se os constituintes do sangue por densidade de centrifugação.

Após centrifugação, foram observadas diferentes camadas: o plasma, seguido de um halo esbranquiçado contendo as células mononucleares, uma camada de Histopaque® e, no fundo, um *pellet* contendo hemácias. O plasma foi descartado, e com auxílio de pipeta Pasteur, o halo formado foi retirado e separado, juntamente com uma névoa branco-avermelhada presente nesta porção.

Os tubos contendo o halo foram preenchidos com DPBS e novamente centrifugados por 10 minutos a 300g.

⁶ Labordin

⁷ Embramed – equipo de infusão de sangue camada dupla

⁸ Invitrogen

⁹ Histopaque® 1077; Sigma-Aldrich

O sobrenadante foi desprezado e a amostra lavada com DPBS, de maneira a retirar-se totalmente o Histopaque®.

Após esta etapa, realizou-se a contagem de células, como também o teste de viabilidade celular por exclusão do azul de tripan 0,2%, contados em câmara de Neubauer. Para o implante, o material foi ressuspensão em 0,5 mL de soro autólogo recém coletado.



FIGURA 7: Etapas da separação da fração mononuclear. a) filtração e diluição da amostra com PBS; b) frasco Histopaque utilizado; c) amostra depositada sobre Histopaque®; d) formação do halo esbranquiçado (seta) contendo células mononucleares.

4.6 IMPLANTE DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA

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

Os membros que compunham o grupo controle (GA) receberam injeção intratendínea de células mononucleares de medula óssea, dentre elas as células mesenquimais, ao 12º dia após a aplicação de collagenase.

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

Com auxílio de ultra-som, posicionou-se agulha 30 X 0,80 mm no centro da lesão, acoplada a seringa contendo as células, e estas injetadas. O procedimento foi inicialmente realizado com auxílio de aparelho Aloka modelo SSD 900 e standoff (semelhante ao momento de indução de lesão), mas foi possível filmar o procedimento em três dos animais com outro aparelho de ultra-sonografia, GE LOGIQ 3, cedido pelo departamento de Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecia (FMVZ) da Unesp de Botucatu.

4.7 ATIVIDADE FÍSICA

Após o implante celular, os animais foram submetidos à caminhadas diárias, seguindo o esquema a seguir:

- 15º - 45º dia: andar ao passo, por 15 minutos, uma vez ao dia.
- 46º - 60º dia: andar ao passo, por 15 minutos, duas vezes ao dia .
- 61º - 90º dia: andar ao passo, por 30 minutos, uma vez ao dia.
- 91º - 120º dia: andar ao passo, por 30 minutos, duas vezes ao dia.

4.8 ACOMPANHAMENTO FÍSICO E ULTRA-SONOGRÁFICO

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 ultra-sonográfico (com aparelho GE Logiq 3, provido de transdutor linear 7,5 MHz) dos animais nos dias 12, 30, 60, 90 e 120, para que fossem avaliados:

- o tamanho do tendão;
- tamanho da lesão;
- porcentual da área lesada no interior do tendão;
- ecogenicidade, 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.

4.9 AVALIAÇÃO POR ULTRA-SONOGRAFIA 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 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 após a indução de lesão, sendo realizados exames ultra-sonográficos 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.

Uma escala foi desenvolvida, 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.

4.10 BIÓPSIA

Os animais foram biopsiados no 120^o dia, sendo retirado um fragmento do tendão flexor digital superficial de até 1 cm² no local da lesão. Para este procedimento ser realizado, os animais foram submetidos à anestesia geral, sendo realizada medicação pré-anestésica com acepromazina¹⁰ (0,5mg/kg) e xilazina 10% (0,5-1,0mg/kg), indução com ketamina¹¹ (2,2mg/kg) e diazepam, sendo mantidos com anestesia inalatória com halotano¹². Bloqueio anestésico local foi realizado com 20 mL 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 5 cm de comprimento, tanto em pele como no subcutâneo, divulsionando tecidos e fibroses

¹⁰ Acepran 1%- Univet

¹¹ Vetaset- Fort Dodge

¹² Hoechst

formadas. O tendão foi então identificado e individualizado com auxílio de uma hemostática. Segundo imagens ultra-sonográficas 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 (fenilbutazona, 4,4mg/kg, SID) por 5 dias.

4.11 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA

Os fragmentos foram processados pelos métodos habituais para obtenção de cortes histopatológicos e corados pelos métodos de Hematoxilina – Eosina (H.E.) 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 devidamente preparadas com Poly-L-Lysine. Este produto possui a função de promover a aderência dos cortes à lâmina. Para a incubação com o anticorpo primário colágenos tipo I e tipo III, o material foi desparafinado com banhos sucessivos em xilol e álcool absoluto em concentração decrescente, e a recuperação antigênica foi realizada através da digestão enzimática com pepsina (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 feita com duas lavagens com peróxido de hidrogênio (3%), durante 10 minutos cada, seguido de 10 lavagens com água destilada, e 2 lavagens de 5 minutos com TRIS (pH 7,4). A

incubação dos anticorpos primários foram feitos por 18 horas (overnight) a 4°C, utilizando-se anticorpos policlonais anti-bovino para colágeno tipo I¹³ e para colágeno tipo III¹⁴. As diluições foram 1:2000 e 1:1000 respectivamente. O anticorpo secundário utilizado foi o InVision¹⁵, encubado a temperatura ambiente por 1 hora. O material foi então incubado com DAB como cromógeno. 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 30), com auxílio do programa Leica QWin, 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 imunistoquímica para VEGF¹⁶. 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, 30 minutos, em solução de TRIS-EDTA (pH 9,0). O bloqueio da peroxidase endógena foi feito de maneira semelhante ao anteriormente citado. O anticorpo primário foi incubado durante a noite a 4°C, durante 18 horas, na diluição 1:50. A incubação do anticorpo secundário foi feita com InVision, durante 1 hora, seguido do cromógeno, feito com DAB, e contra-coloração feita com hematoxilina de Meyer. A contagem foi realizada com equipamento que consta em microscópio acoplado a uma câmara digital, de onde as imagens são observadas e processadas por um programa computacional de análise de imagem de forma semelhante ao realizado para a contagem das fibras colágenas. Foram contados 5 campos, sendo avaliado o percentual de marcação para cada tipo de colágeno.

¹³ NOVOTEC Rabbit anti-bovine type I collagen, #20121

¹⁴ NOVOTEC Rabbit anti-bovine type III collagen; #20321

¹⁵ DAKO K4061

¹⁶ DAKO Monoclonal mouse anti-human; clone VG 1; M7273

Para os controles negativos do VEGF e dos colágenos tipo I e III, foram realizadas as seguintes lâminas:

- 1- DAB;
- 2- Bloqueio da peroxidase + DAB;
- 3- Bloqueio + controle negativo (imunoglobulina da espécie do primário) + secundário + DAB;
- 4- Bloqueio + secundário + DAB.

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as variáveis do tipo score os momentos de avaliação foram comparados pelo teste de Friedman (HOLLANDER e WOLFE, 1973) em cada grupo (tratado e controle), e, nas avaliações de interesse os grupos controle e tratado foram comparados pelo teste não-paramétrico de Wilcoxon para amostras pareadas (HOLLANDER e WOLFE, 1973), assim como os marcadores.

Para as variáveis quantitativas contínuas utilizou-se a metodologia de Análise de Variância para Medidas Repetidas (DIGGLE et al., 1994). Essa técnica de análise estatística permite estudar a variação no comportamento médio das variáveis ao longo das avaliações, assim como comparar os grupos. A primeira hipótese a ser testada nessa análise é a hipótese de interação entre grupo e momento de avaliação que teste se os perfis médios são paralelos. Em caso afirmativo, prossegue-se a análise juntando os momentos para comparar os grupos e juntando os grupos para comparar os momentos de avaliação. Caso contrário, se os perfis médios não forem paralelos deve-se prosseguir a análise comparando as médias de interesse por contrastes de Wald (DIGGLE et al., 1994). Para modelar a matriz de variância-covariância que controla a dependência entre as observações feitas no mesmo animal incluiu-se efeitos aleatórios (DIGGLE et al., 1994), um para controlar a dependência ao longo das avaliações e outro para controlar a dependência entre o membro tratado e controle no mesmo animal. Por se tratar de uma amostra pequena, foi feita a verificação da adequação do modelo por meio de análise de resíduos.

5. RESULTADOS

5.1 TÉCNICAS DE MANIPULAÇÃO DAS CÉLULAS DA FRAÇÃO MONONUCLEAR

5.1.1 Administração de Colagenase

Os animais permitiram a manipulação no momento da indução da lesão apenas com o uso de tranquilizantes. A utilização dos quatro pontos altos como analgesia local, foi substituído por botão anestésico, pois observou-se que mesmo com o bloqueio dos quatro pontos altos os animais sentiam pequeno desconforto no momento da aplicação de colagenase. Isso ocorre devido à pressão exercida pelo líquido neste tecido, que é extremamente denso, causando certo desconforto. A aplicação provoca semelhante reação dos animais quando se utiliza apenas o botão anestésico. Assim, optou-se por esta técnica por sua maior facilidade de manejo e menor quantidade de medicamento necessário.

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 três membros, fosse decidido induzir novamente a lesão oito 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 collagenase.

5.1.2 Punção Aspirativa de Medula Óssea

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

Seguindo a descrição de Barreira (2005), o local escolhido para a realização de coleta foi o espaço da 5ª esternebra, que foi identificado através do auxílio do ultra-som, ou mesmo apenas pela sua localização anatômica, encontrando-se caudal à articulação do cotovelo.

A visualização do material coletado em placa de Petri (Figura 9) permitiu identificar características macroscópicas como um sangue de consistência gelatinosa, de maior viscosidade, glóbulos brilhantes de gordura e presença de pequenos cristais (espículas), sendo esta observação um bom indício de uma coleta produtiva. Porém a confirmação foi sempre realizada microscopicamente em laboratório.



FIGURA 9: Amostra de medula óssea depositada em placa de Petri.

Não houve problema de coagulação em nenhuma das amostras coletadas, e todas foram utilizadas para a separação das células mononucleares em laboratório.

Em média obteve-se 10-12 mL de medula óssea em cada animal, sendo este volume obtido em 2 alíquotas. Inicialmente foi utilizada uma seringa de 20 mL contendo 1 mL de heparina, promovendo pressão negativa e coletando a primeira fração da amostra, seguida de outra seringa semelhante heparinizada.

5.1.3 Separação da Fração Mononuclear

Nenhuma amostra foi descartada pois todas foram comprovadamente provenientes de medula óssea.

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 85,5%, com média de $42,92 \times 10^6$ células totais e média de $36,7 \times 10^6$ células viáveis

TABELA 1: Número de células obtidas, viabilidade celular e número de células viáveis por animal.

ANIMAL	1	2	3	4	5	6
Nº células	$97,5 \times 10^6$	$52,5 \times 10^6$	25×10^6	$32,5 \times 10^6$	25×10^6	25×10^6
Viabilidade Celular (%)	82	86	90	85	90	80
Nº cél. viáveis	$79,95 \times 10^6$	$45,15 \times 10^6$	$22,5 \times 10^6$	$27,6 \times 10^6$	$22,5 \times 10^6$	20×10^6

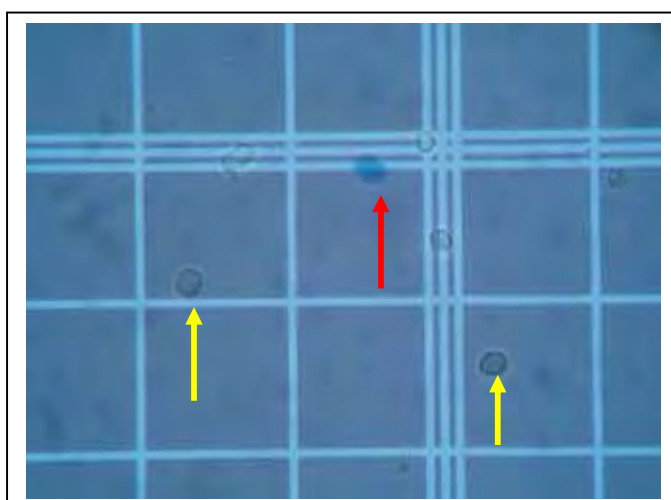


FIGURA 10: Teste de viabilidade celular com azul de tripan (2%). Seta vermelha indica célula não viável; setas amarelas mostram células viáveis.

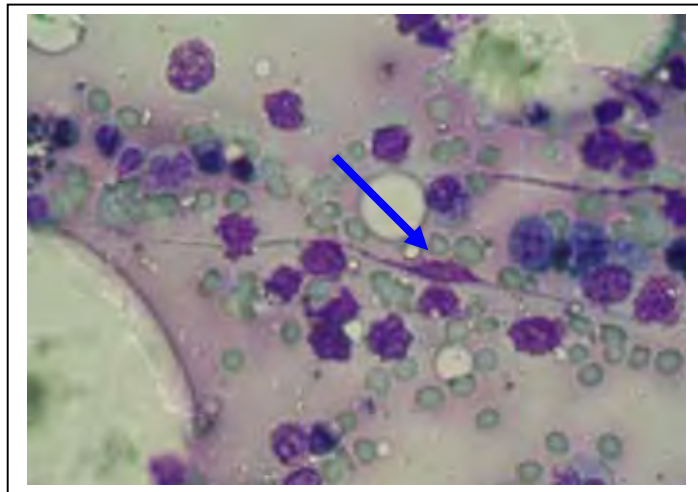


FIGURA 11: A seta indica uma provável célula mesenquimal, com seus prolongamentos (HE 1000X).

5.1.4 Implante das Células da Fração Mononuclear

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

A realização do implante se mostrou uma técnica simples, e 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 (Figura 13), o que provavelmente se deva a maior ecogenicidade produzida pela alta concentração celular, que a curto prazo pode ser considerada erroneamente uma melhora da lesão.

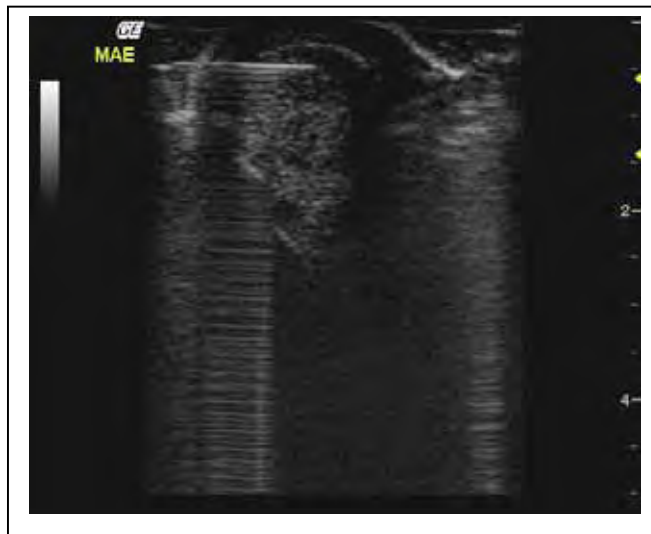


FIGURA 12: Visualização da agulha no interior do TFDS. Imagem feita com aparelho GE LOGIQ 3.

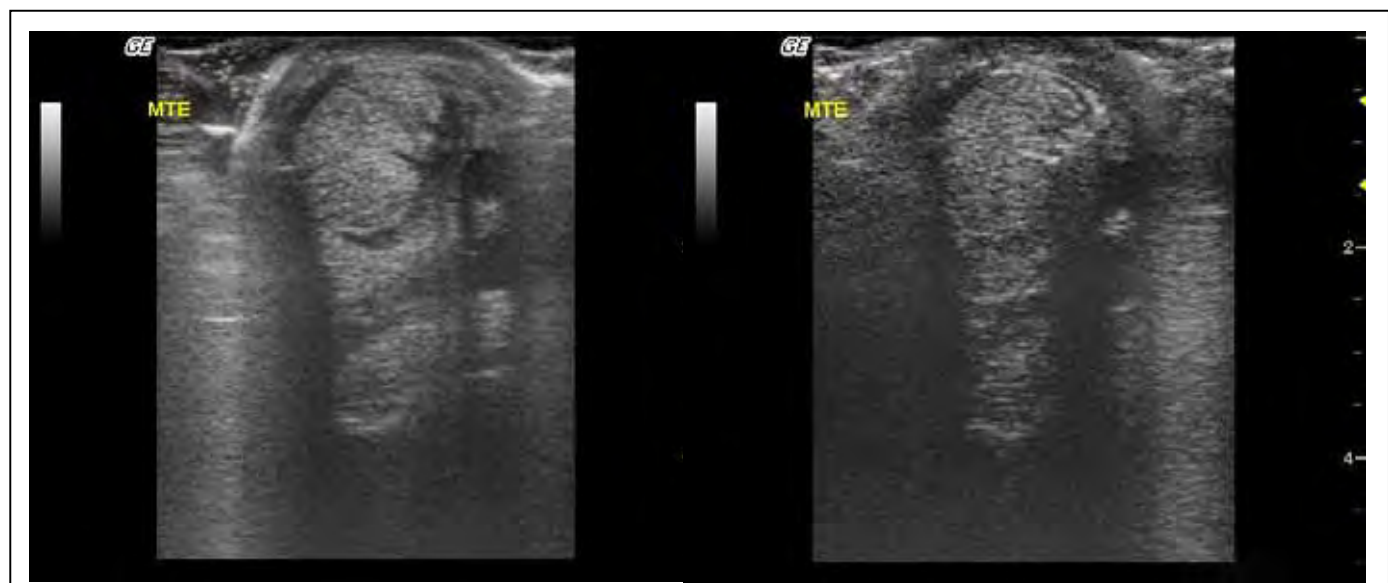


FIGURA 13: Imagem ultra-sonográfica nos momentos pré (esquerda) e pós (direita) implante celular.

5.2 ANÁLISE DO REPARO TENDÍNEO

5.2.1 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. A claudicação e o aumento de temperatura local foram os primeiros parâmetros a regredir completamente (ao redor dos 30 dias), ao contrário do aumento de volume, que permaneceu até o momento da biópsia em 2 membros tratados (120 dias), mesmo que leve (Figura 15). O volume maior (medido como o perímetro do metacarpo na região lesada) foi observado principalmente nos membros tratados, se igualando ao volume dos membros controle ao 65º dia.

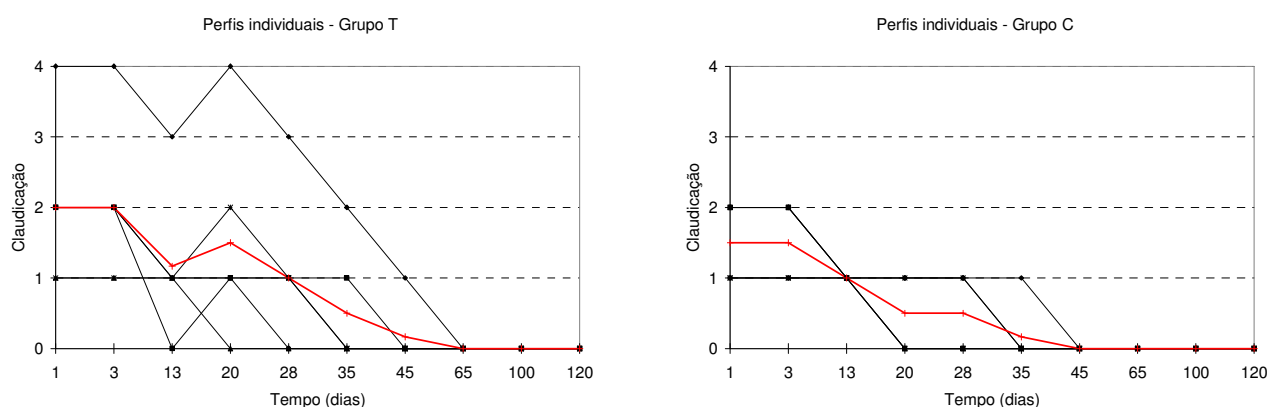


FIGURA 14: Perfis individuais (linha negra) e médios (linha vermelha) do escore de claudicação ao longo das avaliações.

Quanto a atividade locomotora após administração de collagenase, observou-se claudicação variável, partindo em média de grau 2 e chegando ao final do experimento em grau 0. Todos os membros tratados apresentaram maior

grau de claudicação, permanecendo grau 2 durante 7 dias após implante. O momento que, em média, se observou o final da claudicação no 45º dia em GA e no 35º dia em GB (Figura 14, Tabela 2). De uma forma geral, o grupo tratado veio apresentando parâmetros muito semelhantes ao grupo controle até o momento de implante celular, o que levou a uma nova elevação da claudicação e perímetro de canela.

TABELA 2: Medidas do escore de claudicação segundo grupo e dia de avaliação.

Grupo	Dia	Media
GA*	1	2,0
	3	2,0
	13	1,2
	20	1,5
	28	1,0
	35	0,5
	45	0,2
	65	0
	100	0
	120	0
GB	1	1,5
	3	1,5
	13	1,0
	20	0,5
	28	0,5
	35	0,2
	45	0
	65	0
	100	0
	120	0

*GA – grupo tratado

GB – grupo controle

O teste de Friedman, para comparar os escores ao longo das avaliações separadamente para cada grupo GA e GB, indicou que ocorreu uma mudança significativa do escore de claudicação ao longo do tempo para o GA ($p < 0,001$),

assim como para GB ($p < 0,001$). As comparações dos grupos pelo teste de Wilcoxon foram feitas somente para os momentos 1 e 13 e os resultados indicaram que não há diferença significativa entre os dois grupos em ambos os casos ($p > 0,05$).

O implante pareceu reagudizar o processo inflamatório, com leve aumento de todos os parâmetros do grupo tratado, mas que foi rapidamente restabelecido de forma semelhante ao controle.



FIGURA 15: Membro apresenta aumento de volume no momento da biópsia, aos 120 dias do experimento.

TABELA 3: Resultado da análise de variância para
perímetro da canela.

Comparações	P
EFEITO DE MOMENTO- GB*	
Dia 0 x Dia 1 – GB**	<.0001
Dia 1 x Dia 3 – GB	0.1611
Dia 3 x Dia 13 – GB	0.1194
Dia 13 x Dia 20 - GB	0.5334
Dia 20 x Dia 28 - GB	0.3502
Dia 28 x Dia 35 - GB	0.7555
Dia 35 x Dia 45 - GB	0.8763
Dia 45 x Dia 65 - GB	0.2129
Dia 65 x Dia 100 - GB	0.7555
Dia 100 x Dia 120 - GB	0.4362
Comparação do basal x lesão x final	
Dia 0 x Dia 1 - GB **	<.0001
Dia 1 x Dia 120 - GB **	<.0001
Dia 0 x Dia 120 - GB	0.6404
EFEITO DE MOMENTO - GA	
Dia 0 x Dia 1 - GA **	<.0001
Dia 1 x Dia 3 - GA	0.1194
Dia 3 x Dia 13 - GA	0.1194
Dia 13 x Dia 20 – GA**	0.0002
Dia 20 x Dia 28 – GA	0.2129
Dia 28 x Dia 35 - GA	0.2129
Dia 35 x Dia 45 - GA	0.4362
Dia 45 x Dia 65 - GA	0.5334
Dia 65 x Dia 100 - GA	0.5334
Dia 100 x Dia 120 - GA	0.2757
Comparação do basal x lesão x final	
Dia 0 x Dia 1 - GA **	<.0001
Dia 1 x Dia 120 - GA **	<.0001
Dia 0 x Dia 120 - GA **	<.0001

*GA- grupo tratado

GB- grupo controle

** estatisticamente significativo

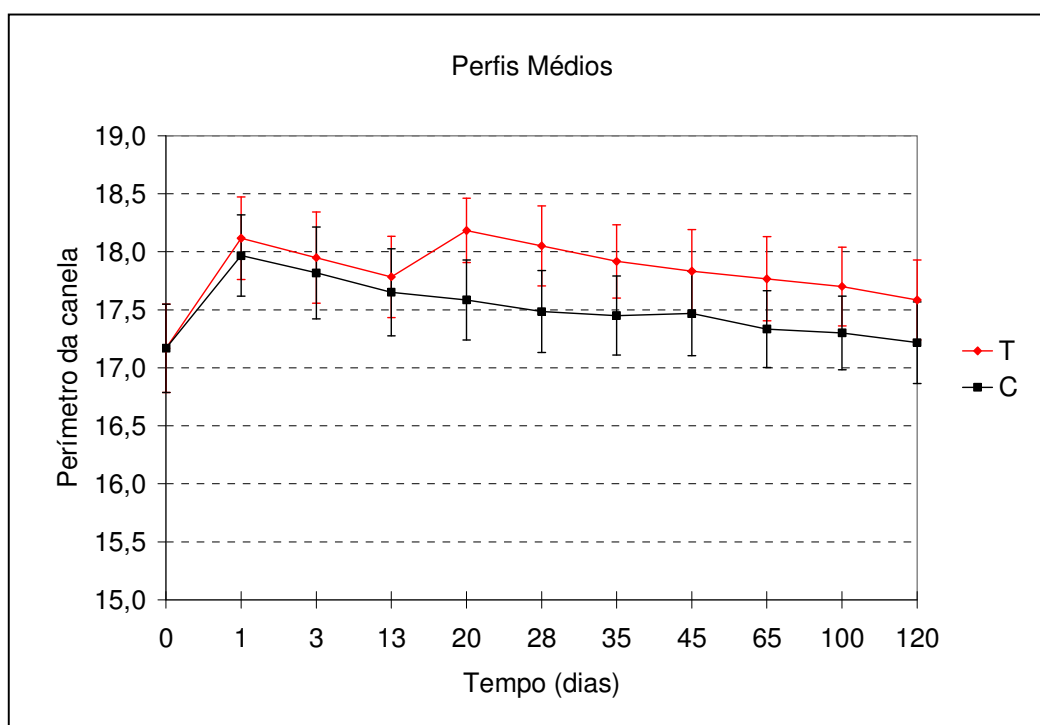


FIGURA 16: Perfil médio do perímetro da canela ao longo das avaliações dos grupos tratado e controle.

Nos dias 0, 13 e 35 não houve diferença entre GA e GB, em média, quanto ao perímetro da canela. Já nos dias 65 e 120 a diferença observada é significativa ($p < 0,001$), o perímetro da canela para o membro tratado (GA) é maior (Figura 16, Tabela 3).

Quanto ao comportamento ao longo do tempo no grupo controle, ocorreu um aumento significativo do dia 0 para o dia 1, e, em seguida, as diminuições consecutivas não foram significativas. Ao final, no dia 120, o perímetro médio voltou para o patamar observado no basal.

No grupo tratado, também ocorreu um aumento significativo do dia 0 para o dia 1, que se estabilizou até a avaliação no dia 13. Do dia 13 para o dia 20 ocorreu um novo aumento importante e as diferenças consecutivas que se seguiram não foram significativas. A avaliação final apresentou um perímetro médio

significativamente menor que no momento da lesão (dia 1), porém ainda significativamente maior do que o observado no momento basal (dia 0).

5.2.2 Análise Ultra-Sonográfica

Os resultados da avaliação ultra-sonográfica da lesão, após uma semana da aplicação de colagenase, demonstraram imagem hipoeecóica 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 ultra-sonográfico demonstraram que os 120 dias de acompanhamento não foram suficientes para que as lesões atingissem a normalidade do padrão ecóico, definida como escore zero.

Ao analisarmos em separado a área total do tendão (Tabela 4, Figura 17) observamos que a área média inicial do grupo tratado era ligeiramente maior que o controle, sendo que a situação se inverteu no momento seguinte. Ambos os grupos evoluíram, a partir de então, de forma semelhante, apresentando a maior área aos 60 dias, permanecendo semelhante ao dia 120, apesar de ter mostrado redução aos 90 dias.

TABELA 4: Médias da área do tendão (cm²) segundo grupo e dia de avaliação.

Grupo	Dia	Media
GA	M1_12d	1,00
	M2_30d	1,20
	M3_60d	1,23
	M4_90d	1,15
	M5_120d	1,12
GB	M1_12d	0,89
	M2_30d	1,08
	M3_60d	1,20
	M4_90d	1,21
	M5_120d	1,18

TABELA 5: Resultado da análise de variância para a área do tendão.

Comparação	P
M1-12d x M2-30d**	0,0264
M2-30d x M3-60d	0,3856
M3-60d x M4-90d	0,6883
M4-90d x M5-120d	0,6746
M1-12d x M5-120d**	0,0234
M2-30d x M5-120d	0,9628

** estatisticamente significativo

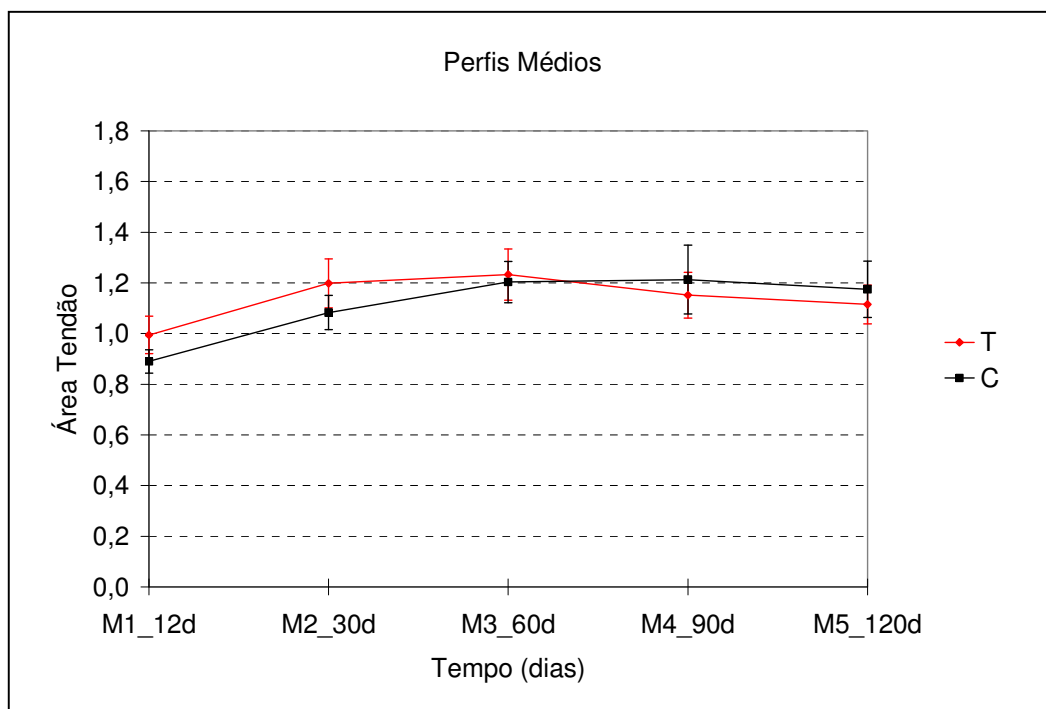


FIGURA 17: Perfis médios da área do tendão (cm²) ao longo das avaliações dos grupos tratado e controle.

Não houve diferença significativa entre os perfis médios nos dois grupos ($p=0,7296$), ou seja, não houve diferença significativa entre a área média do tendão entre os grupos (para todos os momentos). Quanto às comparações entre avaliações consecutivas observou-se que ocorreu um aumento significativo da área do tendão, em média, do dia 12 para o dia 30, tendo em seguida se estabilizado (Tabela 5). Quando comparados os dias 12 e 120 observou-se uma diferença significativa ($p=0,0234$), ou seja, a área média do tendão no dia 120 é significativamente maior do que no dia 12, mas não é maior do que no dia 30 ($p=0,9628$).

TABELA 6: Médias da área da lesão (cm^2) segundo grupo e dia de avaliação.

Grupo	Dia	Media
GA	M1_12d	0,29
	M2_30d	0,51
	M3_60d	0,40
	M4_90d	0,29
	M5_120d	0,13
GB	M1_12d	0,23
	M2_30d	0,41
	M3_60d	0,42
	M4_90d	0,37
	M5_120d	0,19

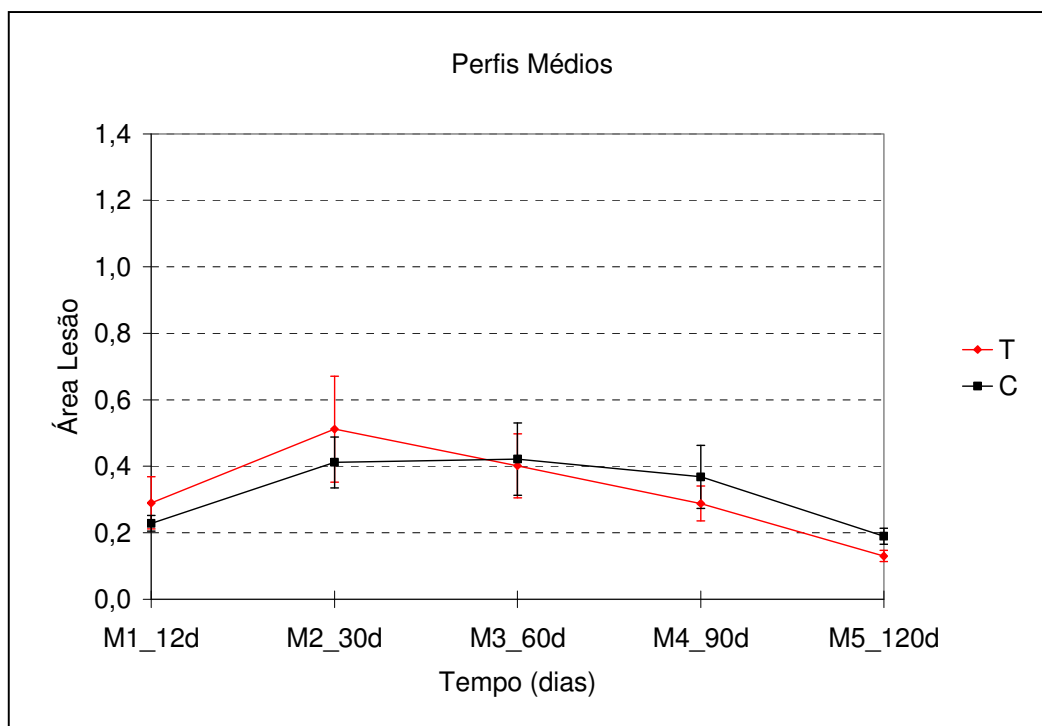


FIGURA 18: Perfis médios da área da lesão (cm²) ao longo das avaliações dos grupos tratado e controle.

TABELA 7: Resultado da análise de variância para a área da lesão.

Comparação	p
EFEITO DE GRUPO – M1-12d	0,5897
EFEITO DE GRUPO – M2-30d	0,3819
EFEITO DE GRUPO – M3-60d	0,8612
EFEITO DE GRUPO – M4-90d **	<,0001
EFEITO DE GRUPO – M5-120d	0,5998
EFEITO DE MOMENTO – GB*	0,0609
EFEITO DE MOMENTO - GA	<,0001
M1-12d x M2-30d – GA **	0,0288
M2-30d x M3-60d – GA	0,2779
M3-60d x M4-90d – GA **	<,0001
M4-90d x M5-120d – GA **	<,0001
M1-12d x M5-120d – GA	0,1145
M2-30d x M5-120d - GA **	0,0002

*GA- grupo tratado

GB- grupo controle

** estatisticamente significativo

No grupo controle não ocorreram alterações, em média, na área da lesão ao longo das avaliações ($p=0,0609$). Já para o grupo tratado, ocorreu um aumento significativo da área da lesão do dia 12 para o dia 30 ($p=0,0288$). Em seguida se manteve até o dia 60, quando começou a diminuir significativamente até o dia 120 (Figura 18, Tabela 6). Em média, a área da lesão no momento 120 dias foi significativamente menor do que o momento 30 ($p=0,0002$), mas não foi diferente do momento 12 dias ($p=0,1145$) (Tabela 7).

Apesar da área da lesão do grupo tratado ter partido de um valor um pouco maior que o grupo controle ($GA = 0,29$ e $GB = 0,23$), este quadro se inverteu no decorrer da pesquisa, sendo que em ambos os grupos o maior valor da lesão e sua maior porcentagem de comprometimento de fibras foi observada aos 30 dias, reduzindo-se gradualmente com o passar do tempo. Ao final do experimento, a área do grupo tratado encontrava-se em $0,13 \text{ cm}^2$ da área tendínea, enquanto no grupo controle esta área lesada era de $0,19 \text{ cm}^2$.

A partir dos 90 dias, a lesão foi se tornando mais difusa, sem limites tão definidos. A lesão aos 120 dias apresentava-se menos definida, com difícil delimitação devido à produção de matriz extracelular vir ocorrência como resultado da evolução da cicatrização, sendo mais complicada a mensuração de seu tamanho exato.

A análise da porcentagem de comprometimento de fibras, calculada pela relação entre a área lesada e área total do tendão (Figura 19, Tabela 8), revelou-se semelhante à situação apresentada em relação a área da lesão. Ambos atingiram o seu maior valor aos 30 dias e houve uma diminuição nos momentos seguintes, sendo os valores do grupo tratado maior que do grupo controle até os 30 dias, com inversão do quadro aos 60 dias, com maiores valores do grupo controle.

TABELA 8: Porcentagem (%) de área lesada segundo grupo e dia de avaliação.

Grupo	Dia	Media
GA	M1_12d	32,88
	M2_30d	39,75
	M3_60d	30,83
	M4_90d	25,05
	M5_120d	11,82
GB	M1_12d	25,52
	M2_30d	33,12
	M3_60d	33,42
	M4_90d	28,95
	M5_120d	16,43

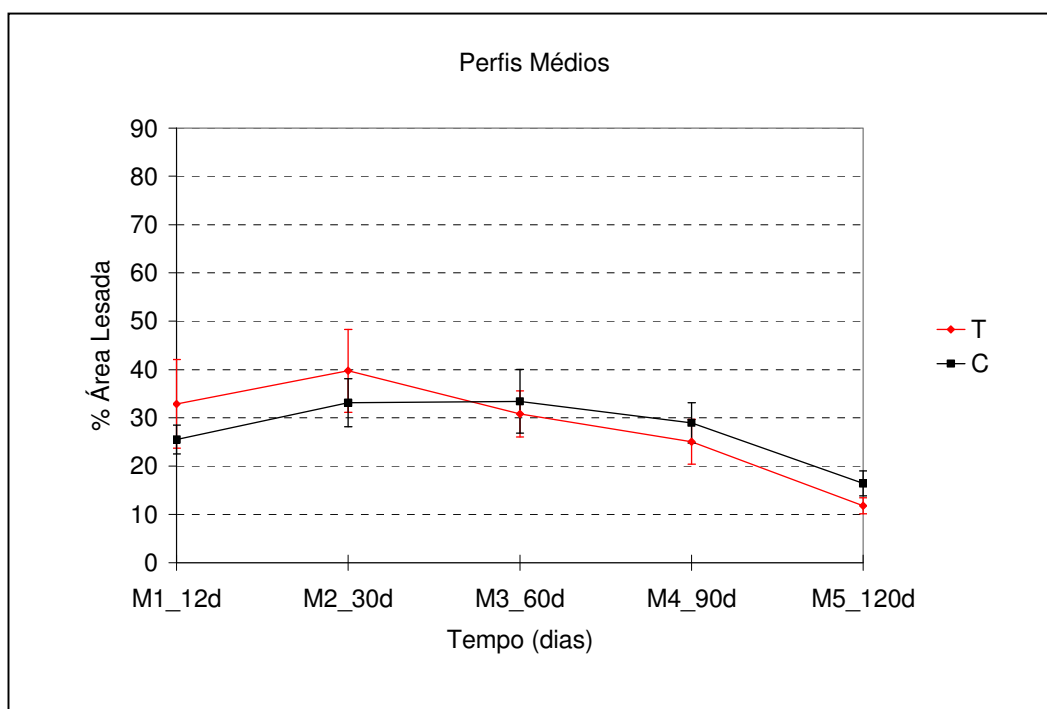


FIGURA 19: Perfis médios da porcentagem (%) da área lesada ao longo das avaliações dos grupos tratado e controle.

TABELA 9: Resultado da análise de variância para porcentagem (%) de área lesada.

Comparação	p
M1-12d x M2-30d	0,0857
M2-30d x M3-60d	0,3060
M3-60d x M4-90d	0,2233
M4-90d x M5-120d **	0,0022
M1-12d x M5-120d **	0,0003
M2-30d x M5-120d **	<,0001

** estatisticamente significativo

Não houve diferença significativa entre os perfis médios nos dois grupos ($p=0,9199$), ou seja, não houve diferença significativa entre a porcentagem de área lesada média para os grupos (em todos os momentos). Quanto às comparações entre avaliações consecutivas, observou-se somente uma diminuição significativa entre a porcentagem de área lesada média do dia 90 para o dia 120 ($p=0,0022$). A porcentagem de área lesada média é significativamente menor no dia 120 do que nos dias 12 ($p=0,0003$) e 30 ($p<0,0001$) em ambos os grupos (Tabela 9).

Ao comparar-se a média de ecogenicidade da lesão dos grupos nos diferentes momentos (Figura 20, Tabela 10), observou-se que a média da ecogenicidade da lesão inicial foi a mesma em ambos os grupos, também apresentando seu maior valor aos 30 dias e diminuindo na seqüência. O tempo de 120 dias foi suficiente para que a lesão atingisse padrão ecóico normal em apenas um membro do grupo tratado, sendo que todos os membros restantes do grupo tratado e todo o grupo controle não obtiveram completo reparo do padrão ecóico.

TABELA 10: Médias do grau de ecogenicidade segundo grupo e dia de avaliação.

Grupo	Dia	Media
GA	M1_12d	2,2
	M2_30d	3,7
	M3_60d	2,8
	M4_90d	1,7
	M5_120d	1,0
GB	M1_12d	2,5
	M2_30d	3,5
	M3_60d	3,0
	M4_90d	2,2
	M5_120d	1,3

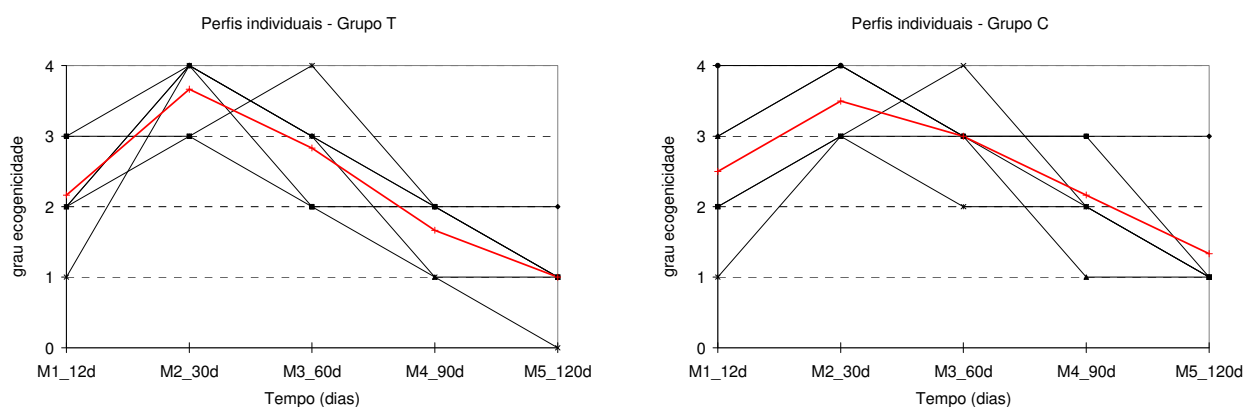


FIGURA 18: Perfis individuais (linha preta) e médios (linha vermelha) do grau de ecogenicidade ao longo das avaliações dos grupos tratado e controle.

Foi realizado um teste de Friedman para comparar os escores de ecogenicidade ao longo das avaliações separadamente para cada grupo. Para GA ocorreu uma mudança significativa do escore de ecogenicidade ao longo do tempo ($p < 0,001$), assim como para GB ($p = 0,003$). As comparações dos grupos pelo teste

de Wilcoxon indicaram que não há diferença significativa entre os dois grupos em todas as avaliações ($p>0,05$).

Avaliou-se ainda a porcentagem de redução do tamanho da lesão em relação à sua maior área (30 dias) nos diferentes momentos consecutivos, de forma a comparar a real progressão da redução (Figura 21). Esse valor foi calculado pelas diferenças entre as dimensões das lesões em ambos os grupos, tendo como referência o dia 30 (M2), momento em que a lesão apresentou a maior área de comprometimento. Desta forma, comparando-se a lesão aos 30 dias com os momentos subseqüentes (M3, M4, M5), observou-se sua porcentagem de redução (Tabela 11).

TABELA 11: Médias da porcentagem (%) de redução da lesão segundo grupo e dia de avaliação.

Grupo	Dia	Media
GA	M2_M3_60d	17,93
	M2_M4_90d	35,08
	M2_M5_120d	62,20
GB	M2_M3_60d	-2,03
	M2_M4_90d	10,45
	M2_M5_120d	46,80

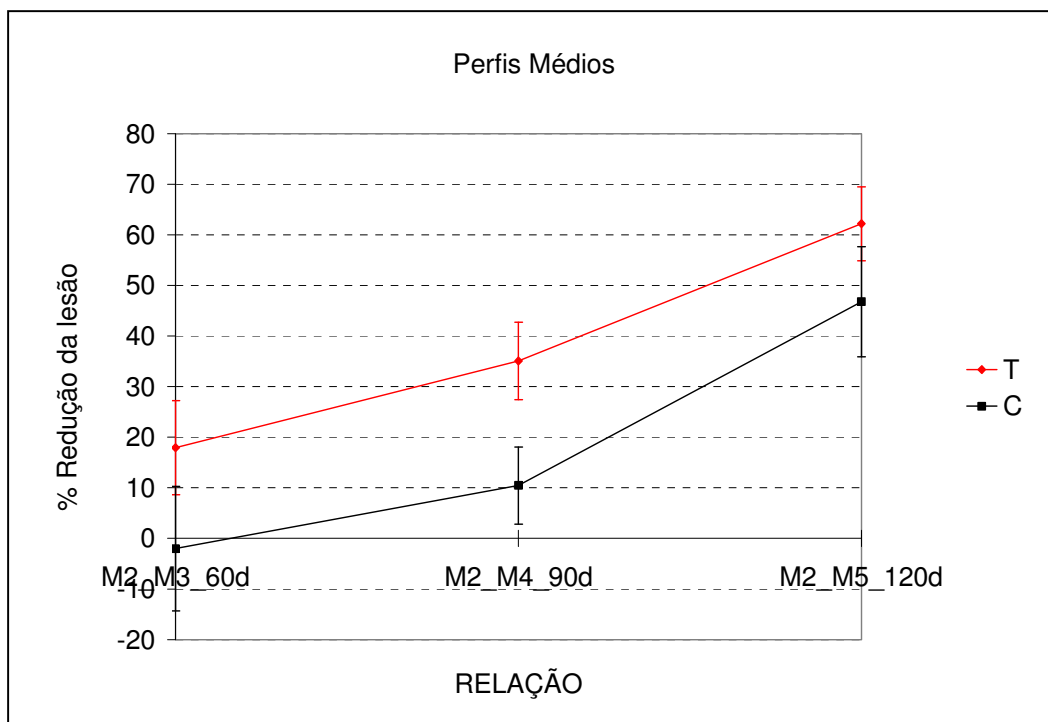


FIGURA 21: Perfis médios da porcentagem (%) de redução da lesão ao longo das avaliações dos grupos tratado e controle.

Tanto no grupo tratado quanto no controle a porcentagem de redução da lesão aumenta a medida que a avaliação se afasta do momento M2 (30 dias), e, adicionalmente, há uma diferença significativa entre os perfis médios nos dois grupos ($p=0,0143$), ou seja, o percentual de redução da lesão no grupo tratado é sempre significativamente maior que no grupo controle.

Em ambos os grupos houve melhora no alinhamento das fibras, apresentando disposição parcialmente paralela em todos os membros.

5.2.3 Avaliação por Ultra-Sonografia Power-Doppler

A vascularização pôde ser claramente observada nas imagens da região lesada com a evolução do processo, iniciando-se na periferia do tendão, e

progredindo para o seu interior, inclusive no próprio local da lesão. Uma grande variedade na intensidade, tamanho e número de sinais puderam ser notados (Figura 22, Figura 23).

Em todos os animais, nenhuma presença de fluxo foi observada na fase aguda do processo (aos 10 dias). Aos 20 e 30 dias após a lesão, os escores permaneceram semelhantes, sendo que apenas um animal apresentou leve sinal, sendo seu escore 1 para estes momentos. Aos 40 dias, 3 membros tratados e 2 controles apresentaram escore 1. Os valores se tornaram altos aos 60 dias (totalizando 48 dias de implante), quando os grupos tratado e controle apresentaram escore médio 2, atingindo o ponto máximo de visualização dos sinais aos 90 dias (78 dias pós-implante, apresentando escore 3 para grupo tratado e 2 no grupo controle), indicando uma diferença entre os grupos neste momento (Tabela 12).

Uma regressão foi observada aos 120 dias, tendo escores entre 1 e 2 para ambos os grupos, sendo que em apenas 1 membro do grupo controle foi observada a ausência de sinais.

Durante os primeiros exames, a profundidade (PRN) foi sendo alterada no aparelho, de forma a se obter a melhor qualidade de imagem para a visualização dos sinais. Uma boa identificação da presença de vasos foi feita ao se atingir profundidade de 0,3, sendo mantido esta PRN para todas as avaliações consecutivas.

A região do tendão que passou a apresentar sinais seguiu uma seqüência no tempo de maneira similar em todos os membros: uma maior número de sinais e com maior intensidade foram notados na periferia do tendão nos estágios iniciais (até os 40 dias), sendo que, com o passar do tempo, observou-se um aumento na quantidade de vasos no interior do tendão e da lesão (60 dias). No estágio final, aos 120 dias, tanto a intensidade e número de sinais reduziram rapidamente, retornando à região mais periférica, até não ser mais possível sua observação.

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.

Assim, houve um rápido aumento do dia 40 ao 60, permanecendo alta aos 90 dias, com declínio aos 120 dias.

TABELA 12: Média dos escores de sinais ultra-sonográficos Power Doppler nos grupos tratado e controle nos diferentes momentos analisados.

GRUPO	10 dias	20 dias	30 dias	40 dias	60 dias	90 dias	120 dias
Tratado	0	0,2	0,2	0,5	2,2	3	1,5
Controle	0	0	0	0,2	1,8	2	1,3

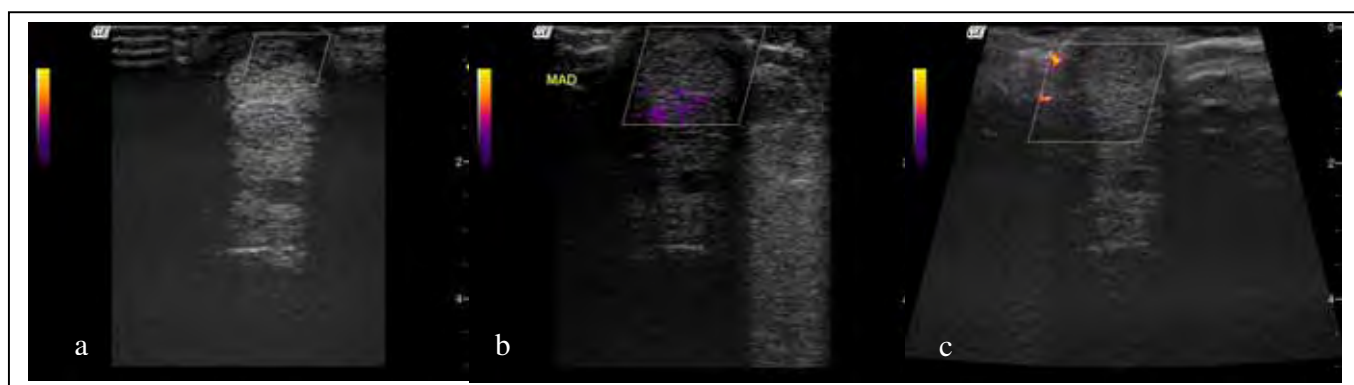


FIGURA 22: Exame US Power Doppler membro controle: a) 40 dias; b) 90 dias; c) 120 dias.

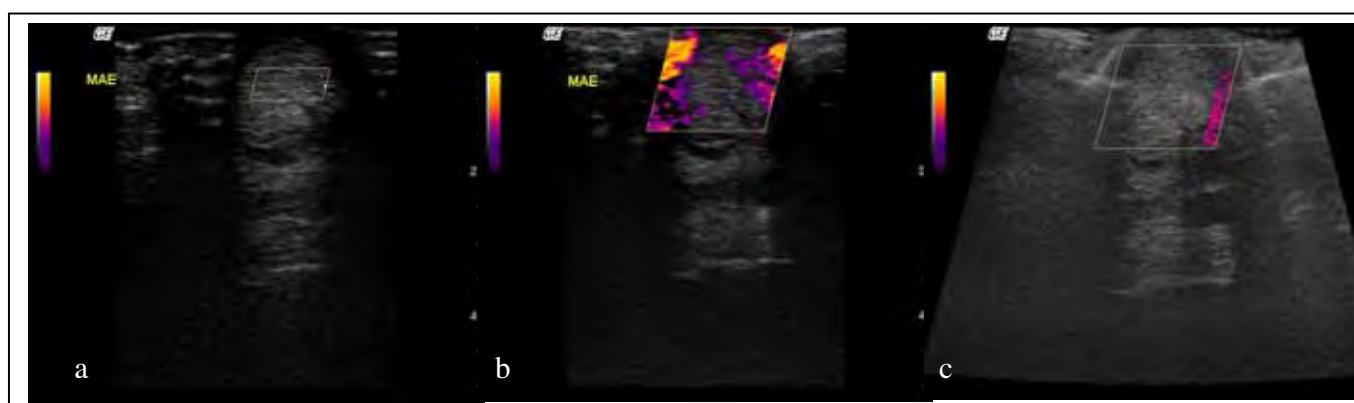


FIGURA 23: Exame US Power Doppler membro tratado: a) 40 dias; b) 90 dias; c) 120 dias.

5.2.4 Biópsia

Um leve aumento de volume, tanto no grupo controle quanto no grupo tratado, ainda se fazia visível. 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. Toda a região ao redor da lesão, incluindo o tecido subcutâneo e paratendão, apresentava grande quantidade de fibrose (Figura 24). No entanto, não foi possível determinar o local exato da área lesada visualmente. Alguns dos cortes apresentavam aspecto gelatinoso, sem o padrão usual das fibras tendíneas.

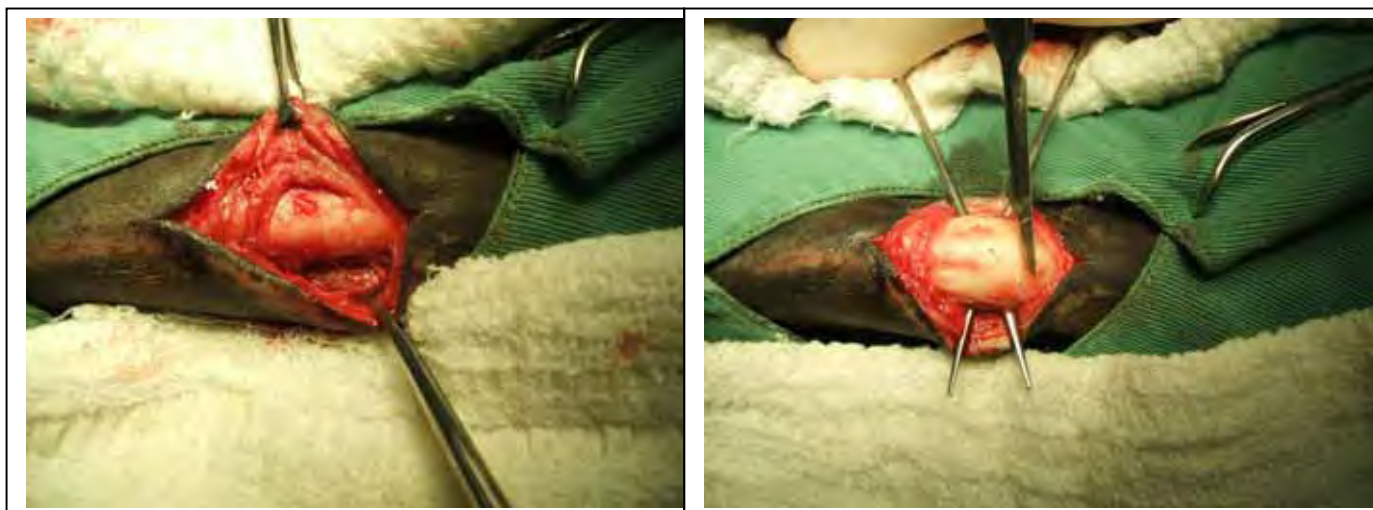


FIGURA 24: Acesso ao TFDS. Grande presença de fibrose pode ser observada. O tendão é apresentado com auxílio de pinça, e com o bisturi, retirou-se um pequeno fragmento.

5.2.5 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 hipercelularidade, caracterizando o estágio de evolução da reparação do tecido lesado.

No exame histopatológico do grupo tratado (GA) foram observadas fibras colágenas mais bem definidas, com maior organização e alinhamento, como também ondulações mais representativas, porém ainda não semelhante ao tecido sadio (Figura 27). Um dos animais tratados apresentou o início da organização em bandas. Os núcleos do fibroblastos encontravam-se mais alongados, porém a celularidade ainda foi alta, se comparado à celularidade encontrada em um tendão normal.



FIGURA 25: Tendão sadio (HE 200X).

Os vasos foram identificados em uma quantidade variável nesta fase da cicatrização, mas o grupo controle apresentou uma quantidade ligeiramente maior, sendo a parede destes vasos mais espessa. Os vasos tenderam a se alongar longitudinalmente, no sentido da força exercida sobre o tendão (Figura 26).

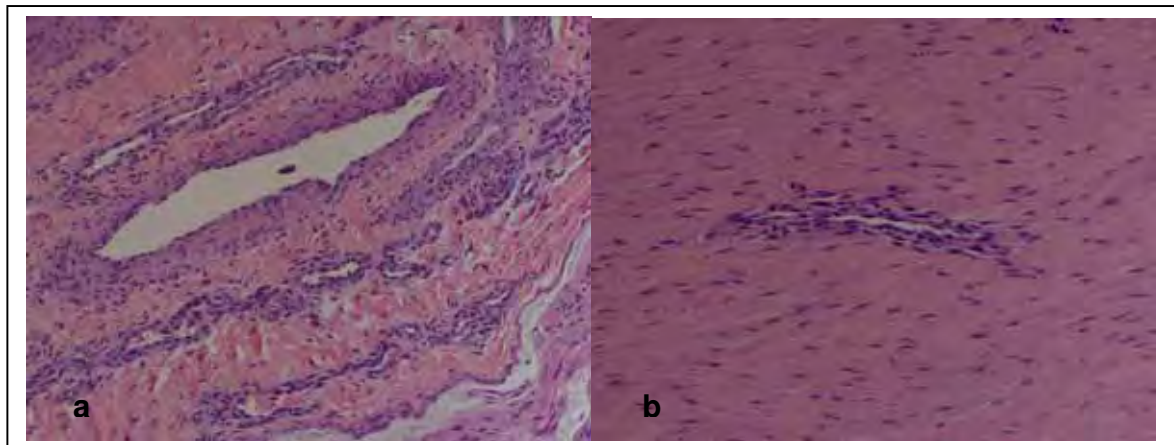


FIGURA 26: a) tendão do grupo controle, apresentando grande número de vasos, de parede espessa (HE, 200X); b) tendão do grupo tratado, apresentando vasos alongados, com endotélio delgado (HE, 200X).

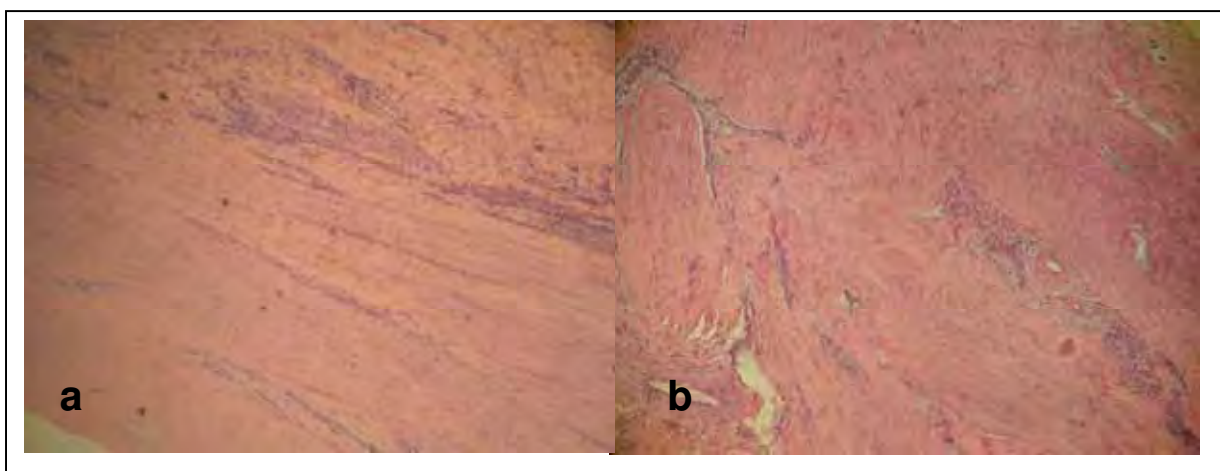


FIGURA 27: a) tendão tratado apresentando alinhamento das fibras e hipercelularidade (HE 100X); b) tendão controle apresentando organização tecidual irregular e hipercelularidade (HE, 100X).

O grupo controle (GB) 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 28).

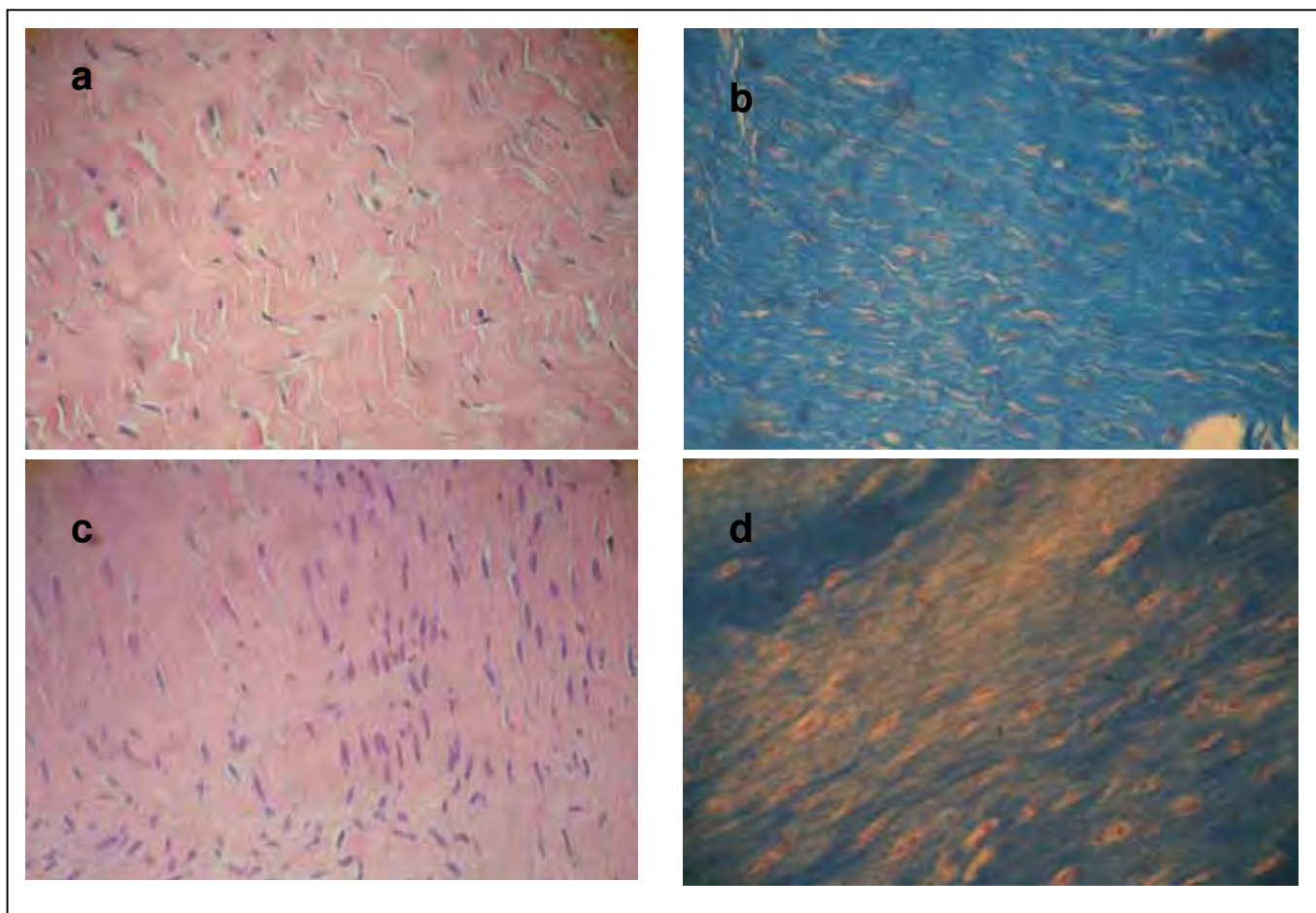


FIGURA 28: Corte histopatológico a) tendão tratado apresentando núcleos alongados e ondulações das fibras (HE, 400X); b) coloração de Tricrômio de Masson, identificando a presença de fibras colágenas em tendão do grupo tratado (400X); c) tendão do grupo controle com núcleos mais arredondados, sem padrão de ondulações (HE, 400X); d) coloração irregular das fibras do tendão controle (Tricrômio de Masson, 400X).

TABELA 13: Medidas dos marcadores colágeno tipo I, colágeno tipo III e VEGF por grupo.

Variável	Grupo	Media	p (Wilcoxon)
Colágeno tipo I - %	T	46,91	0,0313
	C	36,49	
Colágeno tipo III - %	T	25,88	0,3125
	C	31,28	
VEGF - %	T	7,28	0,4375
	C	9,18	

Os grupos tratado e controle apresentaram diferença estatisticamente significativa somente para o marcador colágeno tipo I % ($p=0,0313$).

Na avaliação imunoistoquímica, o anticorpo para colágeno tipo I mostrou marcação positiva de 46,91% no grupo tratado e de 36,49% no grupo controle, sendo este um valor significativo. Este resultado sinaliza uma maior quantidade de colágeno do tipo I presente no grupo tratado que no grupo controle, sendo este tipo caracterizado como a principal fibra constituinte do tendão sadio (Tabela13).

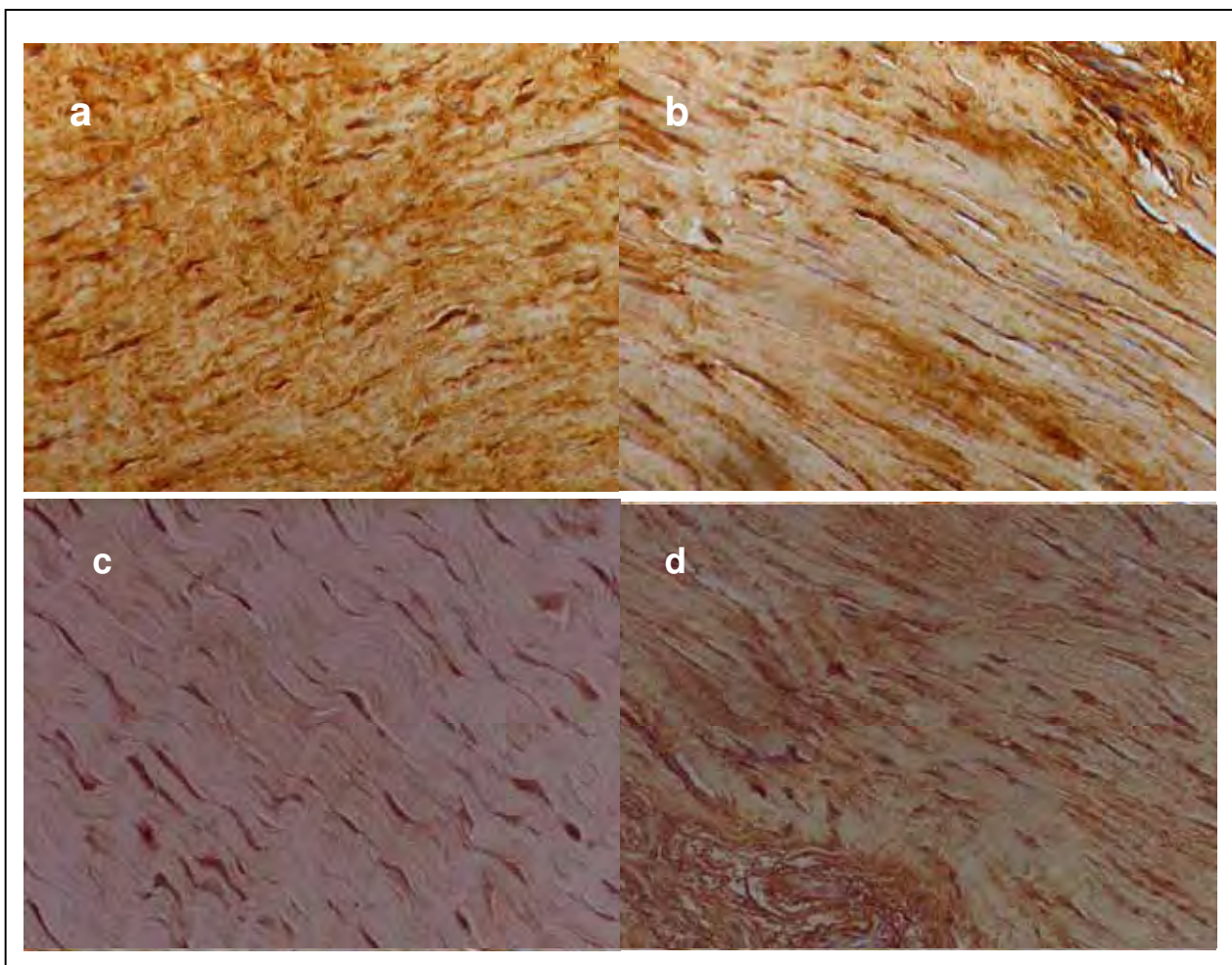


FIGURA 29: a) imunoistoquímica para colágeno tipo I – tratado (400X);
b) imunoistoquímica para colágeno tipo I – controle (400X);
c) imunoistoquímica para colágeno tipo III – tratado (400X);
d) imunoistoquímica para colágeno tipo III – controle (400X).

Quanto ao colágeno tipo III, que identifica a fibra colágena existente no tecido cicatricial, este foi encontrado em 31,28% no GB e em 25,88% no GA, sendo este um valor não significativo ($p=0,31$).

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), também marcado através de imunoistoquímica, teve marcação 9,18% no GB e 7,28% no GA, também não significativo.

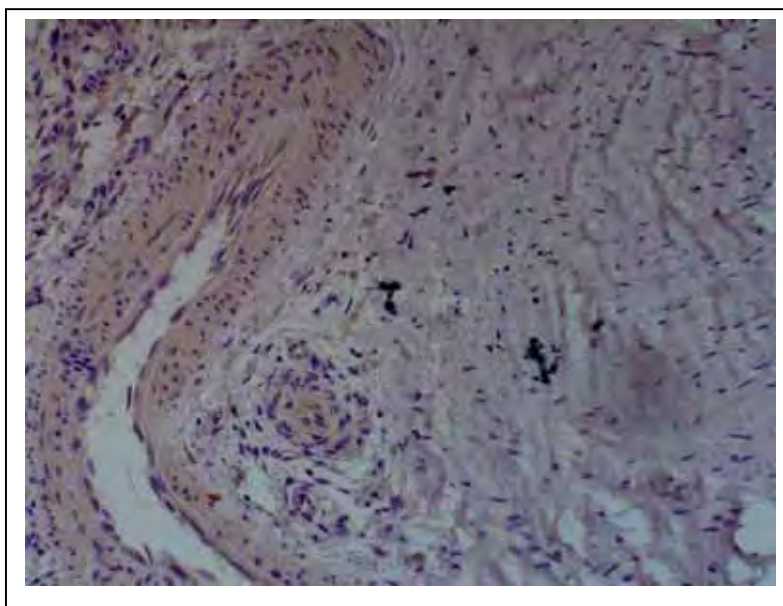


FIGURA 30: Marcação para VEGF. Pode ser observada uma marcação fraca, concentrada na região do endotélio dos vasos (200X).

Os resultados histopatológicos e imunoistoquímicos obtidos neste estudo demonstram que ambos os grupos se encontram em uma fase ativa de cicatrização, com alta celularidade e produção de matriz extracelular. Porém o grupo tratado apresentou uma maior organização tecidual e uma melhor qualidade do novo tecido quando comparado ao grupo controle (Figura 29).

6. DISCUSSÃO

6.1 TÉCNICAS DE MANIPULAÇÃO DAS CÉLULAS MESENQUIMAIS

6.1.1 Punção Aspirativa de Medula Óssea

A técnica de punção de medula óssea em esterno de eqüinos em estação, como descrita por Smith (2003) e utilizada por Barreira (2005) se mostrou viável, apesar do desconforto e risco para a pessoa que coleta a amostra, sendo

necessária certa força ventro-dorsal para colocação da agulha no local exato de sua penetração. Artigos anteriormente publicados (HERTHEL, 2002; THOMAS, 2003) descreveram a realização da punção de esterno através de anestesia geral e decúbito dorsal, o que não foi necessário no presente trabalho.

A tranquilização adotada mostrou-se eficiente para a realização do procedimento, acrescida de bloqueio anestésico local, e contenção (em tronco) dos animais. Desta forma, o custo e risco da técnica foram reduzidos, além de uma rápida manipulação e um menor número de pessoas envolvidas.

Apesar do tamanho da agulha, da necessidade de penetração do periósteo e do extenso aprofundamento no tecido ósseo, os animais não apresentaram dor ou incômodo durante o processo, o que sugere a eficácia do bloqueio anestésico aliado à sedação.

A aparência macroscópica das amostras mostrou-se semelhante às descrições de Car e Blue (2000), sendo caracterizadas por sangue com gotículas de gordura e presença de pequenos cristais acinzentados (espículas). Barreira (2005), Barreira et al. (2008) também descreveram uma aparência gelatinosa deste material e de maior viscosidade, que foi observado no momento da coleta, expelindo-se pequena quantidade de sangue em uma placa de Petri, dando um indício de produtividade da punção.

6.1.2 Separação da Fração Mononuclear

O procedimento de separação da fração mononuclear foi possível através da técnica descrita, semelhante ao obtido por Perin e colaboradores (2003), que descreveram procedimento similar em humanos. Smith e colaboradores (2003) realizaram técnica semelhante em eqüinos, porém com cultivo de células mesenquimais *in vitro*. A separação da fração mononuclear foi descrita de maneira semelhante em recente trabalho (ALVES et al., 2008b).

O volume total de obtenção das amostras foi de 10- 12 mL, sendo suficiente para obtenção de aproximadamente 43×10^6 células, as quais foram ressuspensas em um volume de 0,5 mL de soro autólogo para a realização do

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

O teste de viabilidade celular antes do implante foi realizado por Perin et al. (2003), com resultado médio de 96% de viabilidade, superior ao obtido por Barreira (2005), que foi de 76%. No presente trabalho, o resultado obtido foi um pouco maior, tendo média de 85,5% de células viáveis, mas ainda inferior ao obtido por Alves e colaboradores (2008), que descreveram a viabilidade obtida de 86,9%. Outros trabalhos publicados com a espécie eqüina não realizaram este teste (HERTHEL, 2002; THOMAS, 2003; SMITH et al., 2003). O uso de centrífuga refrigerada (não utilizada na presente pesquisa) é um fator que poderia aumentar a viabilidade celular, sendo preconizada a temperatura de 15° C para a realização de separação da fração mononuclear por gradiente de densidade (BOYUM, 1968). 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 obtidas pela punção de medula óssea de cada animal.

Possuindo-se o número de células obtidas na punção e separação da fração mononuclear, obteve-se o número de células viáveis a serem implantadas. O teste de viabilidade se faz importante pois nos permite saber o número de células viáveis a serem injetadas no tendão, assegurando maior confiabilidade ao trabalho e em seus resultados.

O uso da fração mononuclear no tratamento de lesões ortopédicas em eqüinos tem a vantagem de poder ser realizada no momento do diagnóstico (com menor tempo de preparo das células e custos) e ainda aumenta a concentração de células tronco mesenquimais para o implante direto, sendo o número de CTM na fração mononuclear de 0,001% a 0,01% (FORTIER & SMITH, 2008). No entanto, esta é uma mistura homogênea de tipos celulares (RICHARDSON et al., 2007).

6.1.3 Implante das Células da Fração Mononuclear de Medula Óssea

O implante celular foi realizado com facilidade, segundo a técnica de injeção intratendínea amplamente discutida pela literatura (GAUGHAN et al., 1998; ALVES et al., 2001a, 2001b; DAHLGREN et al., 2001). A visualização da agulha e do momento do implante da fração mononuclear foram facilitados pelo uso do aparelho GE Logiq 3. Através do acompanhamento em tempo real do momento exato do implante da fração mononuclear, 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.

A intensificação da inflamação após o implante mostrou diferença em relação aos procedimentos terapêuticos de infiltração intralesional de glicosaminoglicanos, nos quais não são observados aumento de volume ou sensibilidade à palpação tendínea, como descrito por Reef (1998), porém similar ao ocorrido com o tratamento realizado com FBAPN, apresentando discreto aumento de volume além do já existente (ALVES, 1998). A inflamação resultante do implante celular pôde ser explicada pela presença de diversos tipos celulares, que foram imunogênicos ao tecido, ou mesmo induzir uma calcificação ectópica (SMITH, 2004). Resultados descritos por Fortier e Smith (2007) 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. Smith (2004) descreveu que em animais onde houve dificuldade de implante devido à grande quantidade de fibrose formada, ocorreu leve piora da lesão provocado pelo procedimento

6.2 ANÁLISE DO REPARO TENDÍNEO

6.2.1 Análise Clínica e Ultra-Sonográfica

Diferentemente do que foi descrito na literatura (WILLIAMS, 1984; SPURLOCK et al., 1989; ALVES 1998) que induziram tendinite pela administração intratendínea de collagenase na dose de 0,5 mL, sendo a concentração 2,5mg/mL, neste trabalho optou-se por realizar a indução de lesão com a mesma concentração de collagenase, porém em um volume de 1,0 mL, de acordo com Yamada et al. (2005, dados em publicação). 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 collagenase 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 collagenase foi interpretado como edema decorrente do processo inflamatório instalado. Este se iniciou após a administração de collagenase e permaneceu até o final do experimento em dois membros tratados, mesmo que muito sutil, o que corrobora com os relatos de Williams (1984) e Gift et al. (1992). Nos outros animais, a redução do volume ocorreu entre 65 e 100 dias. Os membros dos animais do grupo tratado com células tronco contidas na fração mononuclear apresentaram discreto aumento de volume, além do já existente, iniciado logo após o implante. Estas alterações sugerem a intensificação do processo inflamatório no grupo tratado, mas que não dificultou a evolução do processo de reparação, conforme observado pelo acompanhamento do processo através do exame ultrassonográfico.

O aumento da sensibilidade na área lesada, observada à palpação, foi atribuído ao processo inflamatório que se instalou no local, permanecendo em

média até o 65º dia em ambos os grupos. Os resultados obtidos na presente pesquisa não foram similares aos de Williams (1984), que relatou a permanência das alterações clínicas por apenas uma semana em animais submetidos à lesão experimental dos tendões com uso da colagenase. Esta diferença entre os resultados pode ser justificada pela menor concentração da colagenase, ou mesmo pela diferença no tamanho da lesão instalada neste experimento, mas isto não pode ser avaliado pois não houve acompanhamento ultra-sonográfico no citado trabalho. A permanência da sensibilidade local se aproxima aos resultados obtidos por Barreira (2005), que descreve presente a resposta positiva à palpação até os 48 dias, momento em que foi realizada biópsia tendínea, mas diferentemente dos 90 dias de sensibilidade local observada por Marxen et al. (2004).

Quanto à atividade locomotora, após a administração de colagenase, observou-se claudicação moderada (grau 2 em média) por até 20 dias no grupo tratado e 15 dias no grupo controle, não sendo mais presente aos 45 dias no GA e aos 35 dias no GB. 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 ultra-sonográficas das lesões induzidas no presente experimento possibilitaram a delimitação de suas bordas, estando este resultado de acordo com os achados de Genovese et al. (1986); Alves (1994); Denoix (1996); 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 (1 mL) injetado no interior do tendão, que encontra grande resistência neste tecido extremamente denso.

A lesão induzida no presente experimento com colagenase (2,5mg/mL; 1,0 mL) revelou comprometimento de até 72% das fibras (em apenas um dos membros) no corte transversal no grupo tratado, tendo em média 33% de comprometimento de fibras, e no grupo controle o valor máximo foi de 35,71% (sendo a média 25,5%). No entanto, os maiores valores de comprometimento de fibras foram observados aos 30 dias, sendo a média aproximada de 40% no grupo tratado e 33% no grupo controle. 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 120 dias houve uma redução da porcentagem de área lesada, atingindo valores de 16% no grupo tratado e 11% no grupo controle, não sendo este um período suficiente para completa cicatrização da lesão, semelhantes ao obtido por ALVES (1998) aos 120 dias, e que se reduziram aos 150 dias, 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 12 dias após a indução, porém atingiram sua máxima definição aos 30 dias, quando se apresentaram anecóicas ou hipoecóicas em ambos os grupos. O valor da ecogenicidade média máxima neste momento foi grau 3,5 para os grupos tratado e controle. A porcentagem de comprometimento dos tendões obtidos pelo presente experimento são um pouco menores que os obtidos por Barreira (2005), porém mais severas quanto à ecogenicidade, que foi descrita como grau 2,5 em ambos

os grupos. No momento do implante, o padrão ecóico de ambos os grupos se encontrava similar.

As imagens anecóicas e hipoecóicas, segundo Henry et al. (1986); Dyson (1989); Reef et al. (1989); Genovese et al. (1990); Alves et al. (1993); Goodship e Birch (1996); Reef et al. (1996), são compatíveis com áreas de hemorragia, edema e tecido de granulação inicial na fase aguda da lesão. A 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 120 dias, houve uma importante melhora da ecogenicidade apresentada, sendo grau 1 no GA, e 1,3 em GB, 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 hipoecóicas 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 promova 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 ao corte longitudinal não foi semelhante ao encontrado em um lesão 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).

As células mononucleares demonstraram possuir ação benéfica no processo de reparo, durante o período de produção de matriz celular e fase de organização do tecido. Estas células apontaram uma melhora da lesão, pois analisando os padrões ultra-sonográficos (área do tendão, área da lesão, percentual de área lesada, ecogenicidade), as lesões dos grupos tratados foram mais severas, partindo de índices mais altos, e melhoraram em sua ecogenicidade, área lesada e percentual de área lesada significativamente, se igualando estatisticamente ao grupo controle. Células tronco mesenquimais favoreceram os aspectos clínicos e ultra-sonográficos, conforme descrito por Mountford (2006) e Crovace (2007). O percentual de redução de lesão foi significativamente maior no grupo tratado em todos os momentos, comprovando a eficiência das células mononucleares como tratamento de lesões tendíneas em equinos.

Foi observado pelo presente trabalho que o processo inflamatório, com o aumento do tamanho da lesão e a sua aparência anecóica ou hipoecóica, ocorre até o período de 30 dias após a sua indução. O momento ideal para a realização do implante das células seria após a fase inflamatória inicial, porém anterior à formação de fibrose (RICHADSON et al., 2007). Existe uma “janela de oportunidade” para o tratamento, sendo que após a fase inflamatória, é interessante que se forme uma granulação de suporte para a adesão das células injetadas, porém sem que exista uma fibrose substancial (SMITH, 2004). Ainda, lesões centrais, como as geralmente apresentadas nas tendinites do flexor digital superficial em eqüinos, se preenchem rapidamente no momento do implante quando uma lesão hipoecóica ainda é visível (FORTIER e SMITH, 2007). Em pesquisas recentes que utilizam as células mesenquimais provenientes de medula

óssea, a coleta foi realizada 1 mês após a ocorrência da lesão e as células foram cultivadas durante 3 semanas, até a realização do implante, sendo o intervalo médio entre lesão e injeção das células de 45 dias (RICHARDSON et al., 2007; FORTIER e SMITH, 2007; SUTTER, 2007; FORTIER E SMITH, 2008). Smith (2004) recomenda a realização do implante com 2 meses de evolução da lesão tendínea. Hoje, se sabe que as células tronco são atraídas para as regiões onde está ocorrendo o processo inflamatório, razão pela qual optou-se inicialmente o período de 12 dias após a indução da lesão. Baseado, nesta forma, nos dados da literatura e os resultados obtidos no presente experimento, acreditamos ser interessante a realização da injeção intratendínea das células mononucleares no 30º dia após a indução da lesão, e não ao 12º dia, como foi realizado nesta pesquisa.

6.2.2 Avaliação por ultra-sonografia Power Doppler

Não foi observado fluxo vascular ao exame Power Doppler nos tendões dos membros anteriormente previamente à indução da lesão, dado que concorda ao apresentado por Richards et al. (2001). Os resultados encontrados por este estudo sugerem um desenvolvimento e regressão tempo-dependente da vascularização da lesão tendínea nos eqüinos, de forma semelhante ao que ocorre em alterações articulares de coelhos (STROUSE et al., 1999). No entanto, 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).

Independentemente da diferença de tamanho e severidade da lesão, a duração dos períodos foi similar para ambos os grupos, porém a dinâmica do fluxo vascular seguiu de forma diferente entre eles. Os maiores fluxos foram observados na região periférica do tendão flexor digital superficial, principalmente próximo ao tendão flexor digital profundo. O fluxo sanguíneo foi observado em alguns animais aos 30 dias após a lesão, iniciando-se perifericamente ao tendão flexor digital superficial. Com o passar dos dias, aumentou a quantidade de fluxo

visualizado, como também a intensidade. A neovascularização atingiu a região mais interna do tendão, inclusive o local da lesão, ao redor dos 60 dias, período em que houve alta hipersensibilidade ao exame Power Doppler. Permaneceu com localização e intensidade semelhantes até os 90 dias, sendo que em ambos os momentos a área lesada apresentou redução constante. Richards et al. (2001) observaram que na tendinose em humanos ocorreu um aumento no número de vasos conforme o tendão aumentava de tamanho, acreditando que haveria uma correlação entre os dados. Aos 120 dias, ocorreu uma redução brusca na visualização de sinais (fluxo sanguíneo) na maioria dos animais, representando a redução na vascularização da estrutura. Em 2001, Walther et al. demonstraram que os achados de fluxo sanguíneo sinovial avaliados correlacionaram-se com a extensão da vascularização encontrada nos achados histológicos de tecido sinovial de joelho.

De maneira geral, o grupo tratado apresentou maior intensidade nos sinais durante exame, identificado como um maior fluxo vascular tendíneo, e também uma maior sensibilidade visualizada no interior do tendão, inclusive na lesão.

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 e até a resolução do processo cicatricial, associado ao exame ultra-sonográfico 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, não foi possível identificar o local da lesão por inspeção visual em nenhum dos grupos, apenas uma grande quantidade de fibrose, diferentemente 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 ultrasonográfica para a identificação da região. 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, 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. Definiu-se a região a ser biopsiada através de uma marcação sobre a pele feita na altura da lesão, associado às imagens ultrasonográficas realizadas após a indução da lesão.

Os resultados obtidos na avaliação histopatológica (H.E. e Tricrômio de Masson) realizada ao 120º dia após a indução da lesão mostraram que todos os grupos possuíam fibroplasia, de maneira semelhante aos relatos existentes na literatura (SILVER et al., 1983; PEACOCK, 1984; GOODSHIP et al., 1994; ROBBINS et al., 1994). MARXEN et al. (2004) descreveram que, independentemente do tratamento aplicado à lesão tendínea, foram observados graus intensos de vascularização aos 150 dias, com grande número de vasos residuais e recém formados por todo fragmento tendíneo. 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 um aspecto importante aos 120 dias, acompanhado da presença de vasos, do aumento do número de fibroblastos, e da organização e alinhamento das fibras, porém ainda apresentando grande irregularidade. O uso de células

autólogas no tendão patelar em coelhos promoveu um aumento moderado da celularidade ao final de 12 semanas, organizadas paralelamente à linha de tensão do tendão (JUNCOSA-MELVIN et al., 2006). Silver et al. (1983) descreveram uma hipercelularidade aos 14 meses após indução experimental de lesão tendínea, com pequenas divisões em bandas e anormalidades histopatológicas, apesar do aspecto da cicatriz estar se tornando semelhante a do tendão normal. Tal organização em bandas ainda não foi observado neste experimento (exceto em um membro tratado), apenas o início do alinhamento das fibras.

Os fibroblastos no grupo tratado, apesar de ainda existir uma grande celularidade se comparado ao tendão sadio, apresentaram núcleos mais alongados, e a matriz corou-se mais fortemente do que no grupo controle. As células e as fibras encontravam-se mais claramente alinhadas, iniciando uma organização em paralelo, e as ondulações foram mais presentes.

Os vasos não foram identificados em um grande número na maioria dos cortes histológicos, diferentemente do que foi identificado nos 3 primeiros meses por Silver et al. (1983), e 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 120 dias 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 é possível notar o início da ocorrência da fase de maturação, com uma menor quantidade de vasos, mas ainda com alta celularidade.

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 celulares conhecidos em humanos (PITTINGER 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. Este experimento utilizou reação de imunoistoquímica, com o uso de marcadores específicos para colágeno tipo I e III.

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 nesta fase da cicatrização tendínea. Os valores encontrados são baixos nesta fase do processo e a marcação fraca em ambos os grupos, não existindo diferença significativa entre eles. As regiões mais marcadas foram do endotélio dos vasos, sendo mais raros em matriz extracelular, e não marcado em fibroblastos. Este dado discorda do obtido por Petersen e colaboradores (2002), que 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. Nesta mesma pesquisa, as regiões marcadas foram na matriz extracelular, células vasculares endoteliais e em fibroblastos, sendo que a marcação para VEGF reduziu-se apenas após 24 semanas, acompanhado de menor celularidade do tecido. Alves et al. (2008a) identificaram 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.

Conforme era esperado no atual trabalho, o índice de marcação para VEGF revelou uma fase tardia da proliferação de vasos, pois o número foi baixo em ambos os grupos e a coloração de fraca intensidade, não havendo diferença estatística entre eles.

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.

Uma reação adequada foi obtida, considerando que o tecido lesado avaliado possuiu um menor número de ligações cruzadas, porém houve dificuldade na contagem pontual da marcação, além de uma certa 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. 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.

O efeito do tratamento com células da fração mononuclear de medula óssea, em especial das células precursoras mesenquimais, aplicadas às lesões tendíneas induzidas neste experimento, possibilitou um melhor reparo tendíneo, sob aspectos analisados histologicamente. Esta consideração está de acordo com dados divulgados por Herthel (2002) e Thomas (2003), que sugeriram este efeito, porém baseados em análise clínica, ultra-sonográfica e funcional das estruturas tendo-ligamentares. Barreira (2005) avaliou histologicamente lesões tratadas com células tronco mesenquimas contidas na fração mononuclear 48 dias após a sua indução, e sugeriu a aceleração do processo. 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.

Durante o processo cicatricial, a fase proliferativa inicial é marcada por um pico na expressão de colágeno tipo III. Posteriormente, na fase de organização, a fibra colágena do tipo III é substituída por fibra colágena tipo I (MATSUMOTO et al., 2002). Os resultados da imunoistoquímica revelaram 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. Observou-se uma diferença significativa na marcação para colágeno tipo I entre os grupos (sendo maior no grupo tratado), porém não para colágeno tipo III. Apesar de não haver diferença entre os dados para colágeno tipo III, este foi numericamente menor no grupo tratado. Estas observações nos leva a concluir que houve uma melhor reparação do tecido no grupo tratado (e sua maior qualidade). 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 razão apresentada entre colágeno tipo I/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 imunomarcação 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).

Novas técnicas de quantificação das fibras colágenas devem ser desenvolvidas para uma avaliação mais fidedigna da qualidade da cicatrização.

De forma geral, em nossa avaliação foi possível sugerir que o grupo submetido à terapia celular apresentou melhores parâmetros avaliados, representando uma diferença benéfica em relação ao grupo controle. Acredita-se que a utilização desta terapia, combinada ao esquema de atividade física controlada e com acompanhamento de avaliações clínicas e ultra-sonográficas seriadas, possa acelerar o processo de reparação tendínea, contribuindo de maneira decisiva para a redução do período de cicatrização e melhorando a sua qualidade, evitando recidivas. Black et al. (2007) acreditam 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, seriam a teoria que responde aos benefícios atribuídos à terapia celular. Os resultados apresentados por Södersten (2006) na avaliação de lesões tendíneas em eqüinos não indicam uma ausência de fibroblastos/tenócitos como um mecanismo da cicatrização tecidual, pois foi encontrado um alto número de células fibroblásticas na lesão tendínea, no que prova que estas células já estão presentes no tendão.

Este trabalho mostra que o uso das células mononucleares melhorou a velocidade de reparação da lesão e a qualidade do tecido neoformado, porém, novos estudos devem ser desenvolvidos de maneira a apoiar esta hipótese.

Ainda se fazem necessárias pesquisas utilizando células tronco adultas provenientes de outras fontes, sejam elas tecido adiposo e células isoladas e expandidas em laboratório, de forma a avaliar a real eficácia destes tratamentos.

Desta forma, também se faria possível comparar e definir qual o tipo de processamento celular seria mais benéfico para o tratamento de tendinites.

7. CONCLUSÕES

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

1- A terapia celular tendínea com células mononucleares da medula óssea, melhorou a organização tecidual e acelerou o processo de cicatrização tendínea. A realização do procedimento foi seguro e não apresentou nenhum risco ao animais.

2- O tecido neoformado foi de uma qualidade superior quando tratado com células mononucleares, apresentando uma maior expressão de fibras colágenas tipo I.

3- O exame ultra-sonográfico Power Doppler se mostrou eficiente para o acompanhamento da dinâmica vascular, que segue um padrão de evolução semelhante nos grupos tratado e controle, porém com maior visualização de vascularização nos membros tratados.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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

sonográfica e morfológica. 1998. 92p. **Tese de doutorado**. Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

ALVES, A.L.G.; RODRIGUES, M.A.M.; AGUIAR, A.J.A.; 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. Science**, v. 21, 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 ultra-sonográfica. **Rev. Educ. Contin. CRMV-SP**, v. 4, p. 17-19. 2001b.

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

ALVES, A.L.G. et al. Expression of vascular endothelial growth factor and angiogenesis in experimental superficial digital flexor tendonitis after autologous implant of bone marrow mesenchymal stem cell. **10th Congress of the World Equine Veterinary Association WEVA**, Moscow, January, 2008a.

ALVES, A.L.G. et al. Protocolo de isolamento de células mononucleares de medula óssea de eqüinos, 2008b. Dados em publicação.

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. **Tiss. 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 eqüinos frente ao exercício: avaliação ultra-sonográfica. **Rev. Bras. Ciênc. Vet.**, v. 9, n. 1, p. 95-97, 2002.

BARREIRA, A.P.B. et al. Autologous Implant of Bone Marrow Mononuclear Cells as Treatment of Induced Equine Tendinitis. **Intern. J. Appl. Res. Vet. Med.**, v. 6, n. 1, p.46-54, 2008.

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

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. Haemato.**, 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.; 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.

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

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

BROFMAN, P.R. et al. Transplante celular: análise funcional imunocitoquímica e histopatológica em modelo experimental de miocardiopatia isquêmica utilizando diferentes células. **Rev. Brás. 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. **American Journal of Veterinary Research**. 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**. Philadenphia: Lippencott Williams and Wilkins, cap. 4, p. 18-29. 2000.

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

CARVALHO, H.F. et al. Identification, content, and distribution of type VI collagen in bovine tendon. **Cell and Tissue Research**, v.325, n.2, p.315-324, 2006.

CHEN, J.C.J.; GOLDHAMER, D.J. Skeletal muscle stem cell. **Reprod. Biol. Endocrin.**, 2003. Disponível em www.rbej.com.

CHONG, A.K.S. et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells influence early tendon-healing in a rabbit achilles tendon model. **The Journal of Bone and Joint Surgery (American)**, n.89, p.74-81, 2007.

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

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

CROVACE, A.; LACITIGNOLA, L.; DE SIENA, R.; ROSSI, G.; FRANCIOSO, E. Cell therapy for tendon repair in horses: an experimental study. **Veterinary Research Communications**, 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.

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

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

De UGARTE, 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 Tiss. Org.**, V.174. p.101-109, 2003.

DIGGLE, P. J.; LINAG, K.; 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 assessment of tendon damage. **Equine Vet. Educ.**, v. 1, p. 42, 1989.

DYSON, S.J. Treatment of superficial digital flexor tendinitis: A comparison of conservative management, sodium hyaluronate and glycosaminoglycan polysulfate. **Am. Ass. Equine Practors.**, v.43, p.297-300, 1997.

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

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

FAGOT-LARGEAULT, A. Embryos, stem cells and cellular therapies- philosophical and anthropological problems. **Nature**, v. 430, n. 125- 300.

FOLAND, J. W.; TROTTER, G.W.; POWERS, B. E. et al. Effect of sodium hyaluronate in collagenase induced superficial digital flexor tendinitis in horses. **Am. J. Vet. Res.**, v. 53, p. 2371-6, 1992.

FORTIER, 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., Stem Cells: Classifications, Controversies, and Clinical Applicatios. **Vet. Surgery**, 34;415-423, 2005.

FORTIER, L.A.; SMITH, R.K. Evidence for stem cell in cartilage regeneration. **AAEP Proceedings**, v.53, p.329-334, 2007.

FRISBIE, D.D.; Kawcak, C.E.; 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. **AAEP Proceedings**, vol. 52, 2006.

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

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

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.; REEF, V.B.; LONGO, K.L. Superficial digital flexor tendonitis: long term sonographic and clinical study of racehorses. In: Dubai International Equine Symposium,1996. **Proceedings of Dubai ...**, Dubai, 1996, p.187-205.

GENOVESE, R.L. Sonographic response to intralesional therapy with Beta-Aminopropionitrile Fumarate for clinical tendon injuries in horses. **Proc. Am. Ass. Equine Practors.**, v.38, p.265-272, 1992.

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

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

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

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

GILLIS, C. Tendon and ligament healing. In: **Proceedings of the First Dubai International Equine Symposium**. The Equine Athlete: tendon, Ligament and Soft Tissue Injuries. Eds: N.W. Rantanen and M.L. Hauser, M.R. Rantanen Design, Dubai. P.417-421, 1996.

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. **Joint 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.; BIRCH, H.L. The pathophysiology of the flexor tendons in the equine athlete. In: **Proceedings of the First Dubai International Equine Symposium**. The Equine Athlete: tendon, Ligament and Soft Tissue Injuries. Eds: N.W. Rantanen and M.L. Hauser, M.R. Rantanen Design, Dubai. 83-107. 1996.

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

HANKEMEIER, S. et al. Tissue engineering of ligaments by human bone marrow stromal cells in a liquid fibrin matrix: histological, biomechanical, and molecular biological results of a study with immunodeficient rats. **Proceedings of the 51st Orthopaedic Research Society Meeting**, n.30, p.157, 2005.

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. 132-40, 1986.

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

HOLLANDER, M.; WOLFE, D. A. **Nonparametric Statistical Methods**. John Wiley & Sons, Inc, Canada, 1973.

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

JUNCOSA-MELVIN, N. et al. The effect of autologous mesenchymal stem cells on the biomechanics and histology of gel-collagen sponge constructs used for rabbit tendon repair. **Tissue Engineering**, 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.

LASLETT, A.L.; FILIPCZYK, A.A.; PERA, M.F. Characterisation and culture of human embryonic stem cells. **Trends Cardiovascular Medicine**, 13. 295-301. 2003.

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. Journal**, 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. Haematology**, v.39, p.879-886, 2002.

MARXEN, S.; NETO, J.C.L.; 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.; ODELBURG, S.J.; KEATING, M.T. Mammalian myotube dedifferentiation induced by newt regeneration extract. **Proc. Natl. Acad. USA**, v.98, n.24, p.13699-704, 2001.

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

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

MORRIS, D.D.; WHITLOCK, R.H. Relapsin idiopathic thrombocytopenia in a horse. **Equine Vet. Journal**, 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, september/october, 2006.

MUNOEKA K.; HAN. M.; GARDINER, D.M. Perspectivas para Regeneração de Membros Humanos. **Scientific American Brasil**, n°ed.72, maio, 2008.

MUSCHLER, G.F.; MIDURA, R.J.; NAKAMOTO, C. Practical modeling concepts for connective tissue stem cell and progenitor compartment kinetics. **J. Biomed. and Biotechnol.**, v. 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 An. Pract.**, v. 43, p. 208-212, 2002.

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

ODELBERG, S.J.; KOLLHOFF, A.; KEATING, M.T. Dedifferentiation of mammalian myotube induced by msx1. **Cell**, v.103, n.3, p.1099-109, 2000.

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

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. Comparison of collagen fibril populations in the superficial digital flexor tendons of exercised and no exercised Throroubreds: a controlle study. **Equine Vet. J.**, v. 30, n. 1, p. 61-64, 1998.

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. **Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery Including Arthroscopy and Sports Medicine**, v. 123, n. 4, May, p. 168-174. 2003.

PITTENGER, 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: **Proceedings** of the First Dubai International Equine Symposium. The Equine Athlete: tendon, Ligament and Soft Tissue Injuries. Eds: N.W. Rantanen and M.L. Hauser, M.R. Rantanen Design, Dubai. p.109-117, 1996.

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. and 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: **Proceedings of the First Dubai International Equine Symposium**. The Equine Athlete: tendon, Ligament and Soft Tissue Injuries. Eds: N.W. Rantanen and M.L. Hauser, M.R. Rantanen Design, Dubai. p.423-430, 1996.

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. Ass. Equine. Practors.**, 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. **Clinical Radiology**, v.56, p.843-850, 2001.

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

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

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. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v.47, n.3, p.301-306, 2006.

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. **Am. Ass. Equine. Practors.**, v.43, p.291-296, 1997.

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.

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

SHARMA, P.; MAFFULLI, N. Tendon injury and tendinopathy: healing and repair. **The Journal of Bone & Joint Surgery**, 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.

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, **Proceedings of Dubai ...**, Dubai....1996. p. 55-81.

SMITH, R.K.W. Pathophysiology of tendon injury. In: **Diagnosis and Management of Lameness in the Horse**. Eds: Ross and Dyson. Saunders. p.616-628, 2002a.

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 A Mol. Integr. Physiol.**, v. 133, 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. **12th ESVOT Congress**, Monique, Setembro 2004. p.187-188.

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 eqüinos**. Porto Alegre: Artmed, p. 319-321, 1999.

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

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, 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 erytroid maturation. **Anat. Rec.**, v. 213, p. 202-206, 1985.

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.

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, p.1049-1053, 2003.

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

VERONEZI, R. DE 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 eqüinos. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária Equina**, São Paulo, 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.

WAKITANE, S.; GOTO, T.; PINEDA, S.J. et al. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. **J. Bone Joint 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. **Arthritis 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.

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. 326-38, 1984.

WILLIAMS, R.B.; HARKINS, L.S.; HAMMOND, C.J.; WOOD, J.L.N. 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, p. 478-486, 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. **Dubai International Equine Symposium Proceedings**, p. 1-22, 1996.

WILSON A.M.; McGUIGAN, M.P.; SU, A.; VAN DEN BOGERT, A.J. Horses damp the spring in their step. **Nature**. V.414, p. 895-9, 2001.

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.** 367S. 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: **Orthopaedic Basic Research**. 2nd Ed. Buckwalter, Einhorn and Simon. American Academy of Orthopaedic surgeons. p581-616. 2000.

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, 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, 1994.

YAMADA, A.L.M. et al. Avaliação ultra-sonográfica de tendinite do flexor digital superficial, induzida experimentalmente em eqüinos. **Em publicação**, 2008.

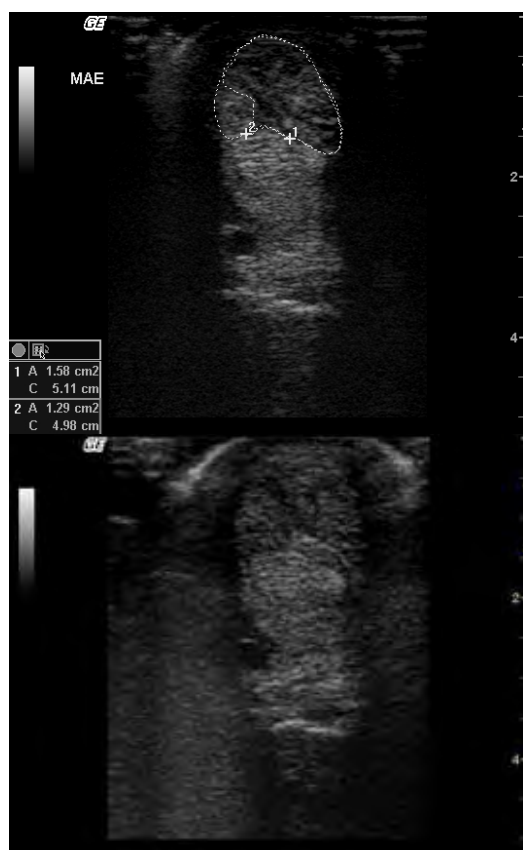
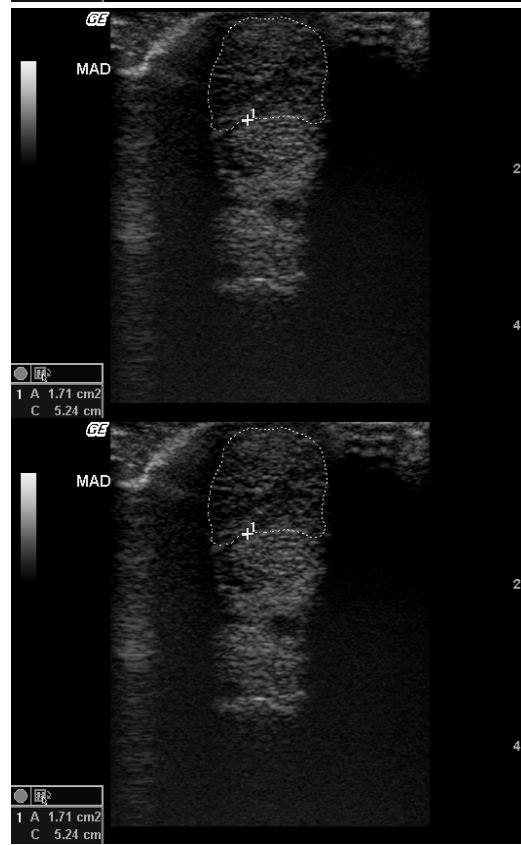
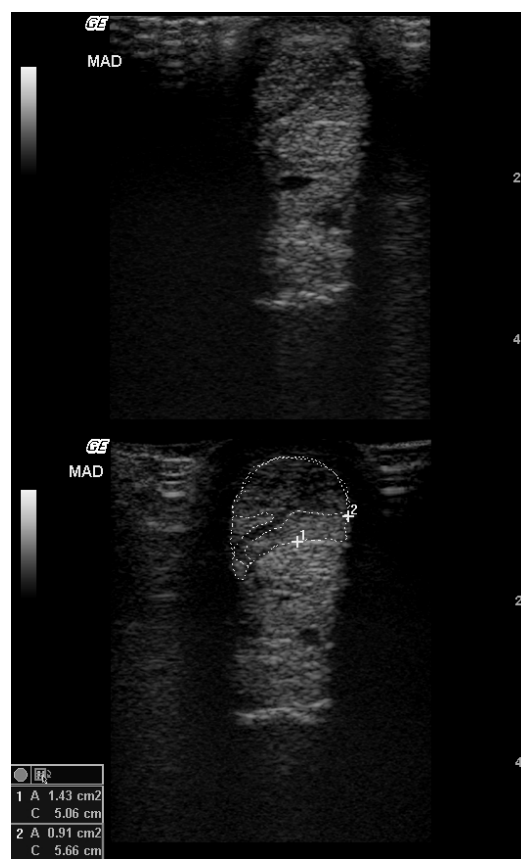
YOUNG,R.G.; BUTLER, D.L.; WEBWE, W.; CAPLAN, A.I.; GORDON, S.L.; FINK, D.J. Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. **J. Orthop. Res.**, v.16,p. 406-413, 1998.

ZANETTI, M. et al. Achilles Tendons: Clinical Relevance of Neovascularization Diagnosed with Power Doppler US. **Radiology**, v.227, n.2, p.556-560, 2003.

ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. **Células-Tronco A nova fronteira da medicina**. São Paulo, Editora Atheneu, 1^a edição, 2006.

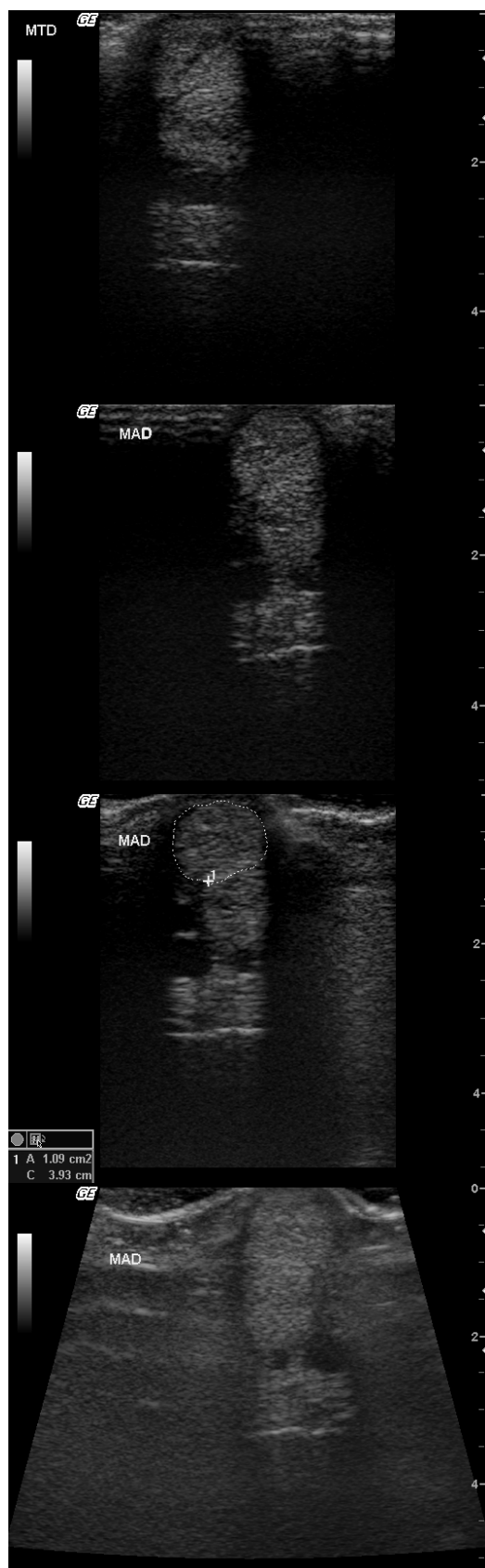
ZUK, P.A.; ZUH, M.; ASHJIAN, P. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Mol. Biol. Cell**, v.13, p. 4279-4295, 2002.

ANEXO 1: Acompanhamento ultra-sonográfico do animal 1, corte transversal, aos dias 30, 60, 90 e 120 após indução de lesão.

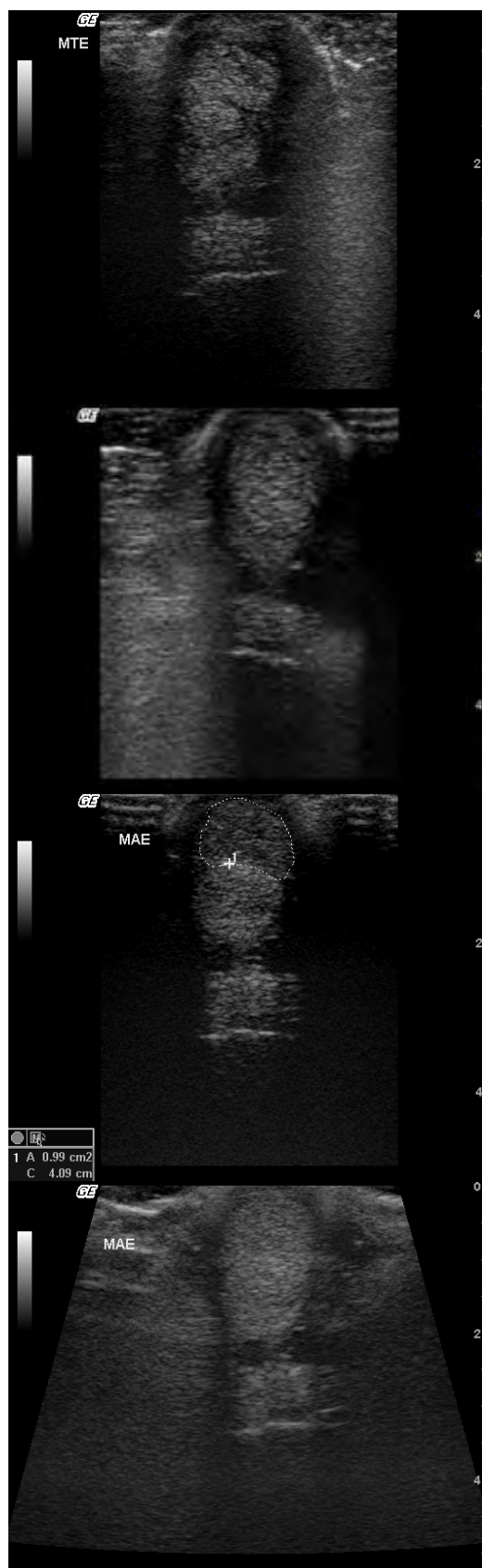
TRATADO**CONTROLE**

ANEXO 2: Acompanhamento ultra-sonográfico do animal 2, corte transversal, aos dias 30, 60, 90 e 120 após indução de lesão.

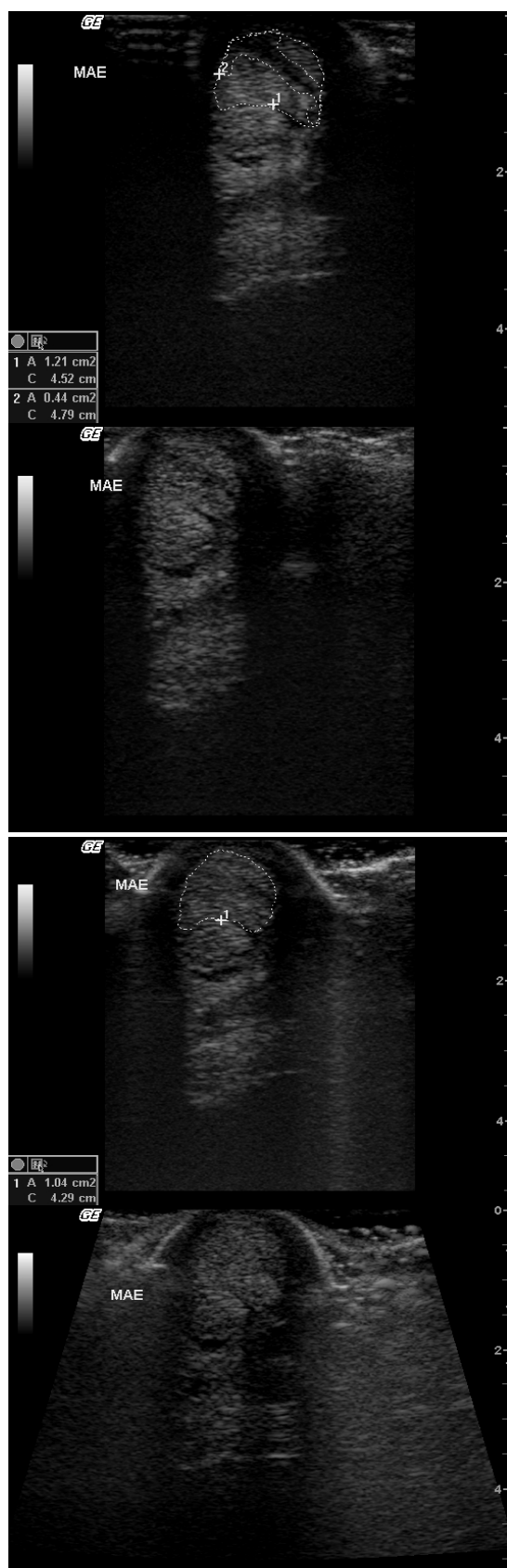
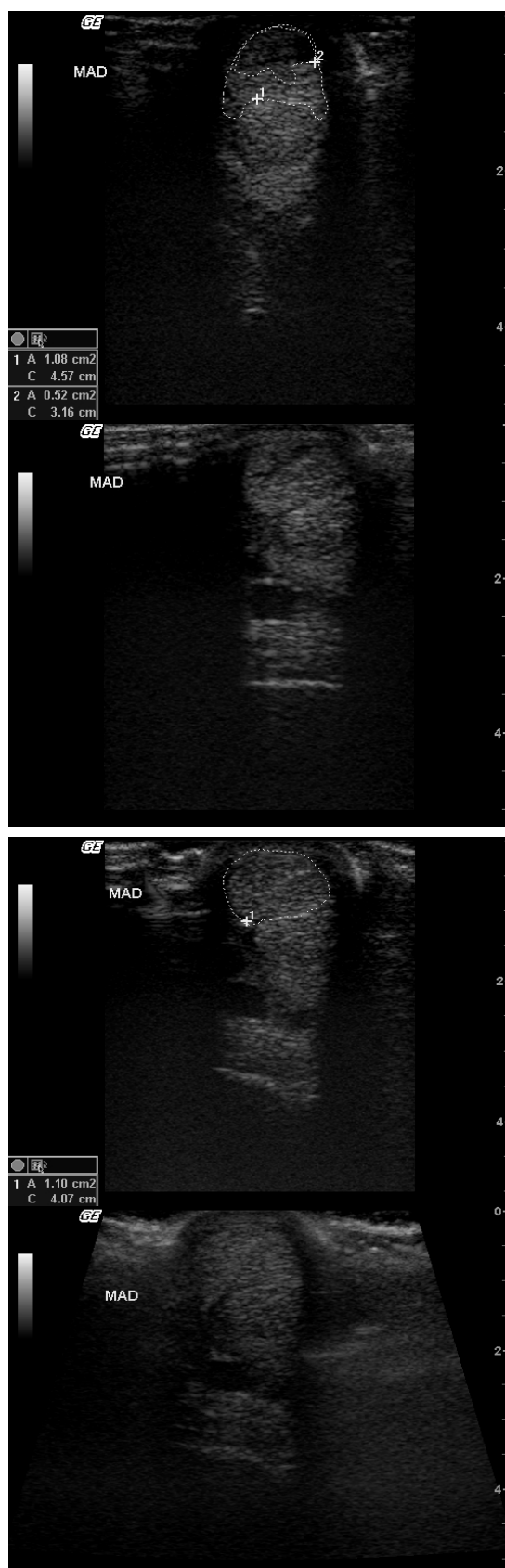
TRATADO



CONTROLE

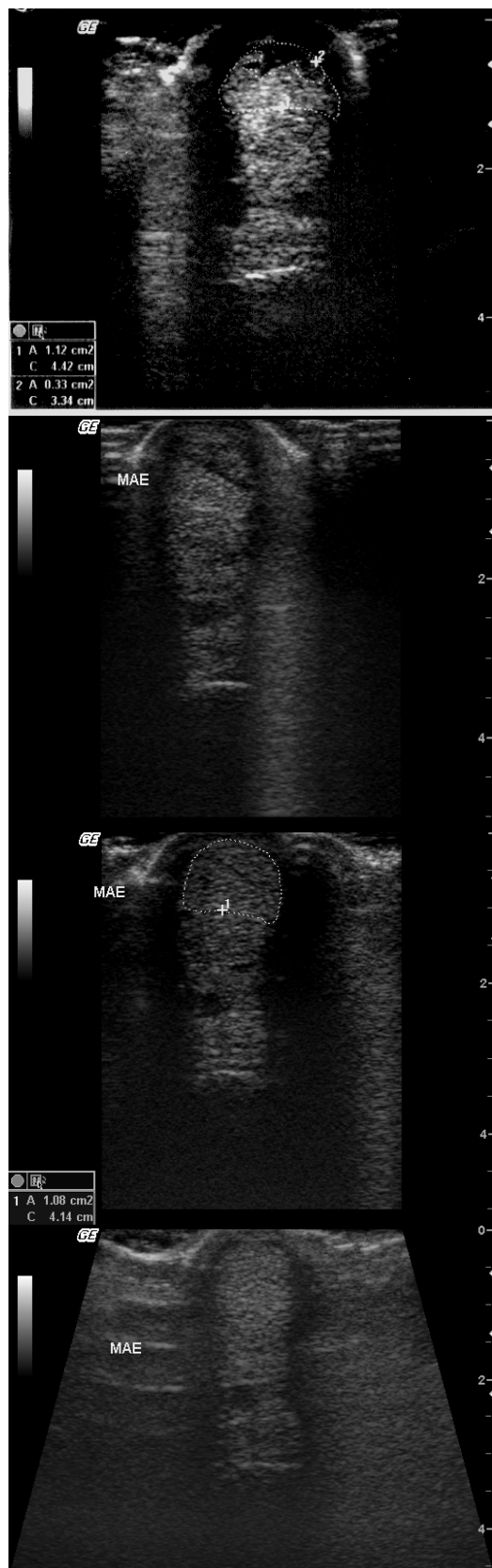


ANEXO 3: Acompanhamento ultra-sonográfico do animal 3, corte transversal, aos dias 30, 60, 90 e 120 após indução de lesão.

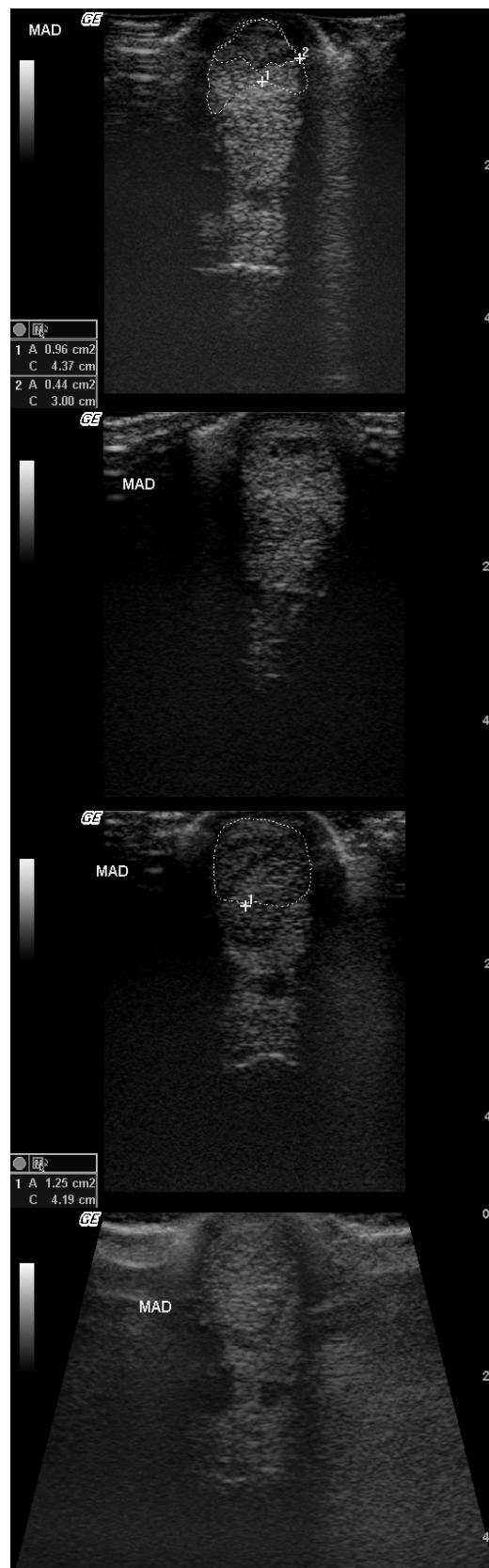
TRATADO**CONTROLE**

ANEXO 4: Acompanhamento ultra-sonográfico do animal 4, corte transversal, aos dias 30, 60, 90 e 120 após indução de lesão.

TRATADO

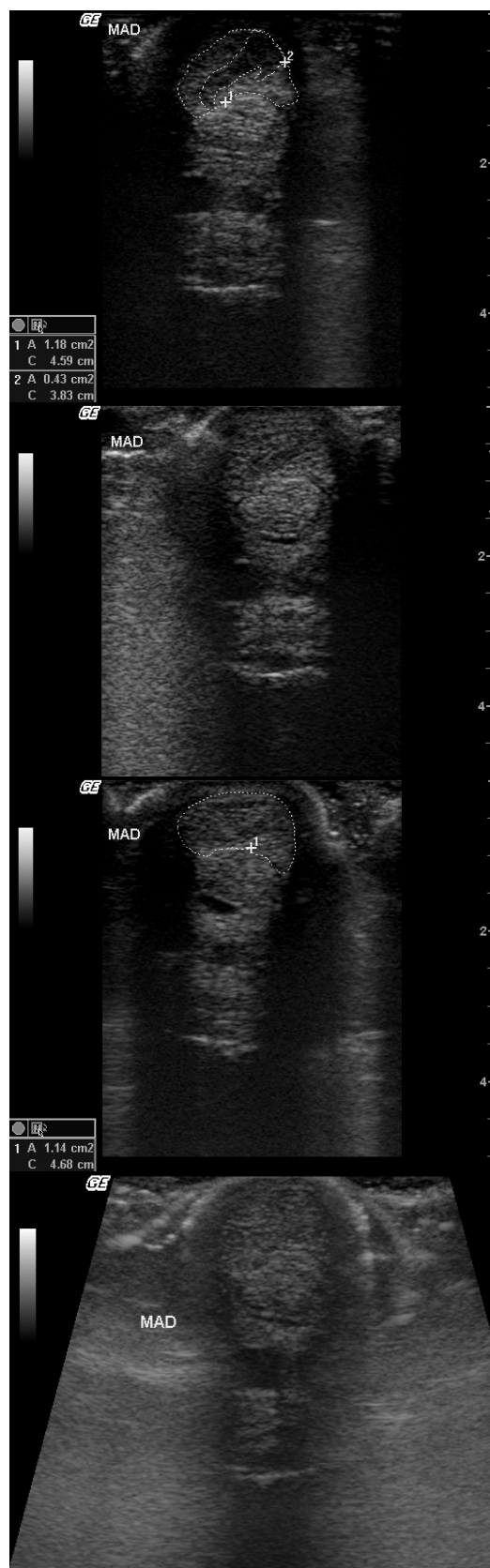


CONTROLE

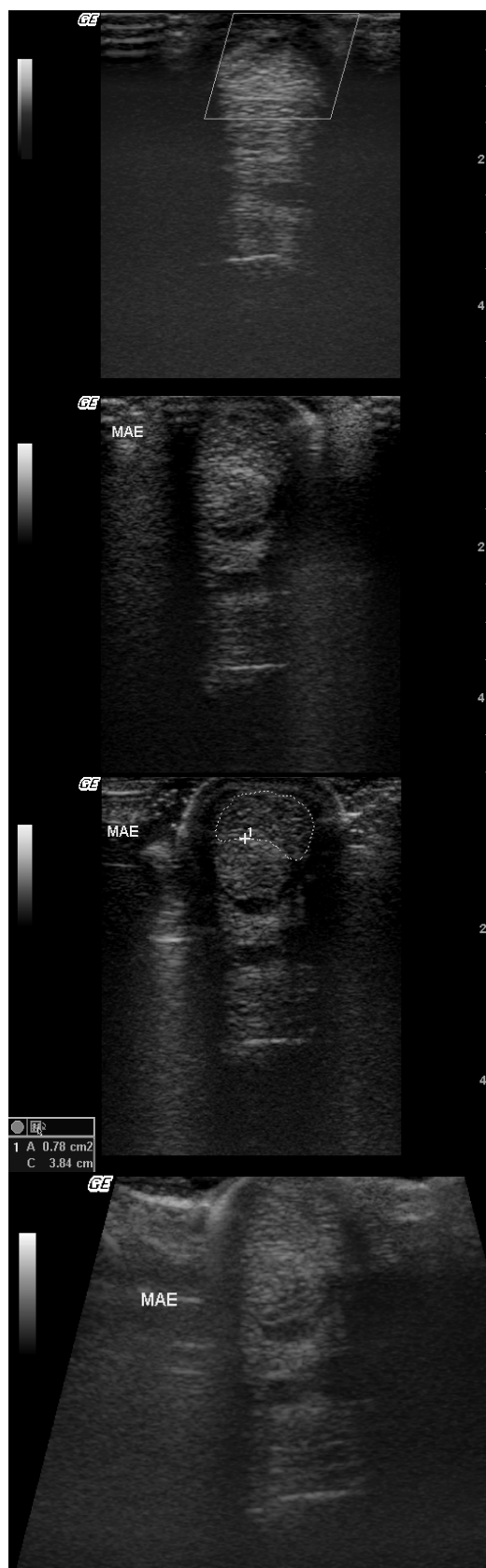


ANEXO 5: Acompanhamento ultra-sonográfico do animal 5, corte transversal, aos dias 30, 60, 90 e 120 após indução de lesão.

TRATADO

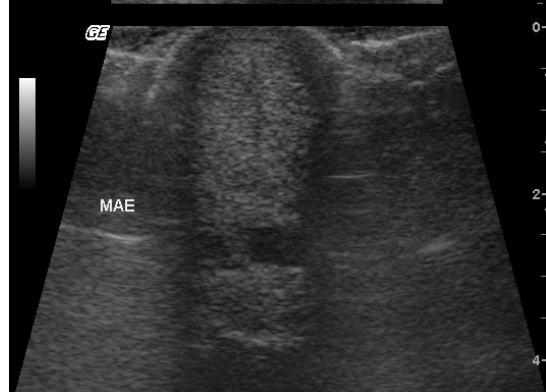
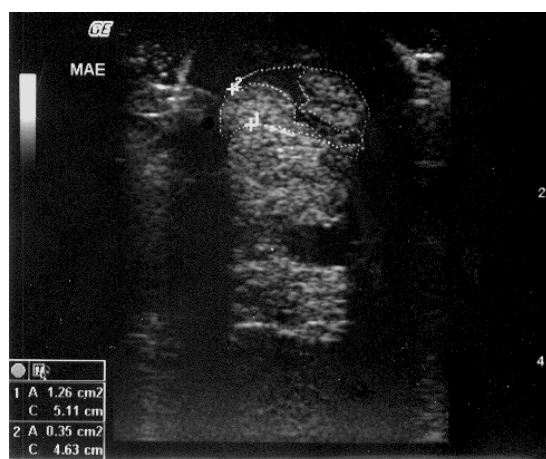


CONTROLE

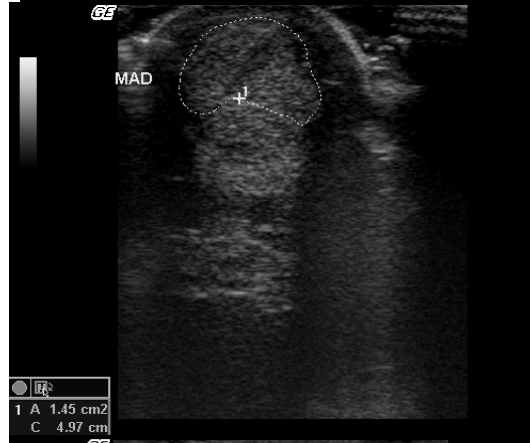
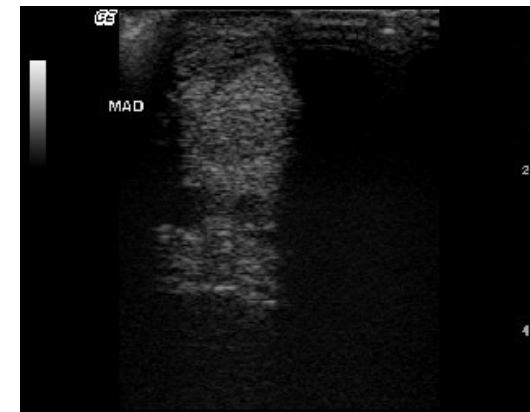
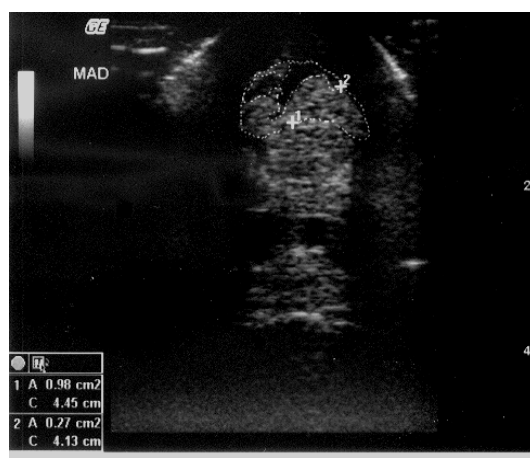


ANEXO 6: Acompanhamento ultra-sonográfico do animal 6, corte transversal, aos dias 30, 60, 90 e 120 após indução de lesão.

TRATADO

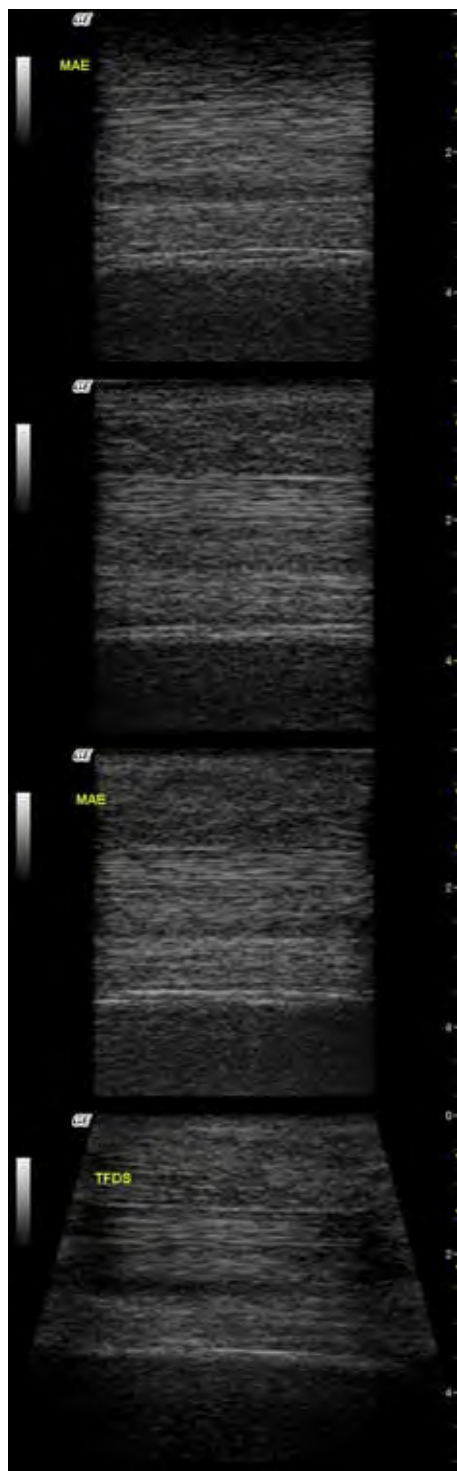


CONTROLE

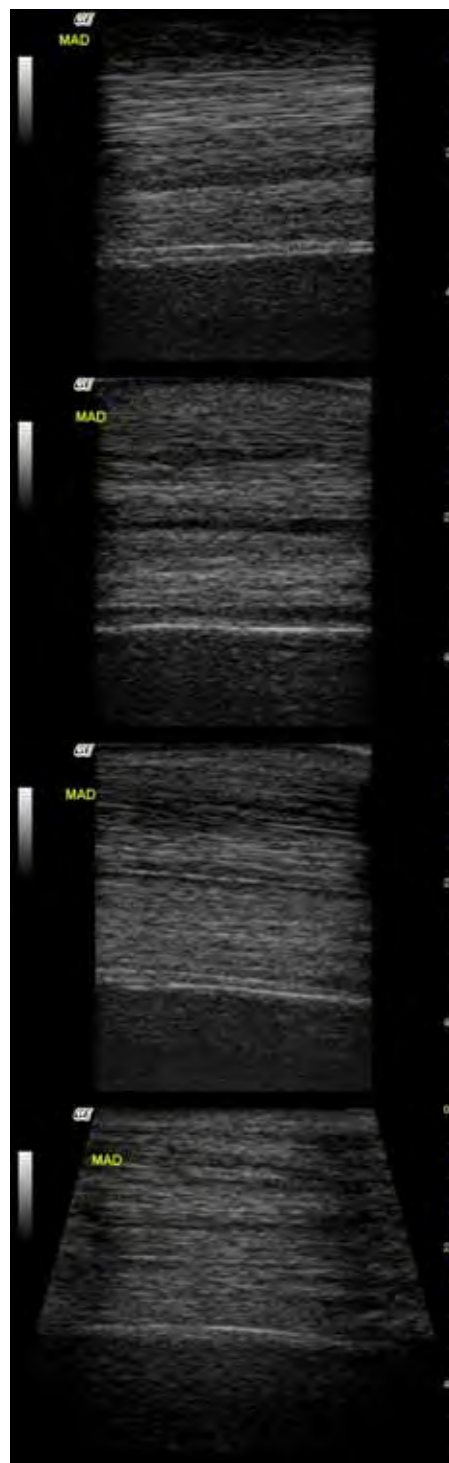


ANEXO 7: Acompanhamento ultra-sonográfico do animal 1, corte longitudinal, aos dias 30, 60, 90 e 120 após indução de lesão.

TRATADO

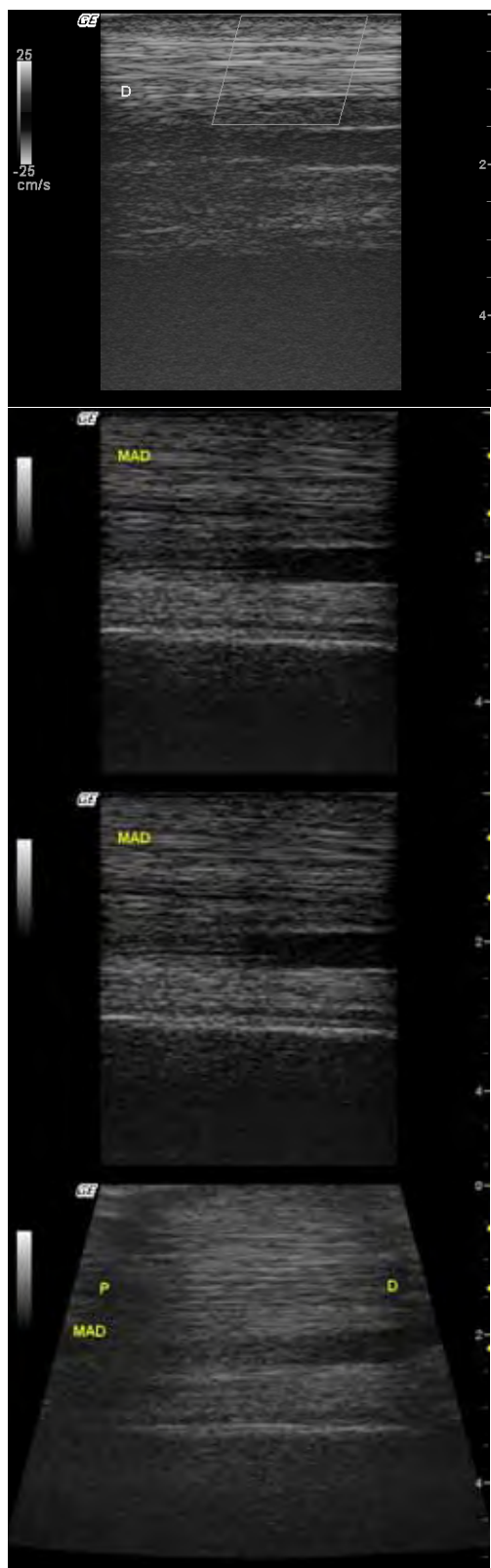


CONTROLE

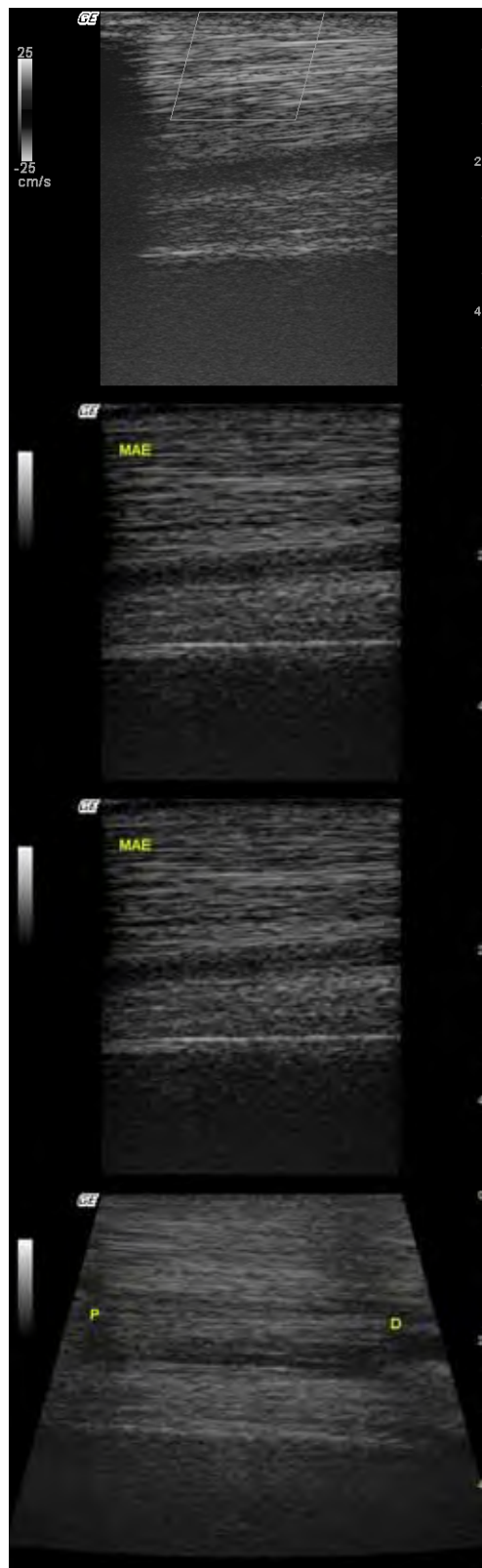


ANEXO 8: Acompanhamento ultra-sonográfico do animal 2, corte longitudinal, aos dias 30, 60, 90 e 120 após indução de lesão.

TRATADO

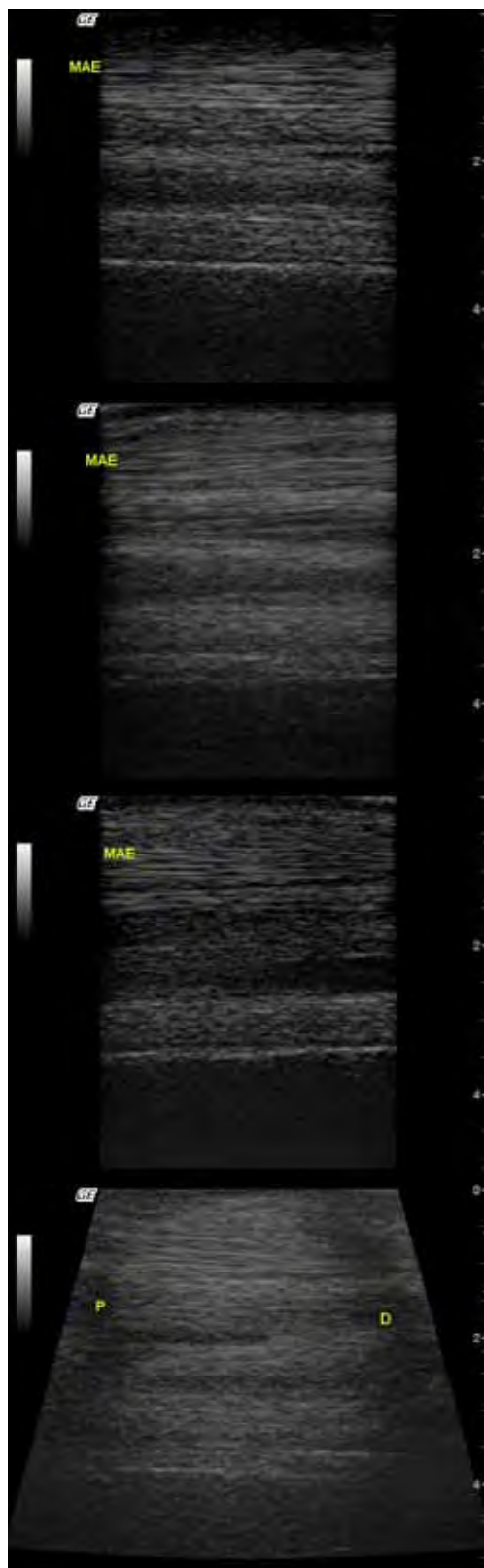


CONTROLE

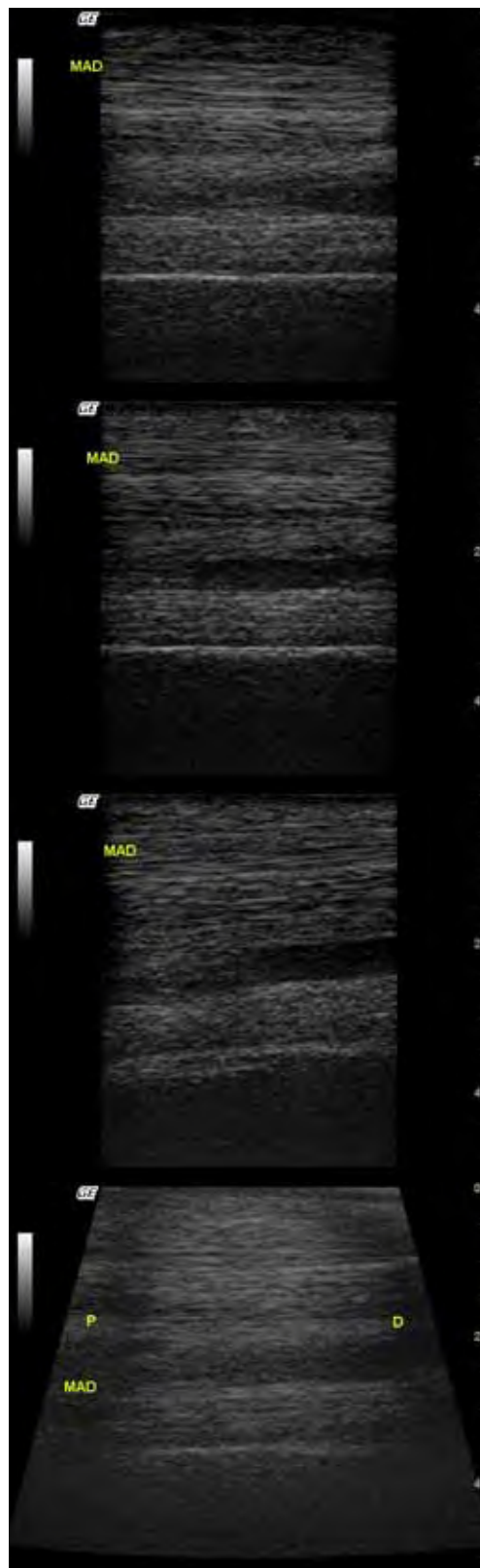


ANEXO 9: Acompanhamento ultra-sonográfico do animal 3, corte longitudinal, aos dias 30, 60, 90 e 120 após indução de lesão.

TRATADO

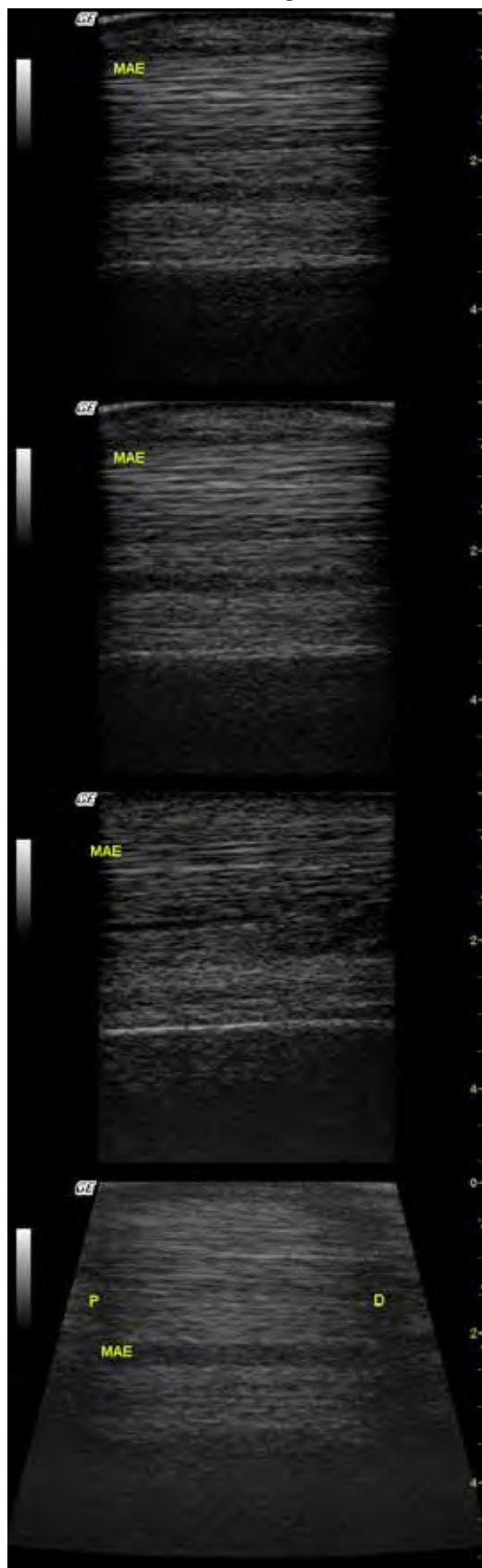


CONTROLE

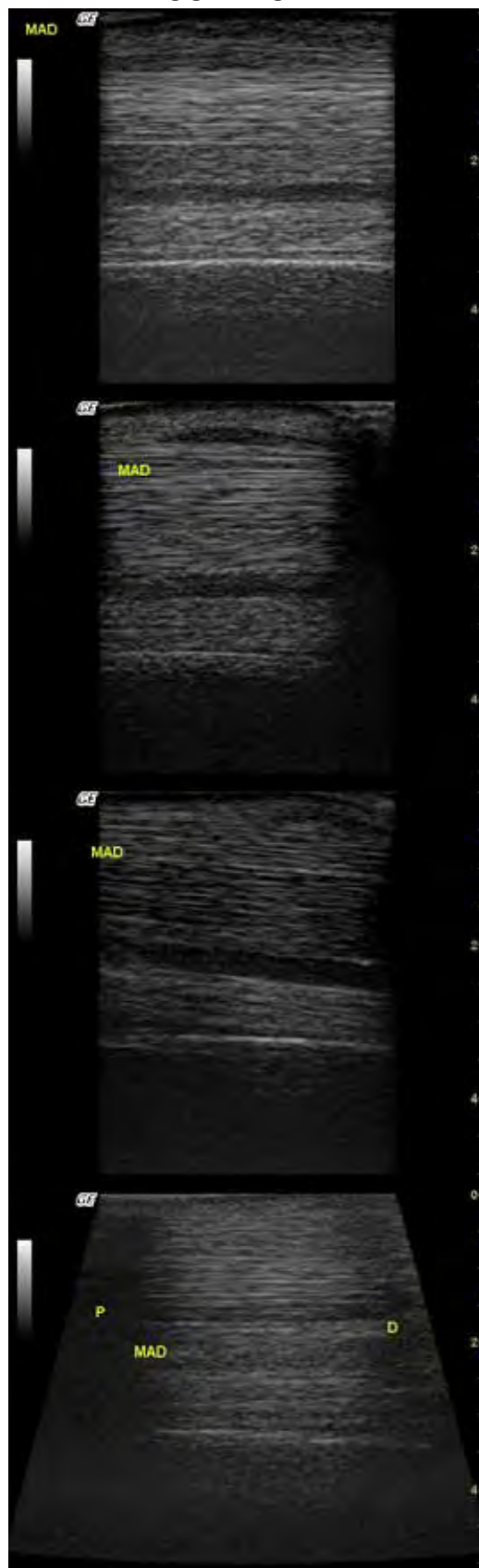


ANEXO 10: Acompanhamento ultra-sonográfico do animal 4, corte longitudinal, aos dias 30, 60, 90 e 120 após indução de lesão.

TRATADO



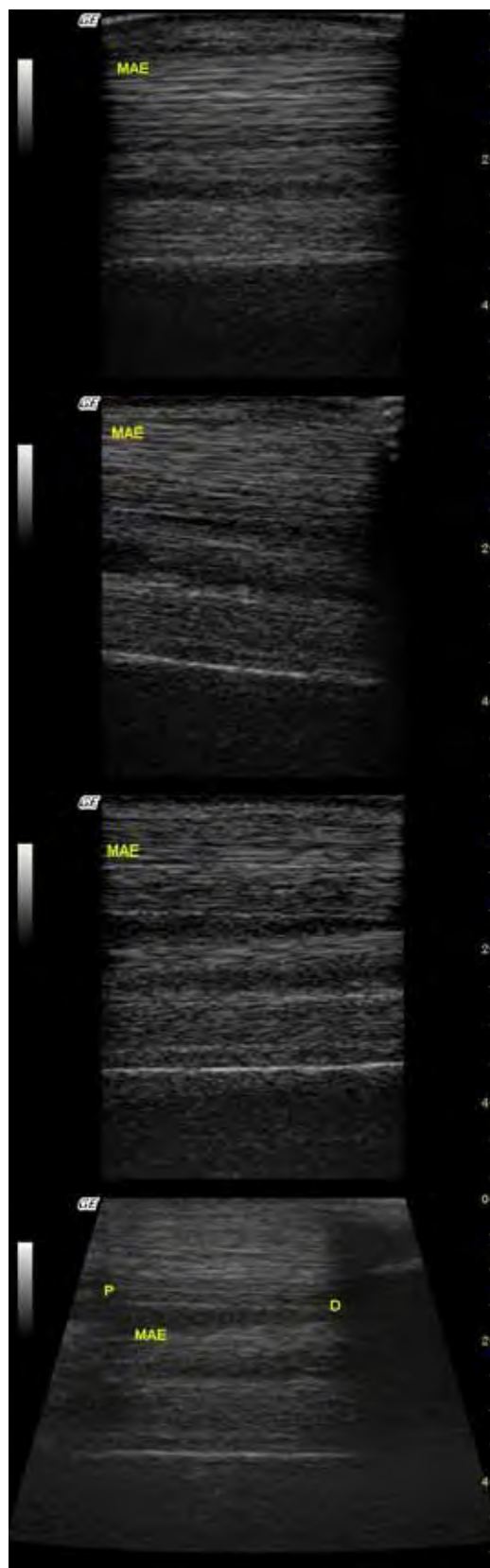
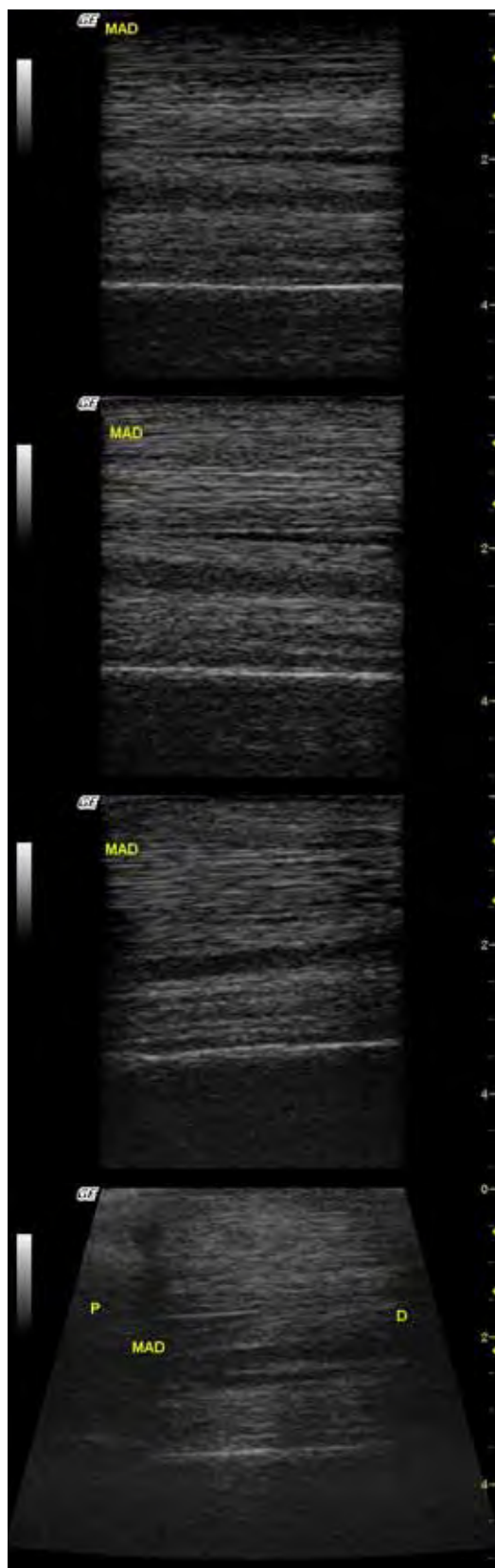
CONTROLE



ANEXO 11: Acompanhamento ultra-sonográfico do animal 5, corte longitudinal, aos dias 30, 60, 90 e 120 após indução de lesão.

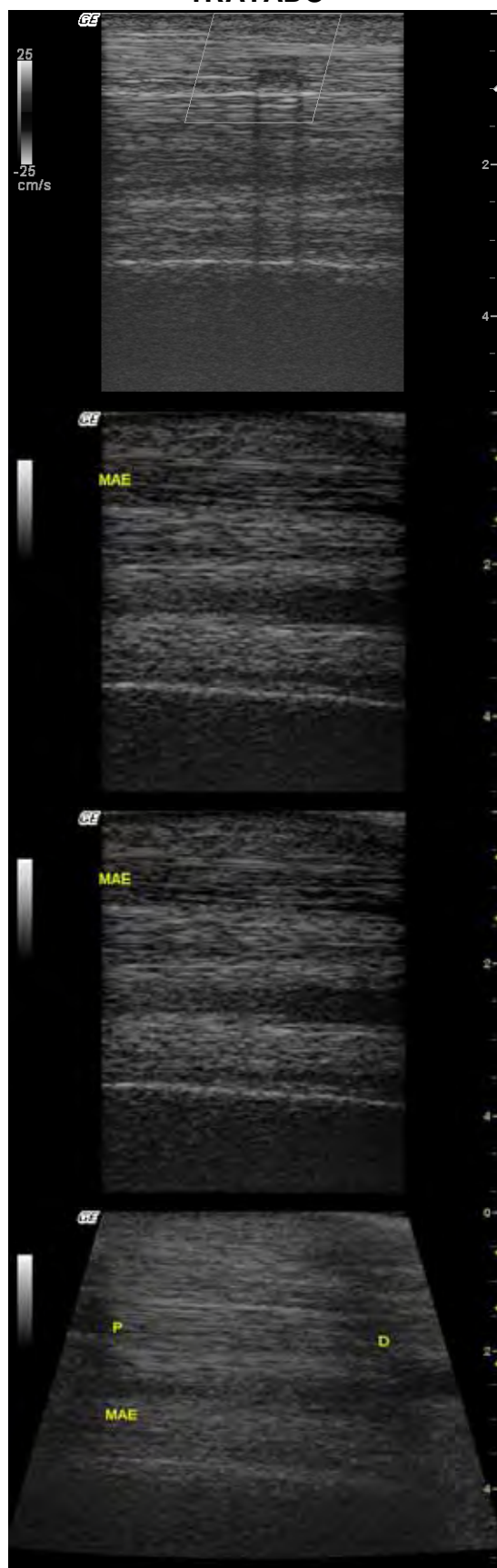
TRATADO

CONTROLE

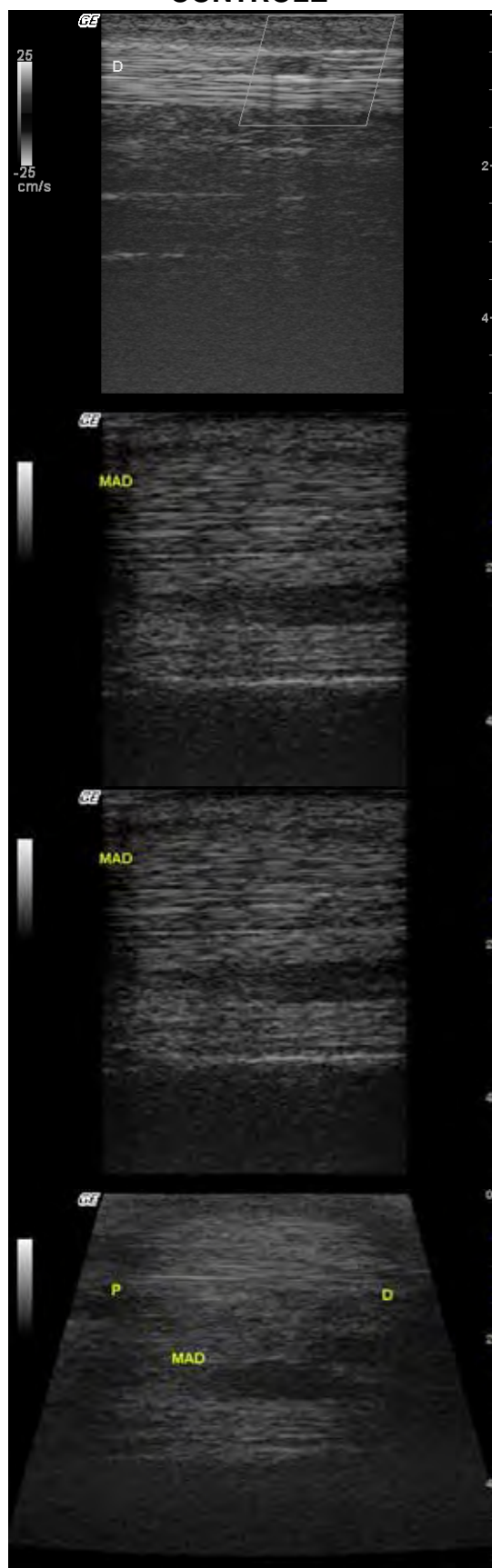


ANEXO 12: Acompanhamento ultra-sonográfico do animal 6, corte longitudinal, aos dias 30, 60, 90 e 120 após indução de lesão.

TRATADO



CONTROLE



ANEXO 13: Análise estatística para escore de claudicação.

Tabela 1: Medidas descritivas do escore de Claudicação segundo grupo e dia de avaliação.

Grupo	Dia	Media	Erro-padrão	Mediana
T	1	2,0	0,4	2,0
	3	2,0	0,4	2,0
	13	1,2	0,4	1,0
	20	1,5	0,6	1,0
	28	1,0	0,4	1,0
	35	0,5	0,3	0
	45	0,2	0,2	0
	65	0	0	0
	100	0	0	0
	120	0	0	0
C	1	1,5	0,2	1,5
	3	1,5	0,2	1,5
	13	1,0	0	1,0
	20	0,5	0,2	0,5
	28	0,5	0,2	0,5
	35	0,2	0,2	0
	45	0	0	0
	65	0	0	0
	100	0	0	0
	120	0	0	0

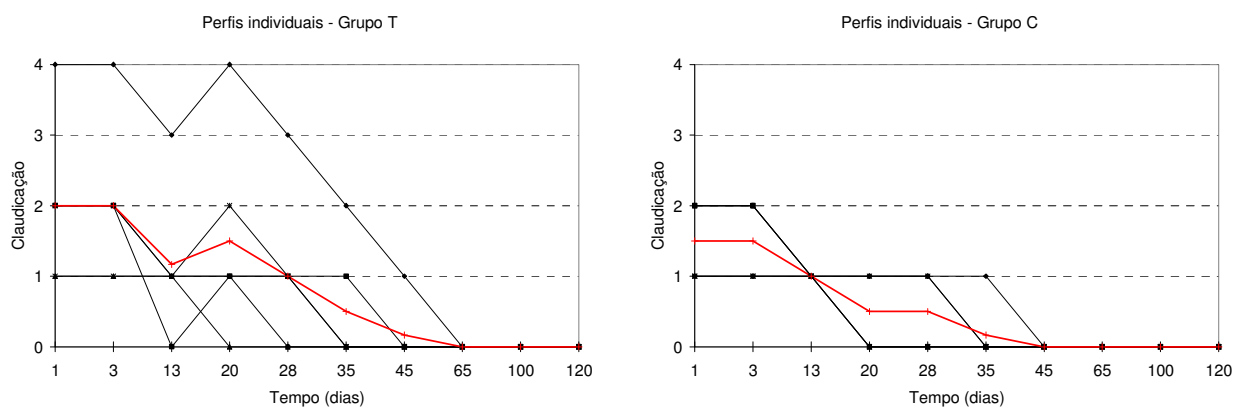


Figura 1: Gráficos com perfis individuais e média do escore de claudicação ao longo das avaliações.

ANEXO 14: Análise estatística para perímetro da canela.

Tabela 1: Medidas descritivas Do perímetro da canela segundo grupo e dia de avaliação.

Grupo	Dia	Media	Erro-padrão	Mediana
T	0	17,17	0,38	17,25
	1	18,12	0,36	18,20
	3	17,95	0,39	18,20
	13	17,78	0,35	18,10
	20	18,18	0,28	18,15
	28	18,05	0,34	18,15
	35	17,92	0,32	18,15
	45	17,83	0,36	18,25
	65	17,77	0,36	18,15
	100	17,70	0,34	18,10
	120	17,58	0,35	18,00
C	0	17,17	0,38	17,25
	1	17,97	0,35	17,95
	3	17,82	0,40	17,90
	13	17,65	0,37	17,70
	20	17,58	0,34	17,60
	28	17,48	0,35	17,50
	35	17,45	0,34	17,40
	45	17,47	0,36	17,50
	65	17,33	0,33	17,35
	100	17,30	0,32	17,35
	120	17,22	0,35	17,25

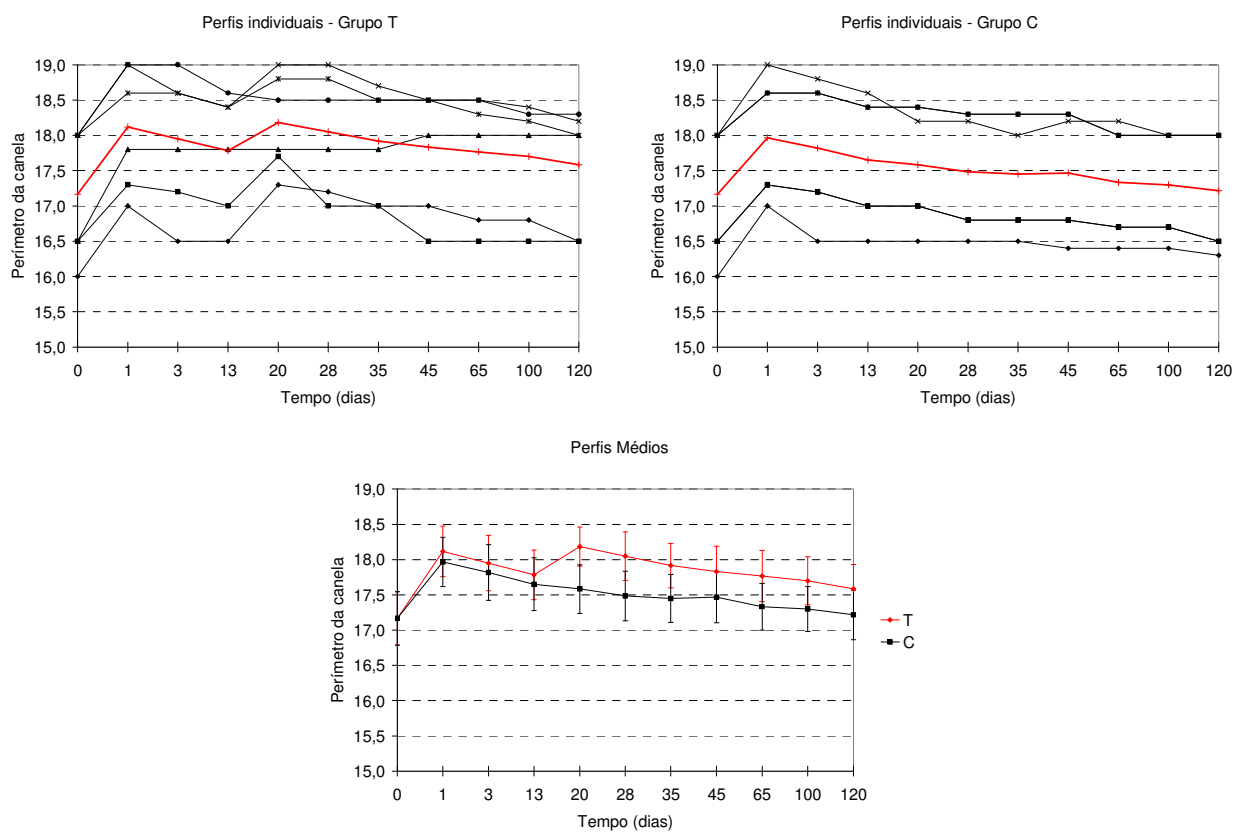


Figura 1: Gráficos com perfis individuais e médios do perímetro da canela ao longo das avaliações.

Tabela 2 – Resultado da Análise de Variância para Medidas Repetidas para a variável Perímetro da canela.

Comparações	P
EFEITO DE INTERAÇÃO GRUPOxMOMENTO	<.0001
EFEITO DE GRUPO - Dia 0	1.000
EFEITO DE GRUPO - Dia 13	0.7883
EFEITO DE GRUPO - Dia 35	0.3474
EFEITO DE GRUPO - Dia 65	<.0001
EFEITO DE GRUPO - Dia 120	<.0001
EFEITO DE MOMENTO- C	<.0001
Comparação das avaliações consecutivas	
Dia 0 x Dia 1 - C	<.0001
Dia 1 x Dia 3 - C	0.1611
Dia 3 x Dia 13 - C	0.1194
Dia 13 x Dia 20 - C	0.5334
Dia 20 x Dia 28 - C	0.3502
Dia 28 x Dia 35 - C	0.7555
Dia 35 x Dia 45 - C	0.8763
Dia 45 x Dia 65 - C	0.2129
Dia 65 x Dia 100 - C	0.7555
Dia 100 x Dia 120 - C	0.4362
Comparação do basal x lesão x final	
Dia 0 x Dia 1 - C	<.0001
Dia 1 x Dia 120 - C	<.0001
Dia 0 x Dia 120 - C	0.6404
EFEITO DE MOMENTO - T	<.0001
Comparação das avaliações consecutivas	
Dia 0 x Dia 1 - T	<.0001
Dia 1 x Dia 3 - T	0.1194
Dia 3 x Dia 13 - T	0.1194
Dia 13 x Dia 20 - T	0.0002
Dia 20 x Dia 28 - T	0.2129
Dia 28 x Dia 35 - T	0.2129
Dia 35 x Dia 45 - T	0.4362
Dia 45 x Dia 65 - T	0.5334
Dia 65 x Dia 100 - T	0.5334
Dia 100 x Dia 120 - T	0.2757
Comparação do basal x lesão x final	
Dia 0 x Dia 1 - T	<.0001
Dia 1 x Dia 120 - T	<.0001
Dia 0 x Dia 120 - T	<.0001

ANEXO 15: Análise estatística para escore de ecogenicidade.

Tabela 1: Medidas descritivas do grau de ecogenicidade segundo grupo e dia de avaliação.

Grupo	Dia	Media	Erro-padrão	Mediana
T	M1_12d	2,2	0,3	2,0
	M2_30d	3,7	0,2	4,0
	M3_60d	2,8	0,3	3,0
	M4_90d	1,7	0,2	2,0
	M5_120d	1,0	0,3	1,0
C	M1_12d	2,5	0,4	2,5
	M2_30d	3,5	0,2	3,5
	M3_60d	3,0	0,3	3,0
	M4_90d	2,2	0,3	2,0
	M5_120d	1,3	0,3	1,0

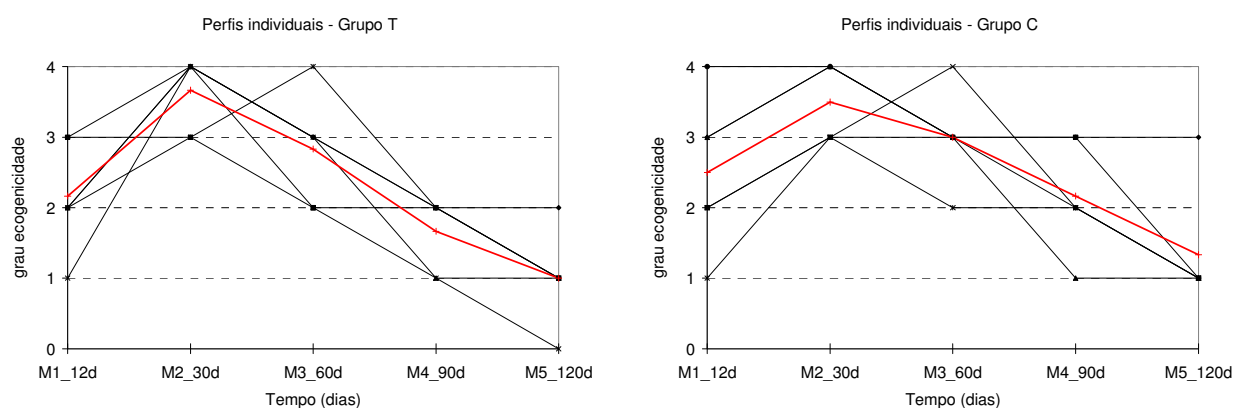


Figura 1: Gráficos com perfis individuais e do grau de ecogenicidade ao longo das avaliações.

ANEXO 16: Análise estatística para área do tendão.

Tabela 1: Medidas descritivas da área do tendão (cm²) segundo grupo e dia de avaliação.

Grupo	Dia	Media	Erro-padrão	Mediana
T	M1_12d	1,00	0,07	0,95
	M2_30d	1,20	0,10	1,20
	M3_60d	1,23	0,10	1,12
	M4_90d	1,15	0,09	1,07
	M5_120d	1,12	0,08	1,06
C	M1_12d	0,89	0,05	0,89
	M2_30d	1,08	0,07	1,03
	M3_60d	1,20	0,08	1,24
	M4_90d	1,21	0,14	1,18
	M5_120d	1,18	0,11	1,16

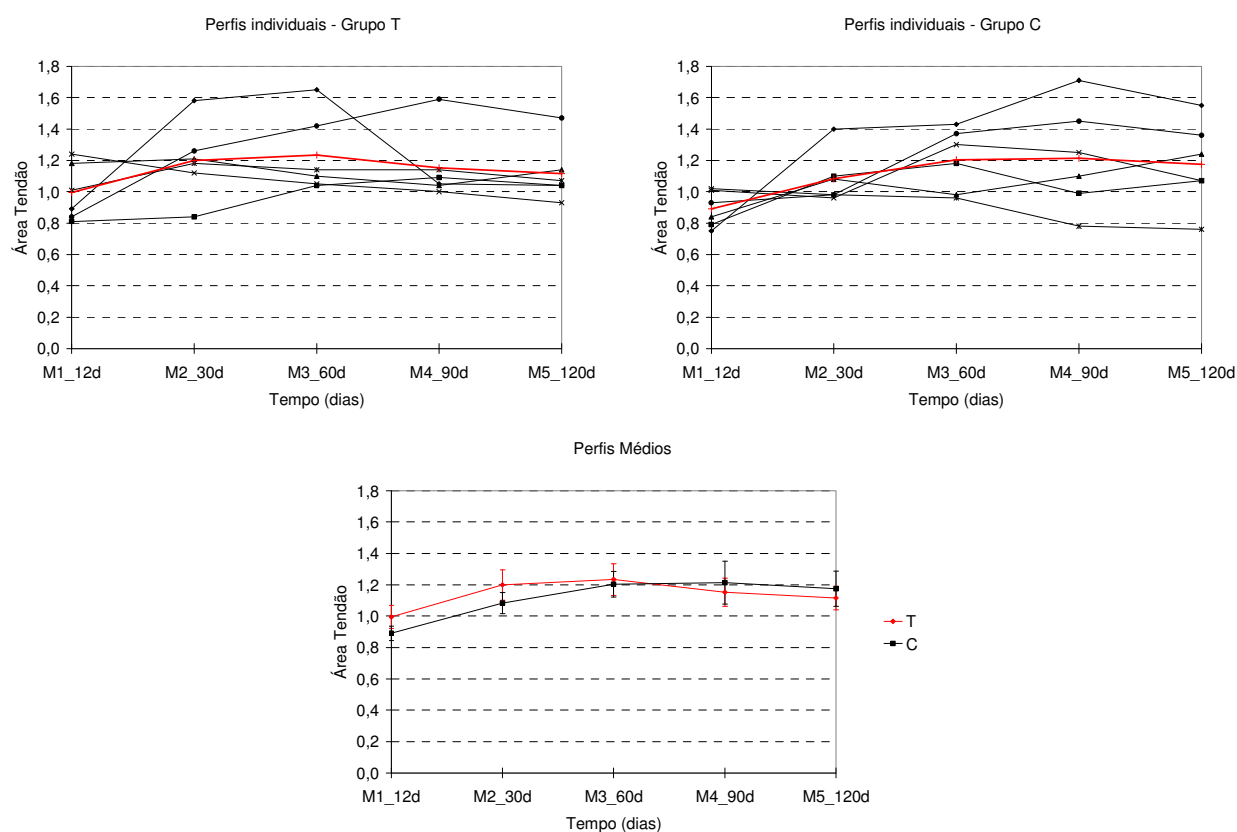


Figura 1: Gráficos com perfis individuais e médios da área do tendão ao longo das avaliações.

Tabela 2 – Resultado da Análise de Variância para Medidas Repetidas para a variável Área do Tendão.

Comparação	P
EFEITO DE INTERAÇÃO GRUPOxMOMENTO	0,5091
EFEITO DE GRUPO	0,7296
EFEITO DE MOMENTO	0,0213
M1-12d x M2-30d	0,0264
M2-30d x M3-60d	0,3856
M3-60d x M4-90d	0,6883
M4-90d x M5-120d	0,6746
M1-12d x M5-120d	0,0234
M2-30d x M5-120d	0,9628

ANEXO 17: Análise estatística para área da lesão.

Tabela 1: Medidas descritivas da área da lesão segundo grupo e dia de avaliação.

Grupo	Dia	Media	Erro-padrão	Mediana
T	M1_12d	0,29	0,08	0,28
	M2_30d	0,51	0,16	0,40
	M3_60d	0,40	0,10	0,36
	M4_90d	0,29	0,05	0,32
	M5_120d	0,13	0,02	0,14
C	M1_12d	0,23	0,02	0,24
	M2_30d	0,41	0,08	0,37
	M3_60d	0,42	0,11	0,31
	M4_90d	0,37	0,09	0,30
	M5_120d	0,19	0,02	0,18

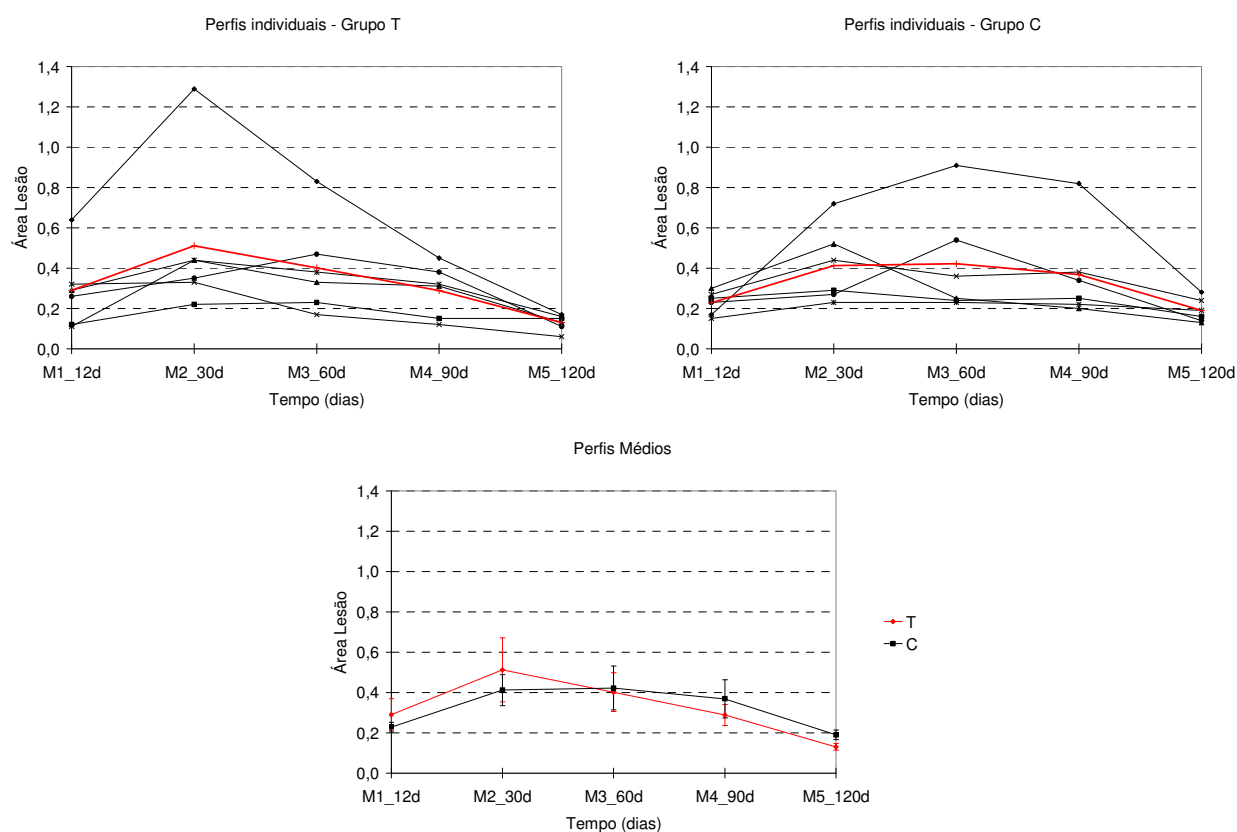


Figura 1: Gráficos com perfis individuais e médios da área da lesão ao longo das avaliações.

Tabela 2 – Resultado da Análise de Variância para Medidas Repetidas para a variável Área da Lesão.

Comparação	p
EFEITO DE INTERAÇÃO GRUPOxMOMENTO	<,0001
EFEITO DE GRUPO – M1-12d	0,5897
EFEITO DE GRUPO – M2-30d	0,3819
EFEITO DE GRUPO – M3-60d	0,8612
EFEITO DE GRUPO – M4-90d	<,0001
EFEITO DE GRUPO – M5-120d	0,5998
EFEITO DE MOMENTO - C	0,0609
EFEITO DE MOMENTO - T	<,0001
M1-12d x M2-30d - T	0,0288
M2-30d x M3-60d - T	0,2779
M3-60d x M4-90d - T	<,0001
M4-90d x M5-120d - T	<,0001
M1-12d x M5-120d - T	0,1145
M2-30d x M5-120d - T	0,0002

ANEXO 18: Análise estatística para porcentual de área lesada.

Tabela 1: Medidas descritivas da % área lesada segundo grupo e dia de avaliação.

Grupo	Dia	Media	Erro-padrão	Mediana
T	M1_12d	32,88	9,18	27,75
	M2_30d	39,75	8,57	32,90
	M3_60d	30,83	4,77	31,55
	M4_90d	25,05	4,64	25,95
	M5_120d	11,82	1,68	12,90
C	M1_12d	25,52	3,00	24,20
	M2_30d	33,12	4,99	26,95
	M3_60d	33,42	6,59	26,60
	M4_90d	28,95	4,18	26,85
	M5_120d	16,43	2,59	15,25

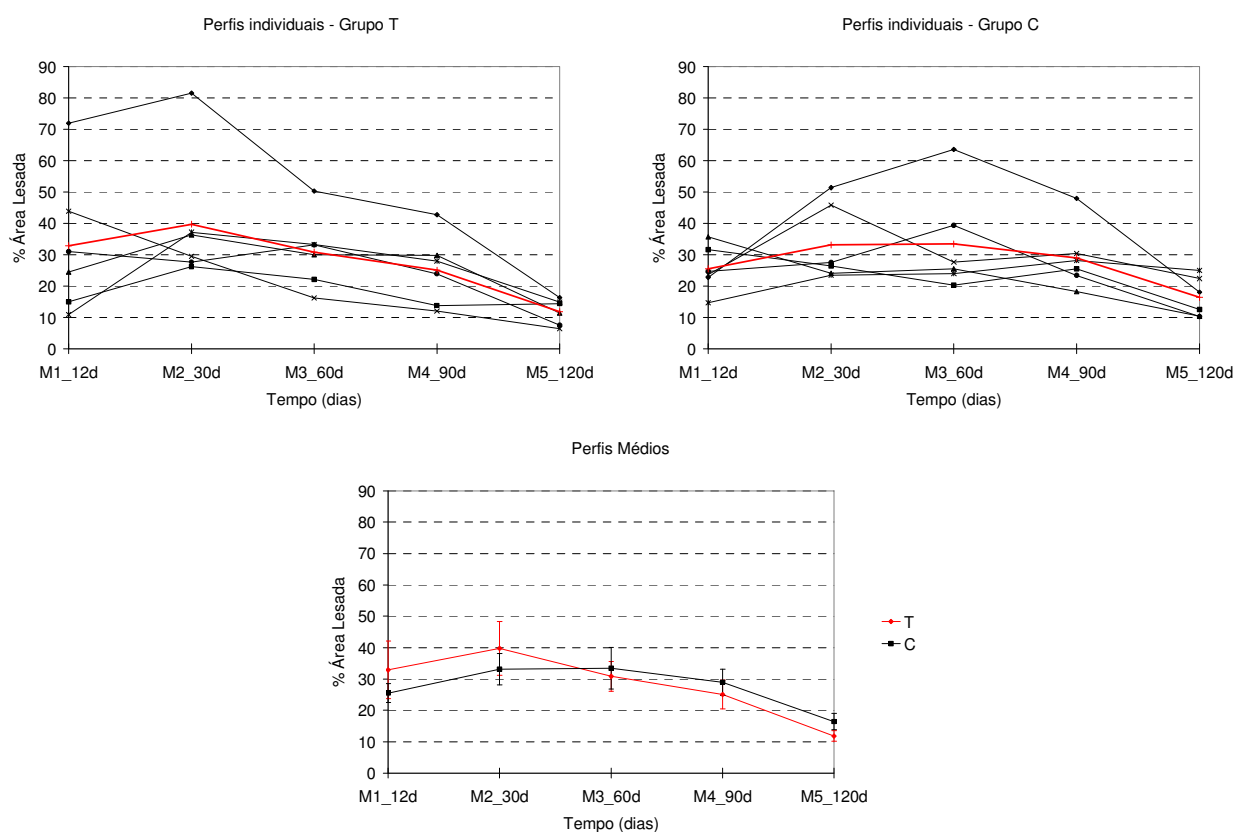


Figura1: Gráficos com perfis individuais e médios da % área lesada ao longo das avaliações.

Tabela 2 – Resultado da Análise de Variância para Medidas Repetidas para a variável % área lesada.

Comparação	p
EFEITO DE INTERAÇÃO GRUPOxMOMENTO	0,3839
EFEITO DE GRUPO	0,9199
EFEITO DE MOMENTO	<,0001
M1-12d x M2-30d	0,0857
M2-30d x M3-60d	0,3060
M3-60d x M4-90d	0,2233
M4-90d x M5-120d	0,0022
M1-12d x M5-120d	0,0003
M2-30d x M5-120d	<,0001

ANEXO 20: Tabela de escores ultra-sonografia Power Doppler.

Tabela 1: Escores individuais de sinais ultra-sonográficos Power Doppler nos grupos tratado e controle nos diferentes momentos analisados.

Animal		10 dias	20 dias	30 dias	40 dias	60 dias	90 dias	120 dias
1	T	0	0	0	1	2	3	2
	C	0	0	0	1	3	3	2
2	T	0	0	0	0	2	3	2
	C	0	0	0	0	2	2	2
3	T	0	1	1	1	1	3	2
	C	0	0	0	1	2	2	2
4	T	0	0	0	0	3	3	1
	C	0	0	0	0	1	2	1
5	T	0	0	0	1	3	3	1
	C	0	0	0	0	1	2	1
6	T	0	0	0	0	2	2	1
	C	0	0	0	0	2	1	0

ANEXO 21: Análise estatística para marcadores de imunoistoquímica.

Tabela 1: Medidas descritivas dos marcadores por grupo.

Variável	Grupo	Media	Erro-padrão	Mediana	p (Wilcoxon)
Colágeno tipo I - %	T	46,91	3,17	46,24	0,0313
	C	36,49	3,27	34,09	
Colágeno tipo III - %	T	25,88	5,05	20,83	0,3125
	C	31,28	4,03	27,87	
VEGF - %	T	7,28	1,12	6,18	0,4375
	C	9,18	1,65	8,61	

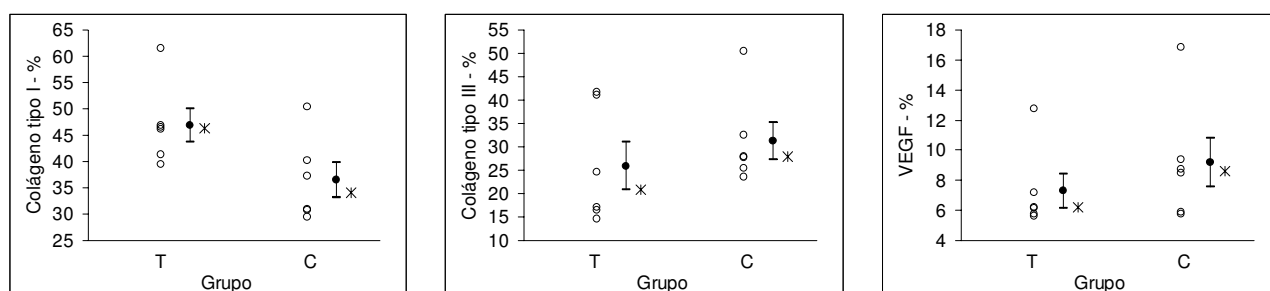


Figura 1. Valores individuais dos marcadores para cada grupo, média (bola cheia) $\pm$ erro padrão (traços) e mediana (cruz).

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

ARTIGOS CIENTÍFICOS

Devem ser estruturados de acordo com os seguintes itens:

1. Página de rosto, com:

- Título do trabalho em português, em inglês e em espanhol, fonte Times New Roman, tamanho 12, com espaçamento simples, em negrito e centralizado, no qual somente a primeira letra de cada palavra deve ser maiúscula. Quando necessário, indicar a entidade financiadora da pesquisa, como primeira chamada de rodapé;
- Nomes completos dos autores, em que somente a primeira letra de cada nome deve ser maiúscula, centralizado e em negrito. Digitá-los, separados por vírgulas, com **chamadas** de rodapé numeradas e em sobrescrito, **que indicarão** o cargo e o endereço profissional dos autores (inclusive endereço eletrônico), seguidos da instituição onde o trabalho foi desenvolvido ou às quais estão vinculados;
- Nome, endereço, telefone, fax e correio eletrônico, para correspondência;
- Em caso de envolvimento de seres humanos ou animais de experimentação, encaminhar o parecer da Comissão de Ética ou equivalente, assinalando, no trabalho, antes das referências, a data de aprovação.

2. Página com resumo, abstract e resumen

- Tanto o resumo, como o abstract e o resumen devem ser seguidos do título do trabalho, no respectivo idioma, e conter no máximo 400 palavras cada um, com informações referentes à introdução, metodologia, resultados e conclusões. O texto deve ser justificado e digitado em parágrafo único e espaço 1,5, começando por RESUMO. O abstract, e o resumen, devem ser tradução fiel do resumo. Se for apresentado em inglês, deve conter também, resumos em português e espanhol; se for em espanhol, resumos em português e inglês.
- Devem conter, no máximo, cinco palavras-chave, key words, e palabras-clave que identifiquem o conteúdo do texto.

3. A estrutura do artigo deverá conter:

Introdução: Deve ser clara, objetiva e relacionada ao problema investigado e à literatura pertinente, bem como aos objetivos da pesquisa. A introdução estabelece os objetivos do trabalho.

Material e Métodos: Deve oferecer informações de reprodutibilidade da pesquisa, de forma clara e concisa, como variáveis, população, amostra, equipamentos e métodos utilizados, inclusive os estatísticos.

Resultados: Apresentação dos resultados obtidos, que devem ser descritos sem interpretações e comparações. Poderá ser sob a **forma de tabelas**, em folha à parte, no máximo de cinco, ordenadas em algarismos arábicos e encabeçadas pelo título, de acordo com as normas de apresentação tabular da ABNT/WR 6023/2000 da Associação Brasileira de Normas Técnicas, identificadas no texto como Tabela; sob a **forma de figuras**, nos casos de gráficos, fotografias, desenhos, mapas, etc., ordenadas em algarismos arábicos, até no máximo de seis, e citadas no texto como Figura. Devem ser identificadas em folha à parte, onde deve constar o título do artigo. **Fotografias** podem ser em preto e

branco ou coloridas, identificadas com o(s) nome(s) do(s) autor(es) no verso. No caso de **desenhos originais**, a impressão deve ser em papel adequado, de qualidade. Se o trabalho for apresentado na língua portuguesa ou espanhola, os enunciados das tabelas e figuras bem como das variáveis apresentadas deverão estar também escritos em inglês.

Discussão: Deve ser entendida como a interpretação dos resultados, confrontando com a literatura pertinente, apresentada na introdução. Se julgar conveniente, os resultados e a discussão poderão ser apresentados conjuntamente.

Conclusões: É a síntese final, fundamentada nos resultados e na discussão.

Referências: Devem ser apresentadas de acordo com as normas da ABNT, e o arranjo deve ser em ordem alfabética por sobrenome do autor (modelos anexos).

Deverão ser editorados em Microsoft Word for Windows, para edição de textos, Excel (qualquer versão) para gráficos, formato JPEG ou GIF (imagem) para fotografias, desenhos e mapas, **em três vias (uma original e duas cópias)** impressas, formato A4 (21,0 x 29,7 cm), em espaço duplo, mantendo margens de 2,5 cm, nas laterais, no topo e pé de cada página, fonte Times New Roman, tamanho 12 e numeração consecutiva das páginas em algarismos arábicos, a partir da folha de identificação. Ilustrações e legendas devem ser apresentadas em folhas separadas. Encaminhar cópia em disquete 3 ½" de alta densidade ou CD, identificado com título do artigo e nome dos autores. Nas duas cópias **deve(m) ser omitido(s) o(s) nome(s) do(s) autor(es), o local onde se realizou o trabalho, bem como o rodapé.**

Não serão fornecidas separatas. Os artigos estarão disponíveis no formato PDF no endereço eletrônico da revista. Para as demais seções da revista são válidas as normas anteriores. Não devem exceder a 15 páginas. Abreviaturas não usuais devem ser empregadas após escritas por extenso na primeira utilização.

ARTIGOS DE REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os artigos de revisão bibliográfica serão publicados nas línguas portuguesa, inglesa e espanhola, quando o autor apresentar contribuição científica, relevante na área específica do assunto abordado, a convite dos editores.

Deverão conter: Título (português, inglês e espanhol), resumo, palavras-chave, abstract, key words, resumen, palabras-clave, introdução, desenvolvimento do assunto, conclusão e referências. Deverão conter no máximo 20 páginas com 60 referências.

RELATOS DE CASO

Não devem ser estruturados, como os artigos. Devem apresentar o título em português, em inglês e espanhol, resumo, palavras-chave, abstract, key words, resumen, palabras-clave e referências. Devem conter no máximo cinco páginas, três tabelas ou figuras e 15 referências.

COMUNICAÇÕES CURTAS

São relatos contendo dados inéditos e relevantes de estudos originais, como, por exemplo, resultados preliminares de uma pesquisa. Devem ser apresentadas com, no máximo, três páginas, uma tabela e cinco referências. A estrutura deve respeitar as normas para relatos de caso.

CITAÇÕES NO TEXTO

Geral: é normalizada segundo a Associação Brasileira de Normas Técnicas –ABNT/NBR 10520: <http://biblioteca.inpa.gov.br/NBR10520.htm> ou <http://www.creupi.br/biblioteca/normas.htm>

1 Citação no final do parágrafo: indica-se entre parênteses o sobrenome do autor em letras maiúsculas e ano.

1.1 Trabalho com um único autor: citar o sobrenome seguido de vírgula e o ano entre parênteses. Exemplo: (ALVES, 1999).

1.2 Vários trabalhos de autores diferentes: devem ser citados em ordem cronológica, crescente e separados por “;” (ponto e vírgula). Exemplo: (FONSECA, 1999; RAHAL, 2005).

1.3 Trabalho com dois autores no mesmo artigo: citar os sobrenomes de ambos separados pela conjunção “e”, acompanhados por vírgula e o ano. Exemplo: (SILVA e LOPES, 1998).

1.4 Trabalho com três autores: citar o sobrenome do primeiro, seguido da expressão et al., e posteriormente vírgula e o ano. Exemplo: (CASTRO et al., 1998).

1.5 Trabalhos do mesmo autor no mesmo ano devem ser identificados por letra minúscula do alfabeto. Exemplo: (CASTRO, 1998b).

1.6 Vários trabalhos do mesmo autor: citar o sobrenome do autor e os anos em ordem cronológica. Exemplo: (FONTANA, 1996, 2000, 2003).

2 Citação no início do parágrafo: o sobrenome do autor deverá ter apenas a primeira letra em maiúscula e apenas a data entre parênteses.

2.1 Trabalho com um único autor: citar o sobrenome seguido de vírgula e o ano entre parênteses. Exemplo: Conforme Luna (1990), destacou-se...

2.2 Vários trabalhos de autores diferentes: devem ser citados em ordem cronológica, crescente e separados por “;” (ponto e vírgula). Exemplo: Segundo Fonseca (1999); Rahal (2005), o sistema de análise estatísticas...

2.3 Trabalho com dois autores no mesmo artigo: citar os sobrenomes de ambos separados pela conjunção “e”, acompanhados por vírgula e o ano. Exemplo: Para Silva e Lopes (1998), as enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos...

2.4 Trabalho com três autores: citar o sobrenome do primeiro, seguido da expressão et al., e posteriormente vírgula e o ano. Exemplo: Conforme Castro et al. (1998), a cadeia produtiva da carne de aves no Brasil...

2.5 Trabalhos do mesmo autor no mesmo ano devem ser identificados por letra minúscula do alfabeto. Exemplo: Segundo Castro (1998b), estudos experimentais em cães comprovaram...

2.6 Vários trabalhos do mesmo autor: citar o sobrenome do autor e os anos em ordem cronológica. Exemplo: Avaliação de cultivares de *Panicum maximum* em pastejo, segundo Euclides (1996, 2000, 2003), possibilita...

REFERÊNCIA

1 Obras de responsabilidade de uma entidade coletiva (a entidade é tida como autora)
ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 12.ed. Washington, 1975. 1094p.
UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA. **SAEG**: sistema de análises estatísticas e

genéticas. Viçosa, 1997. 150p. (Manual do usuário- versão 7.1).

2 Livros

MODOLO, J.R. et al. **Planejamento de saúde para o controle da artrite-encefalite caprina**. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2003. 78p.

3 Capítulo de livro (autor do livro é o mesmo do capítulo)

CORRÊA, M.C.; CORRÊA, C.N.M. Estafilococias em geral. In:_____.

Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos. 2. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1992. pt.2, cap.8, p.91-103.

4 Capítulo de livro (autor do capítulo diferente do autor do livro)

MENDES, A.A.; SALDANHA, E.S.P.B. A cadeia produtiva da carne de aves no Brasil.

In: MENDES, A.A.; NAAS, I.A.; MACARI, M. **Produção de frangos de corte**.

Campinas: FACTA, 2004. p.1-22

5 Artigo de revista

ANDRADE, S.F.; SAKATE, M. Intoxicação por amitraz: revisão. **Vet. Not.**, v.10, n.2, p.1-15, 2004.

6 Artigos apresentados em congressos, reuniões, seminários etc

MALHADO, C.H.M. et al. Modelos polinomiais para descrever a curva de postura de codornas. In: CONGRESSO NORDESTINO DE PRODUÇÃO ANIMAL, 3., 2004, Campina Grande. **Anais...** Campina Grande: Universidade Federal da Paraíba, 2004. p.1-3

7 Teses e Dissertações

MORTARI, A.C. **Avaliação da técnica de transposição do músculo semitendinoso para reparo do diafragma pélvico**: estudo experimental em cães. 2004. 101f.

Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

8 Citação de trabalhos publicados em CD ROM

EUCLIDES, V.P.B.; MACEDO, M.C.M.; OLIVEIRA, M.P. Avaliação de cultivares de *Panicum maximum* em pastejo. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 36., 1999, Porto Alegre. **Anais...** São Paulo: Gmosis, 1999. CD-ROM. (Forragicultura. Avaliação com animais. FOR-020).

9 Publicações disponíveis na internet

VASCONCELOS, J.L.M. Endometrite subclínica em vacas leiteiras. **Radares Técnicos-Reprodução**, Campinas, 2004. p.1-2. Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br>>.

**Trabalho enviado para publicação na Revista Veterinária e
Zootecnia**

**Protocolo de isolamento de células mononucleares de medula
óssea de eqüinos**

[Protocol of isolation of equine mononuclear cells from bone marrow]

Protocolo de posicionamiento de células mononucleadas de la médula ósea de equinos

Ana Liz Garcia Alves^{*1,2}, Michelle Elisa Meletti Vieira³, Anna Paula Balesdent Barreira⁴, Ligia Souza Lima Silveira da Mota⁵, Mere Erika Saito⁶, Aguemi Kohayagawa⁷, Carlos Alberto Hussni⁸, Marcos Jun Watanabe⁹, Patrícia Galvão Gomes de Oliveira¹⁰

¹ Agradecimento: **FAPESP**

² Professora Assistente Doutora - DCAV – FMVZ - UNESP, Botucatu - SP, anaalves@fmvz.unesp.br

³ Aluna de Iniciação Científica - DCAV - FMVZ - UNESP, Botucatu - SP.

⁴ Acadêmico Pós-Graduando - DCAV - FMVZ - UNESP, Botucatu - SP.

⁵ Professora Assistente Doutora - DG - IB - UNESP, Botucatu - SP.

⁶ Acadêmico Pós-Graduando - DCAV - FMVZ - UNESP, Botucatu - SP.

⁷ Professora Titular - DCV - FMVZ - UNESP, Botucatu - SP.

⁸ Professor Adjunto - DCAV - FMVZ - UNESP, Botucatu - SP.

⁹ Aluno Pós-Doutorado - DCAV - FMVZ - UNESP, Botucatu – SP, watanabe@fmvz.unesp.br

¹⁰ Acadêmico Pós-Graduando - DCAV - FMVZ - UNESP, Botucatu – SP, patriciavet@terra.com.br

Correspondência para:

Profa. Dra Ana Liz Garcia Alves

Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária da FMVZ – UNESP,
Distrito de Rubião Júnior s/n, Caixa Postal 560, CEP: 18618-000, Botucatu – SP.

Tel: (14) 3811 6252 Fax: (14) 3811 6072

Protocolo de isolamento de células mononucleares de medula óssea de eqüinos

RESUMO

No final da década de 90, os avanços médicos demonstraram crescente interesse na utilização de células-tronco em terapias de doenças degenerativas e em casos de cicatrização lenta ou de baixa qualidade. A medula óssea é uma das fontes dessas células precursoras em indivíduos adultos e sua obtenção pode ser realizada por meio de punção aspirativa. Esse estudo tem por objetivo avaliar a técnica de punção aspirativa de medula óssea e definir um protocolo para isolamento das células mononucleares de eqüinos. Para tanto, 12 eqüinos adultos, machos e fêmeas, sem raça definida, foram contidos em tronco e sedados. Após tricotomia na região do esterno, a 5ª esternebra foi identificada por ultrassonografia, sendo realizadas anestesia local e anti-sepsia. A punção aspirativa foi realizada com a introdução de uma agulha tipo Komiyashiki na 5ª esternébra e as amostras de medula óssea foram aspiradas com seringas de 20 mL heparinizadas. Após filtração, diluição e separação da fração mononuclear por gradiente de densidade com Ficoll, foi realizado o teste de viabilidade celular por exclusão do azul de tripan, pelo qual se verificou uma média de 86,9% de células viáveis. O resultado mostrou que a técnica descrita é simples e, embora confiável, necessita de habilidade técnica para a coleta e isolamento das células mononucleares, a fim de otimizar os resultados. Com o domínio da técnica de coleta e isolamento das células mononucleares será possível implementar a terapia celular em eqüinos, tanto em experimentos, quanto nas aplicações clínico-terapêuticas.

Palavras-chave: fração mononuclear; célula-tronco; medula óssea; punção aspirativa; eqüino.

Protocol of isolation of equine mononuclear cells from bone marrow

ABSTRACT

In the late 90's, medical interests have been direct to the stem cells therapy of degenerative diseases as in cases of deficient healing process. In adults, the stem cells are found at the bone marrow and their isolation could be accessed by aspiration technique. This experiment

was developed with twelve sedated standing horses. After sedation and clipping, the 5th sternabrae was identified by ultrasonography. The marked sites were scrubbed and local anesthesia done. A Komiyashiki biopsy needle (8 gauge e 15 cm) was introduced in the 5th sternebrae and a blood sample was aspirated in 20 mL syringes with heparine. Smears were immediately prepared and submitted to laboratory examination to verify its origin. After isolation of mononuclear cells made by the use of Ficoll, cell viability was determined with tripan blue exclusion technique, where was obtained a media of 86,9% of viable cells. No accidental pleural or cardiac perforation was reported. This results demonstrates that the technique although reliable, needs to be improved and the collector must be capable to maximize results. As the knowledge is obtained, the stem cell harvest experiment and clinical approach can be implemented in this specie.

Keywords: mononuclear fraccion; stem cell; aspiration; bone marrow; equine.

Protocolo de posicionamiento de células mononucleadas de la médula ósea de equinos

RESUMEN

Al final de la década de 90, los avances médicos demostraron interés creciente en la utilización de células tronco en terapias de enfermedades degenerativas y en los casos de cicatrización lenta o de baja calidad. La médula ósea es una de las fuentes de estas células precursoras en individuos adultos y su aislamiento puede ser realizado en equinos mediante punción aspirativa de la médula ósea, que al ser llevada a efecto en cuadripedestación, permite la obtención de las células precursoras, así como la definición de un protocolo para la separación de las células mononucleares, técnicas que difieren de aquellas utilizadas en humanos. Este experimento fue desarrollado en 12 equinos, los cuales fueron sedados y mantenidos en cuadripedestación. Después de la sedación y tricotomía local, la quinta esternebra fue identificada mediante ultrasonografía. Fueron realizadas antisepsia y anestesia local en los lugares marcados. Fue introducida una aguja de biopsia Komiyashiki (8 gauge y 15 cm) en la quinta esternebra y la médula ósea fue aspirada con jeringas de 20 mL con anticoagulante. Las muestras fueron utilizadas inmediatamente para la preparación de los frotis y sometidas a observación al microscopio, con el objetivo de identificar su

origen, confirmando la proveniencia de la médula ósea. Después de filtración, dilución y separación de la fracción mononuclear mediante gradiente de densidad con el uso de Ficoll, fue realizada la prueba de viabilidad celular por exclusión de azul de tripan, donde se verificó una media de 86,9% de células viables. No fueron descritos accidentes como perforaciones pleurales o cardíacas. El resultado mostró que la técnica descrita es simple y, aunque confiable, necesita de habilidad técnica del colector para la optimización de los resultados. Con el dominio de la técnica será posible implementar la colecta y obtención de las células tronco para la terapia celular en equinos, tanto experimentalmente, como en las aplicaciones clínico-terapéuticas.

Palabras clave: fracción mononuclear, células tronco, médula ósea, punción aspirativa, equino.

INTRODUÇÃO

As células-tronco são genericamente definidas como células indiferenciadas capazes de se auto-renovar e podem ainda se diferenciar em linhagens e tipos celulares específicos (SUTTER, 2007).

Atualmente, os avanços médicos demonstram um interesse crescente na utilização das células-tronco no tratamento de doenças degenerativas e naquelas que apresentam respostas lentas ou insatisfatórias aos tratamentos tradicionais, sendo esta área denominada de terapia celular. Assim, diversas pesquisas focam a medicina regenerativa, a qual busca regular o processo de regeneração de células e tecidos lesados por meio do implante de células-tronco (MOTA et al., 2005), tendo em vista que essas células possuem potencial de replicação indiferenciada e capacidade de maturação em diferentes tecidos (SMITH et al., 2003).

Das células-tronco adultas já estudadas, as mesenquimais possuem ampla capacidade de diferenciação, sendo denominadas de pluri ou multipotentes, podendo se diferenciar em osso, cartilagem, tendão, ligamento, músculo e células gordurosas (ZAGO e COVAS, 2006), e são obtidas de diversas fontes de tecido conjuntivo, como da medula óssea, gordura, músculo, cartilagem, osso trabecular e tendões (FORTIER e SMITH, 2007). As células mesenquimais (CTM) também são encontradas em pequenas quantidades em tecido perivascular, sangue periférico e cordão umbilical (RICHARDSON et al., 2007).

Os tratamentos com células-tronco na medicina eqüina utilizam-se de implantes autólogos de células mesenquimais adultas, empregadas clínica ou experimentalmente para o tratamento de cistos subcondrais, reparo de fraturas e defeitos de cartilagem (RICHARDSON et al., 2007), tendo, como principal destaque, sua aplicação no tratamento de tendinites (BARREIRA, 2007), que constituem uma das principais lesões músculo-esqueléticas do cavalo atleta (SCHMITT e RINGE, 2003).

Em eqüinos, diversas fontes celulares podem ser consideradas; porém o uso tem se limitado à obtenção das células de medula óssea e tecido adiposo, devido à facilidade de coleta, baixa incidência de lesão do local manipulado e possibilidade de coleta no indivíduo adulto (RICHARDSON et al., 2007). As células-tronco obtidas por meio de punção da medula óssea aparentam possuir uma capacidade de diferenciação em um maior número de tipos celulares (FORTIER e SMITH, 2007). O esterno é o local de escolha para a aplicação da técnica, pois a atividade hematopoiética persiste por toda a vida do animal, e é recoberta por pouca massa muscular e de cortical delgada, facilitando o acesso à medula óssea

(THOMAS, 2003). Outro possível local de punção da medula óssea é a tuberosidade coxal (SUTTER, 2007).

O objetivo da presente pesquisa foi avaliar a punção do esterno para a obtenção de amostras de medula óssea, definir um protocolo de isolamento da fração mononuclear adequado à espécie e a avaliação da porcentagem de viabilidade das células em eqüinos adultos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 12 eqüinos clinicamente sadios, com idade de 4 a 7 anos, machos e fêmeas, sem raça definida e com peso entre 350 a 450kg.

Antes da fase de coleta da medula óssea, os animais foram pesados, submetidos a aplicação de vermífugo à base de ivermectina¹⁷, a exames físicos e laboratoriais para a constatação da higidez. Durante todo o experimento, foram mantidos em baias individuais, alimentados com feno de capim “coast-cross”, água *ad libitum* e suplementados com ração comercial para eqüinos¹⁸.

As punções de medula óssea foram realizadas com os animais mantidos em estação e contidos em tronco. Os animais foram sedados com xilazina 10%¹⁹ na dose de 0,5 mg/kg pela via intravenosa e tricotomia de 5 x 20 cm foi realizada na região do esterno. Após a identificação da 5ª esternébra, por meio da ultra-sonografia com aparelho de ultra-som ALOKA e probe linear de 7,5 MHz²⁰ (Figura 1A e 1B), a anestesia local foi realizada

¹⁷ Eqvalan Gel - Purina, Brasil.

¹⁸ Manutenção 13% - Agrocere, Brasil.

¹⁹ Sedazine - Fort Dodge, Brasil.

²⁰ Aloka SSD 900, Japão.

com a aplicação de 15 mL de lidocaína sem vasoconstrictor²¹ no tecido subcutâneo e musculatura.

A região da 5^a esternebra foi submetida à anti-sepsia com álcool iodado e a punção de medula óssea foi realizada por meio da introdução de uma agulha modelo Komiyashiki²² (Figura 2A), de calibre 8 gauge e 15 cm de comprimento, no sentido ventro-dorsal perpendicular à pele, sendo os planos perfurados: pele, musculatura e cortical óssea. Uma vez atingida a medula óssea, retirou-se o mandril e realizou-se a aspiração com seringa descartável de 20 mL²³, contendo 1 mL de heparina sódica²⁴ (5000 UI/mL) (Figura 2B). Uma pequena alíquota dessa amostra foi colocada em uma placa de Petri para a avaliação macroscópica, pela qual se verificou a presença de espículas e glóbulos de gordura, sugerindo a origem medular da amostra. O procedimento de aspiração foi repetido com outra seringa de 20 mL, contendo também 1 mL de heparina. As seringas foram devidamente identificadas, acondicionadas em gelo e encaminhadas para o processamento em laboratório.

A amostra foi diluída em solução salina tamponada com fosfato (Dulbecco's Eagle's Modificado - DPBS²⁵) e filtrada em equipo de transfusão²⁶, para remoção dos agregados celulares. Em seguida, o filtrado foi delicadamente depositado em Ficoll²⁷ e centrifugado a 500g por 30 minutos à temperatura ambiente, visando à separação dos constituintes por gradiente de densidade. Após a centrifugação, formou-se um halo esbranquiçado (Figura 3A) rico na fração mononuclear da medula óssea, entre o

²¹ Xilestesin 2% sem vasoconstrictor - Cristália, Brasil.

²² Agulha Komiyashiki, Japão.

²³ Seringa descartável BD Plastipak - Becton Dickinson Indústria Cirúrgica Ltda, Brasil.

²⁴ Heparin 5000UI/mL - Cristália, Brasil.

²⁵ Dulbecco's Eagle's Modificado - Sigma Aldrich, EUA.

²⁶ Equipo infusão de sangue câmara dupla - Embramed

²⁷ Histopaque d=1,077 - Sigma Aldrich, EUA.

plasma e a porção contendo os eritrócitos com Ficoll. Este halo foi separado, diluído em DPBS e novamente centrifugado 300g por 10 minutos. Esta operação foi repetida por mais uma vez, a fim de se retirar totalmente o Ficoll.

A fração mononuclear foi submetida ao teste de viabilidade celular por exclusão do azul de tripan (0,2%)²⁸ (Figura 3B), seguindo o princípio de que as células íntegras possuem seletiva permeabilidade de membrana e não absorvem o corante. Por outro lado, células mortas absorvem o corante e adquirem coloração fortemente azul. O estudo de viabilidade foi feito em microscópio óptico, fazendo-se a contagem de células mortas coradas e células íntegras não coradas.

RESULTADOS

Com relação ao procedimento da punção aspirativa da medula óssea, não foram observadas complicações como acidentes, resposta dolorosa à introdução da agulha de punção, invasão da cavidade torácica ou infecção regional.

O volume total das amostras da medula óssea obtidas com as duas seringas de cada animal foi de 10 a 12 mL, sendo que na análise macroscópica dessas amostras em placa de Petri foram observadas características como consistência gelatinosa, presença de agregados celulares, grânulos (espículas) e glóbulos de gordura. À microscopia, observaram-se células jovens, ainda indiferenciadas e hematopoieticamente ativas, como também espículas e até mesmo células mesenquimais.

Foi possível a obtenção da fração mononuclear através da separação por gradiente de densidade. A diluição com DPBS reduziu o tamanho da “névoa” branco-avermelhada

²⁸ Vetec Química Fina, Brasil.

formada, porção esta que não causou problemas para a coleta da fração mononuclear e sua lavagem. O volume da fração mononuclear após o isolamento variou de 0,5 a 0,7 mL.

Por meio do teste de viabilidade celular por exclusão do corante azul de tripan (0,2%), observou-se uma média de 86,9% de células viáveis (Tabela 1).

DISCUSSÃO

Diferentemente de Herthel (2001); Thomas (2003) e Sellon (2006) que descreveram o procedimento de punção de medula óssea em eqüinos sob anestesia geral, na presente pesquisa optou-se pelo método de abordagem dos eqüinos para a punção de medula óssea com o cavalo em apoio quadrupedal, visando verificar a viabilidade da punção em situações onde não haja disponibilidade de centro cirúrgico ou em casos de pacientes de risco.

Assim, mesmo que não se tenha realizado análise de custos e a quantidade de animais possa ser pequena para se avaliar os riscos e complicações pós-operatórias, observamos que a realização da punção com contenção mecânica em tronco associada com a sedação e a anestesia local acabaram por minimizar os custos envolvidos com materiais e fármacos anestésicos. Também, o procedimento com os eqüinos em apoio quadrupedal diminuiu possíveis riscos inerentes à anestesia geral, como acidentes na indução, durante a manutenção anestésica e na recuperação.

A aparência macroscópica das amostras foi caracterizada por sangue com gotículas de gordura e presença de pequenos grânulos acinzentados (espículas) (MELO et al., 2006). Entretanto, a consistência gelatinosa da amostra, especialmente da primeira alíquota, e sua tendência à formação de pequenos agregados celulares, mesmo na presença do anticoagulante, não havia sido relatada na literatura. Características essas

relacionadas com a grande quantidade de substâncias tromboplásticas presentes na medula óssea (HARVEY, 2001).

Todos os animais foram submetidos à punção de apenas um local, e do volume total das amostras (10 a 12 mL) obtiveram-se, após o processamento, cerca de 0,5 a 0,7 mL da fração mononuclear, considerado suficiente para a aplicação, por exemplo, na maioria das lesões tendíneas de eqüinos (AWAD et al., 1999). Mas, caso fosse necessária uma amostra de maior volume, demais locais do esterno poderiam ser explorados, como sugerido por Katheleen (2000). Não se observou vantagem ao se coletar grandes volumes, pois as células progenitoras concentraram-se nos primeiros mililitros de sangue medular (SUTTER, 2007).

A utilização da heparina sódica similarmente ao proposto por Smith e Webbon (2005), proporcionou uma concentração final de aproximadamente 1.000 UI de heparina por mL de amostra de medula óssea e possibilitou uma adequada manipulação em laboratório.

O procedimento da separação mononuclear foi possível com a técnica descrita, com resultados similares aos de Perin et al. (2003) em pesquisa com humanos. Smith et al. (2003) realizou o isolamento da fração mononuclear em eqüinos, sem a completa descrição da técnica, seguido do cultivo das células mesenquimais *in vitro*. Os trabalhos publicados referentes às células-tronco na espécie eqüina não apresentam a metodologia utilizada na separação da fração mononuclear após coleta de medula óssea. O protocolo de isolamento destas células nas técnicas já descritas para outras espécies necessita de adaptações, pois os cavalos apresentam rápida coagulação do sangue medular e formam agregados celulares mesmo na presença de anticoagulantes. As células são freqüentemente semi-purificadas por gradiente de centrifugação, seguido de deposição em frascos de cultura e aderência ao

plástico, enriquecendo, mas não exatamente purificando, o preparado celular para realização de implante (RICHARDSON et al., 2007).

Apesar do uso constante em pesquisas de células cultivadas, alguns experimentos utilizam medula óssea total para o tratamento de tendinites (HERTHEL, 2001; ROSENBROCK et al, 2004), ou ainda o implante da própria fração mononuclear (BARREIRA, 2005; BARREIRA et al., 2008). O uso desta fração em tratamentos de lesões ortopédicas tem a vantagem de poder ser realizada no momento do diagnóstico, com menor tempo de preparo e custos, e ainda aumenta a concentração de células tronco mesenquimais para o implante direto, sendo o número de CTM na fração mononuclear de 0,001% a 0,01% (FORTIER e SMITH, 2008). No entanto, esta é uma mistura heterogênea de tipos celulares (RICHARDSON et al., 2007).

Inicialmente a separação da fração mononuclear foi dificultada pela presença de coágulo e fibrina nas amostras. Porém a filtragem da medula óssea, em equipo de transfusão sanguínea e diluição com DPBS, possibilitaram a obtenção da fração mononuclear por meio da separação por gradientes de densidade. Também a etapa de separação dos gradientes reduziu a “névoa branco-avermelhada”, que se formou na porção com células mononucleares e facilitou a captação do halo esbranquiçado para lavagem, diminuindo porém a sua definição. Este aglomerado branco-avermelhado não foi descrito anteriormente na espécie, entretanto sua presença não dificultou a realização da técnica. Fortier e Smith (2008) citaram a técnica de separação da fração mononuclear como um possível tratamento para lesões tendo-ligamentares com CTM derivadas da medula óssea. Após coleta de 60 mL de sangue medular em seringas heparinizadas, o material foi centrifugado durante 14 minutos de maneira similar ao utilizado para gerar plasma rico em plaquetas (PRP), para concentrar as células mononucleares.

O teste de viabilidade celular por exclusão do corante azul tripan (0,2%), cujo resultado alcançou 86,9% na presente pesquisa, foi inferior aos 96% obtido por Perin et al. (2003) antes do implante em humanos. Contudo, como nos demais trabalhos publicados para espécie eqüina (HERTHEL, 2002; THOMAS, 2003; SMITH et al., 2003) não realizaram tal teste, a comparação das porcentagens foi comprometida, uma vez que mais estudos de viabilidade celular em cavalos poderiam indicar a influência da espécie nessas porcentagens. Havendo, assim, necessidade da realização de futuras pesquisas com a avaliação da viabilidade da fração mononuclear obtidas da medula óssea de eqüinos.

CONCLUSÕES

O protocolo descrito mostrou-se eficaz para a obtenção e isolamento da fração mononuclear em eqüinos, utilizando-se heparina sódica como anticoagulante, seguido de filtragem e diluição do material proveniente da medula óssea.

As células isoladas mantiveram uma boa viabilidade celular, tornando este material adequado para a realização de implante intra-lesional, ou mesmo para cultivo de células mesenquimais.

Mais estudos devem ser realizados para o aprimoramento de técnicas visando a obtenção de células-tronco mesenquimais e sua identificação.

REFERÊNCIAS

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

BARREIRA, A.P.B. **Implante autólogo de células tronco mesenquimais no tratamento de tendinites induzidas experimentalmente em eqüinos: avaliação clínica, ultrasonográfica, histopatológica e imunoistoquímica.** 2005. 102 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

BARREIRA, A.P.B. et al. Autologous Implant of Bone Marrow Mononuclear Cells as Treatment of Induced Equine Tendinitis. **Intern J Appl Res Vet Med**, v. 6, n. 1, p.46-54, 2008.

CROVACE, A. et al. Cell therapy for tendon repair in horses: an experimental study. **Vet. Res. Commun.**, v.31, n.1, p.281-283, 2007.

FORTIER, L.A.; SMITH, R.K.W. Evidence for stem cells in cartilage regeneration. In: American Association of Equine Practitioners - Annual Convention. 2007, Orlando. **Proceedings ...** Orlando: AAEP, 2007. p.329-334.

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

FRISBIE, D.D.; KAWCAK, C.E.; 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. In: American Association of Equine Practitioners - Annual Convention. 2006, San Antonio. **Proceedings ...** San Antonio: AAEP, 2006.

HARVEY, J. W. **Atlas of veterinary hematology: blood and bone marrow of domestic animals.** Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2001. 228p.

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

HERTHEL, D.J. Enhanced suspensory ligament healing in 100 horses by stem cells and other bone marrow components. In: American Association of Equine Practitioners - Annual Convention. 2001, San Diego. **Proceedings ...** San Diego: AAEP, 2001. p.319-321.

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

MELO, L.N.; RESENDE, L.S.R.; GAIOLLA, R.D.; OLIVEIRA, C.T.; DOMINGUES, M.A.C.; NETO, F.A.M. Diretrizes para diagnóstico morfológico em síndromes mielodisplásicas. **Rev. Bras. Hematol. Hemot.**, v.28, n.3, p.167-174, 2006.

MORRIS, D.D.; WHITLOCK R.H. Relapsing idiopathic thrombocytopenia in a horse. **Equine Vet. J.**, v.15, n.1, p.73-75, 1983.

MOTA, A.C.A.; SOARES, M.B.P.; SANTOS, R.R. Uso de terapia regenerativa com células-tronco da medula óssea em doenças cardiovasculares- perspectiva do hematologista. **Rev. Bras. Hematol. Hemot.**, v.27, n.2, p.126-132, 2005.

PERIN, E.C.; DOHMAN, F.R.; BOROJEVIC, R. et al. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. **Circulation**, v.107, n.18, p.2294-2302, 2003.

RICHARDSON, L.E.; DUDHIA, J.; CLEGG, P.D.; SMITH, R. Stem cell in veterinary medicina – attempts at regenerating equine tendon after injury. **Trends in Biotechnology**, v.25, n. 9, p. 409- 416. 2007.

ROSENBROCK, A.; JACOBI, R.; JAUGSTETTER, H.; BREHM, W. Autologous bone marrow transplantation to stimulate suspensory ligament regeneration in 24 horses - a clinical case control study. In: 12th ESCOT CONGRESS, **Proceedings...** Monique, 2004. p.264-265.

- SCHMITT, B.; RINGE, J. Initiates chondrogenic lineage development of adult human mesenchymal stem cells in high-density culture. **Differentiation**, v.71, n.9-10, p.567, 2003.
- 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.**, n.39, p.582-584, 2005.
- SMITH, R.K.W.; KORDA, M.; BLUNN, G.W. et al. Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potencial novel treatment. **Equine Vet. J.**, v.35, n.1, p.99-102, 2003.
- THOMAS, H.S. Mending with marrow. **Sports Medicine**, p.53-56, 2003.
- SELLON, D.C. How to obtain a diagnostic bone marrow sample from the sternum of an adult horse. In: American Association of Equine Practitioners - Annual Convention. 2001, San Antonio. **Proceedings ...** San Antonio: AAEP, 2006. p.621-625.
- SUTTER, W.W. Autologous cell-based therapy for tendon and ligament injuries. **Clinical Techniques Equine in Practice**, v.6, n.3, p.198-208, 2007.
- ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. **Células-Tronco A nova fronteira da medicina**. São Paulo: Editora Atheneu, 1^a edição, 2006. 245p.

Tabela 1- Valores individuais e média das porcentagens da viabilidade celular de amostras obtidas por punção de medula óssea e submetidas ao teste por exclusão do corante azul de tripan 0,2% em 12 eqüinos. Botucatu – SP, 2007.

Animal	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Média
% de células viáveis	76	82	74	95	90	92	89	92	86	90	82	95	86,9

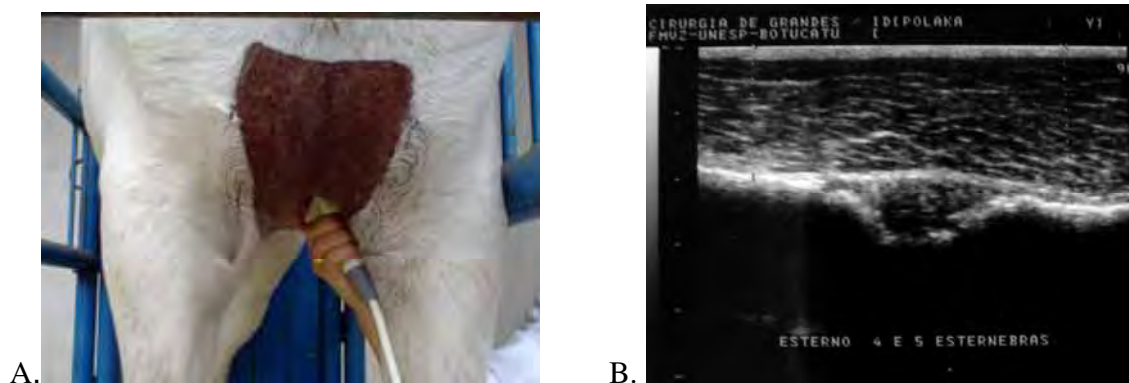


Figura 1 - A: Identificação do local de punção através do ultra-som. **B:** Imagem ultrasonográfica do esterno com visualização da 4ª e 5ª esternibras. Botucatu – SP, 2007.



Figura 2 - A: Agulha Komiyashiki, à esquerda a agulha e à direita o mandril. **B:** Agulha posicionada na medula óssea da 5ª esternebra e punção sendo realizada com auxílio de seringa de 20 mL. Botucatu – SP, 2007.

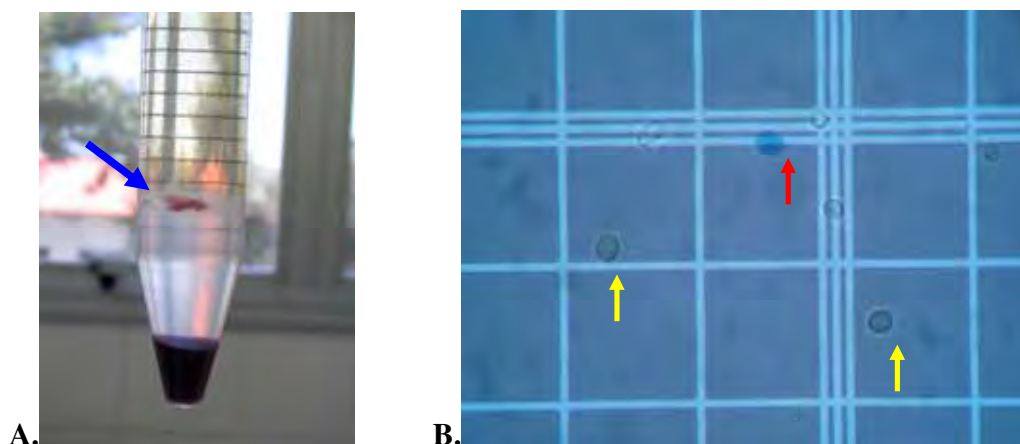


Figura 3 - **A:** Formação do halo esbranquiçado (seta) contendo células mononucleares. **B:** Teste de viabilidade celular com azul de tripan. Seta vermelha indica célula não viável; setas amarelas mostram células viáveis. Botucatu – SP, 2007.