

**Anamaria Santos Soares**

**Avaliação clínica e ultra-sonográfica  
de dois protocolos de terapia celular  
no reparo do ligamento suspensório em eqüinos**

**Dissertação apresentada à Escola de  
Veterinária da Universidade Federal de  
Minas Gerais, como requisito parcial  
para a obtenção do grau de Mestre em  
Ciência Animal.**

**Área: Clínica e Cirurgia Veterinárias  
Orientador: Prof. Dr. Rafael Resende  
Faleiros.**

**Belo Horizonte  
Escola de Veterinária da UFMG  
2008**

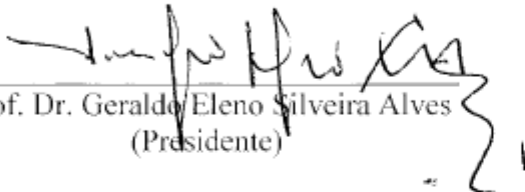
S676a Soares, Anamaria Santos, 1971-  
Avaliação clínica e ultra-sonográfica de dois protocolos de terapia celular no reparo do ligamento suspensório em equinos / Anamaria Santos Soares. – 2008.  
52 p. : il.

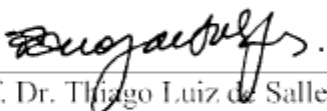
Orientador: Rafael Resende Faleiros  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária  
Inclui bibliografia

1. Eqüino – Cirurgia – Teses. 2. Eqüino – Membros – Cirurgia – Teses. 3. Ligamentos – Teses.  
I. Faleiros, Rafael Resende. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III.  
Título.

CDD – 636.108 971

Dissertação defendida e aprovada em 21/02/2008, pela Comissão Examinadora constituída por:

  
Prof. Dr. Geraldo Eleno Silveira Alves  
(Presidente)

  
Prof. Dr. Thiago Luiz de Salles Gomes

  
Prof. Dr. Roberto Maurício Carvalho Guedes



À minha família, minha origem, razão da minha existência.  
Ao meu marido, meu companheiro, pelo apoio incondicional e  
compreensão nos momentos de cansaço e afastamento.  
Ao meu filho, que é a razão do meu viver.  
Aos meus pais que muito amo, pelo apoio em todos os momentos.  
Aos meus irmãos que me incentivam e me enchem de alegria.  
À minha querida vovó Maria, pelo exemplo de força e perseverança.

A todos vocês dedico esse trabalho.



## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida, pela família maravilhosa que tenho, pelos amigos e por me dar saúde e força durante as muitas dificuldades encontradas.

À minha família, em especial ao meu filho João Tadeu, meu marido, meus pais e irmãos, obrigada por entenderem os muitos momentos de ausência.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rafael Resende Faleiros, a quem muito admiro pela competência e dedicação à pesquisa e ensino; obrigada pela amizade, apoio, compreensão e confiança além do carinho desprendido por toda sua família ao meu João.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Luiz Alberto Lago pelo apoio.

Ao Prof. Dr. Geraldo Eleno Silveira Alves, pelos muitos ensinamentos e pelas palavras sinceras.

À Lúcia, babá do João, muito obrigada pelo amor e dedicação ao cuidar do meu filho.

Aos colegas de mestrado Odael Spadeto Jr. e Silke Schwarzbach que me auxiliaram na execução do experimento.

Aos estagiários Deliene Moreira, Franz Ribeiro e Larissa Botoni, sempre dispostos a cooperar e aprender.

Ao residente da Clínica Cirúrgica de Grandes Animais, Hélder Sato, pelo auxílio na anestesia.

Aos estagiários da Clínica Cirúrgica de Grandes Animais, pela valiosa colaboração.

Aos professores da Pós Graduação, pelo conhecimento, disciplina e amizade.

A FAPEMIG pelo suporte dessa pesquisa através do processo n° CVZ APQ-3675-5.04/07.

Ao Laboratório Hermes Pardini pelo processamento e cultivo celular.

A Echo, pelo suporte técnico em equipamentos de ultra-sonografia durante toda execução do experimento.

A Fort Dogde Saúde Animal, pela doação dos vermífugos e xilazina utilizados no experimento.

A Vansil Indústria Veterinária pela doação dos antibióticos e antiinflamatórios administrados aos animais.

A Hertape Calier Saúde Animal S/A, pela doação da vacina anti-tetânica.

Aos colegas de mestrado pela convivência agradável.

Aos funcionários do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias, da limpeza, do Colegiado de Pós-Graduação e da portaria pela colaboração.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de mestrado.

A todas as pessoas e animais que tornaram esse experimento possível o meu muito obrigada!



---

## SUMÁRIO

---

LISTA DE QUADROS.....	10
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
LISTA DE ANEXOS.....	12
RESUMO.....	13
ABTRACTS.....	14
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1. Características morfológicas dos ligamentos.....	16
2.2. Fisiopatologia da lesão e reparação ligamentar.....	17
2.3. O ligamento suspensório.....	19
2.4. Exame do ligamento suspensório.....	19
2.4.1. Exame ultra-sonográfico.....	20
2.5. Afecções do ligamento suspensório.....	20
2.6. Células-tronco.....	21
2.6.1. Células-tronco da medula óssea e do tecido adiposo.....	22
2.6.2. Células-tronco e sua aplicabilidade no tratamento de lesões tendíneas e ligamentares nos membros dos eqüinos.....	23
2.6.3. Colheita de células-tronco adultas nos eqüinos.....	24
2.6.4. Complicações da punção de medula óssea nos eqüinos.....	24
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1. Local e período.....	25
3.2. Animais.....	25
3.3. Indução das lesões.....	25
3.3.1. Protocolo anestésico.....	25
3.3.2. Metodologia cirúrgica.....	25
3.4. Grupos experimentais e preparo dos animais.....	26
3.5. Colheita, processamento e cultivo de células oriundas de tecido adiposo.....	26
3.5.1. Colheita de tecido adiposo.....	26
3.5.2. Separação e cultivo das células.....	27
3.6. Colheita e processamento das células da medula óssea.....	27
3.7. Administração dos tratamentos.....	27
3.8. Exame clínico e ultra-sonográfico.....	28
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	28
5. RESULTADOS.....	28
5.1. Indução das lesões.....	28
5.2. Obtenção das células para os tratamentos.....	29
5.2.1. Colheita de tecido adiposo.....	29
5.2.2. Separação e cultivo das células.....	29
5.2.3. Punção aspirativa de medula óssea.....	29
5.2.4. Separação da fração mononuclear.....	30
5.3. Administração dos tratamentos.....	30
5.4. Avaliação clínica.....	30
5.4.1. Dor.....	30
5.4.2. Edema.....	31
5.4.3. Temperatura.....	33
5.5. Exame ultra-sonográfico.....	34
5.5.1. Intensidade de cor cinza na área da lesão.....	34
5.5.2. Área da lesão.....	37
5.5.3. Diâmetro de Ferret e perímetro da lesão.....	38
5.5.4. Área total do ligamento e área percentual da lesão.....	40
6. DISCUSSÃO.....	41

6.1.	Indução das lesões.....	41
6.2.	Obtenção das células para os tratamentos.....	42
6.2.1.	Colheita, processamento e cultivo de células oriundas de tecido adiposo.....	42
6.2.2.	Colheita e processamento de medula óssea.....	43
6.3.	Administração dos tratamentos.....	43
6.4.	Avaliação clínica dos animais.....	44
6.5.	Exame ultra-sonográfico dos animais.....	44
7.	CONCLUSÕES.....	44
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
9.	ANEXOS.....	49

---

### LISTA DE QUADROS

---

Quadro 1.	Seqüência dos tratamentos nos membros por animal .....	26
-----------	--	----

---

### LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1.	Estrutura organizacional dos tendões.....	16
Figura 2.	Excisão de fragmento de ligamento suspensório por meio de punch para biópsia....	25
Figura 3.	Fragmento retirado do ligamento suspensório para indução de lesão.....	26
Figura 4.	a- Área tricotomizada para colheita de tecido adiposo na região abaxial ao sacro, lado esquerdo; b- colheita de tecido adiposo após troca da lâmina de bisturi.....	27
Figura 5.	Fotografia do ligamento suspensório equino. Observa-se lesão circular preenchida por coágulo sanguíneo. Essa lesão foi induzida por meio de punch para biópsia com 0,6 cm diâmetro, 48 horas antes do óbito.....	28
Figura 6.	Imagem digitalizada de exame ultra-sonográfico palmar transversal de membro torácico esquerdo equino. Observa-se no centro do ligamento suspensório, lesão induzida por meio de punch para biópsia de 0,6 cm diâmetro, 48 horas antes.....	29
Figura 7.	Imagem das células oriundas de tecido adiposo 10 dias após cultivo. Observa-se predominância de células com morfologia fibroblastóide característica de células tronco mesenquimais.....	29
Figura 8.	Médias (+ erro padrões) dos escores para presença de dor local em equinos submetidos a lesão do ligamento suspensório sem tratamento (GCN) ou tratados com solução fisiológica (GCP) ou terapia celular com medula óssea (GMO) ou células oriundas de tecido adiposo (GTA).....	30
Figura 9.	Médias ( $\pm$ erro padrões) dos escores para presença de edema no local da lesão, em equinos submetidos a lesão do ligamento suspensório sem tratamento (GCN) ou tratados com solução fisiológica (GCP) ou terapia celular com medula óssea (GMO) ou células oriundas de tecido adiposo (GTA). * No mesmo grupo, diferente do valor registrado no dia 0, $P < 0,05$ .....	31
Figura 10.	Médias ( $\pm$ erro padrões) das medidas do perímetro dos membros, no local da lesão, em equinos submetidos a lesão do ligamento suspensório sem tratamento (GCN) ou tratados com solução fisiológica (GCP) ou terapia celular com medula óssea (GMO) ou células oriundas de tecido adiposo (GTA).....	32
Figura 11.	Médias ( $\pm$ erro padrões) dos escores para presença de aumento de temperatura local em equinos submetidos a lesão do ligamento suspensório sem tratamento (GCN) ou tratados com solução fisiológica (GCP) ou terapia celular com medula óssea (GMO) ou células oriundas de tecido adiposo (GTA). * No mesmo grupo, diferente do valor registrado no dia 0, $P < 0,05$ .....	33
Figura 12.	Médias ( $\pm$ erro padrões) dos escores da intensidade de cor cinza na área da lesão	

	de equinos submetidos a lesão do ligamento suspensório sem tratamento (GCN) ou tratados com solução fisiológica (GCP) ou terapia celular com medula óssea (GMO) ou células oriundas de tecido adiposo (GTA).....	34
Figura 13.	Médias ( $\pm$ erro padrões) para intensidade mínima de cor cinza na área da lesão de equinos submetidos a lesão do ligamento suspensório sem tratamento (GCN) ou tratados com solução fisiológica (GCP) ou terapia celular com medula óssea (GMO) ou células cultivadas oriundas de tecido adiposo (GTA).....	35
Figura 14.	Médias ( $\pm$ erro padrões) dos escores para intensidade máxima de cor cinza na área da lesão de equinos submetidos a lesão do ligamento suspensório sem tratamento (GCN) ou tratados com solução fisiológica (GCP) ou terapia celular com medula óssea (GMO) ou células cultivadas oriundas de tecido adiposo (GTA). * Diferem entre si, $P < 0,05$ .....	36
Figura 15.	Médias ( $\pm$ erro padrões) dos valores para área da lesão de equinos submetidos a lesão do ligamento suspensório sem tratamento (GCN) ou tratados com solução fisiológica (GCP) ou terapia celular com medula óssea (GMO) ou células cultivadas oriundas de tecido adiposo (GTA).....	37
Figura 16.	Médias ( $\pm$ erro padrões) do diâmetro de Ferret da lesão de equinos submetidos a lesão do ligamento suspensório sem tratamento (GCN) ou tratados com solução fisiológica (GCP) ou terapia celular com medula óssea (GMO) ou células cultivadas oriundas de tecido adiposo (GTA).....	38
Figura 17.	Médias ( $\pm$ erro padrões) dos perímetros das lesões de equinos submetidos a lesão do ligamento suspensório sem tratamento (GCN) ou tratados com solução fisiológica (GCP) ou terapia celular com medula óssea (GMO) ou células cultivadas oriundas de tecido adiposo (GTA).....	39
Figura 18.	Médias ( $\pm$ erro padrões) das áreas dos ligamentos de equinos submetidos a lesão do ligamento suspensório sem tratamento (GCN) ou tratados com solução fisiológica (GCP) ou terapia celular com medula óssea (GMO) ou células cultivadas oriundas de tecido adiposo (GTA). * Diferem entre si, $P < 0,05$ .....	40
Figura 19.	Médias ( $\pm$ erro padrões) das áreas percentual de lesão dos ligamentos de equinos submetidos a lesão do ligamento suspensório sem tratamento (GCN) ou tratados com solução fisiológica (GCP) ou terapia celular com medula óssea (GMO) ou células cultivadas oriundas de tecido adiposo (GTA).....	41

---

#### LISTA DE ABREVIATURAS

---

ASC	Células tronco derivadas de tecido adiposo
CT	Células tronco
CTA	Células tronco adultas
CTM	Células tronco mesenquimais
CTS	Células tronco somáticas
GCN	Grupo controle negativo
GCP	Grupo controle positivo
GMO	Grupo medula óssea
GTA	Grupo tecido adiposo
LS	Ligamento suspensório
MEC	Matriz extra celular
MMPs	Metaloproteinases
MO	Medula óssea
RPMI	Roswell Park Memorial Institut
TA	Tecido adiposo
TGF $\beta$ 1	Fator de crescimento $\beta$ 1
TIMPs	Inibidores teciduais das metaloproteinases
UFC	Unidade formadora de colônia

---

**LISTA DE ANEXOS**

---

Anexo 1.	Escores para presença de dor local em eqüinos submetidos a lesão no ligamento suspensório por meio de punch para biópsia de 0,6 mm sem tratamento (GCN) ou tratados com solução fisiológica (GCP) ou terapia celular com medula óssea (GMO) ou células oriundas de tecido adiposo (GTA).....	49
Anexo 2.	Escores para presença de edema no local da lesão em eqüinos submetidos a lesão no ligamento suspensório por meio de punch para biópsia de 0,6 mm sem tratamento (GCN) ou tratados com solução fisiológica (GCP) ou terapia celular com medula óssea (GMO) ou células oriundas de tecido adiposo (GTA).....	49
Anexo 3.	Perímetro dos membros, no local da lesão, em eqüinos submetidos a lesão no ligamento suspensório por meio de punch para biópsia de 0,6 mm sem tratamento (GCN) ou tratados com solução fisiológica (GCP) ou terapia celular com medula óssea (GMO) ou células oriundas de tecido adiposo (GTA).....	50
Anexo 4.	Escores para presença de aumento de temperatura no local da lesão em eqüinos submetidos a lesão no ligamento suspensório por meio de punch para biópsia de 0,6 mm sem tratamento (GCN) ou tratados com solução fisiológica (GCP) ou terapia celular com medula óssea (GMO) ou células oriundas de tecido adiposo (GTA).....	50
Anexo 5.	Anexo 5. Imagens digitalizadas de exames ultra-sonográficos do tipo palmar transversal de membro torácico direito do eqüino número 1. Observa-se na primeira imagem (a) o ligamento suspensório antes da indução da lesão. As imagens seguintes apresentam no centro do ligamento suspensório, lesão induzida por meio de punch para biópsia de 0,6 cm diâmetro aos 3 dias (b), 8 dias (c), 12 dias (d), 17 dias (e), 30 dias (f), 42 dias (g), 54 dias (h), 66 dias (i) e 77 dias (j) após a indução da lesão.....	52

## RESUMO

Para avaliar dois protocolos de terapia celular no reparo de lesões do ligamento suspensório, um com células oriundas de medula óssea e outro com células cultivadas oriundas de tecido adiposo, utilizaram-se seis eqüinos. Foi induzida lesão no ligamento suspensório nos quatro membros de todos os animais. Essa lesão foi obtida cirurgicamente por meio de penetração de punch para biópsia com 0,6cm de diâmetro. Cada membro de cada animal recebeu um tipo de tratamento: injeção de soro fisiológico no grupo controle positivo (GCP), de células cultivadas oriundas de tecido adiposo (GTA), de células colhidas de medula óssea (GMO), ou nenhuma injeção no grupo controle negativo (GCN). Os animais foram avaliados clinicamente e por ultra-sonografia por um período de 77 dias. O método utilizado promoveu lesões homogêneas e facilmente identificáveis ao ultra-som, sem interferir significativamente na locomoção ou alimentação dos animais, demonstrando ser um modelo adequado ao estudo do reparo do ligamento suspensório. As alterações clínicas foram de discretas a leves e não diferiram entre grupos ( $P > 0,05$ ). Houve aumento na área do ligamento nesse período (recente em GCN e tardio em GMO e GTA), contudo não se observaram alterações significativas nas dimensões e na ecogenicidade das lesões. Apesar dos exames clínicos e ultra-sonográficos utilizados não mostrarem diferenças entre grupos no período estudado, novos estudos utilizando o tecido colhido serão necessários para verificar qualquer possível efeito dos tratamentos. Conclui-se que o método utilizado foi eficiente em induzir lesões ligamentares sem afetar significativamente a saúde dos cavalos e que as terapias celulares empregadas não produziram reações clínicas adversas quando comparados aos controles.

**Palavras-chave:** eqüinos, ligamento suspensório, células da medula óssea, células do tecido adiposo

## ABSTRACT

*The aim of this study was to evaluate two protocols of cellular therapy in suspensory ligament repair, one using cells from bone marrow and the other using cells from adipose tissue. The lesion in the suspensory ligament was surgically produced with a biopsy punch with 0.6cm diameter, in six horses. A different treatment was applied in each leg of all horses as follow: injection of 0,9% NaCl isotonic saline in the positive control group (GCP), cells originated by adipose tissue culture (GTA) or cells from bone marrow, or even no kind of treatment (GCN). Horses were evaluated by clinical and ultrasonografic examination for a 77-days period. The method induced homogenous lesions that were easily identified by ultrasound. No effect on animal locomotion and feeding was observed. There were mild clinical alterations, not different among groups or times of observation ( $P > 0,05$ ). An increase in the ligament was observed early in GCN and later in GMO and GTA groups, however there were no significant changes in dimensions and echogenicity of the lesions. Although the physical and ultrasonografic exams did not show any differences among groups, other further studies using the collected tissue were necessary to evaluate any possible effect of the treatments. In conclusion, the method was considered effective in producing ligament lesions without significant effects in horse's health and the therapeutic cellular protocols used did not produced clinical adverse effects compared to the control groups.*

**Key-words:** *cells, bone marrow, adipose tissue, suspensory ligament, ultrasound*

## 1. INTRODUÇÃO

A indústria equina tem se mostrado um setor importante do agronegócio brasileiro. Nos últimos anos tem crescido e movimentado grandes valores financeiros, sejam diretamente pela comercialização de animais de esporte, trabalho e exportação como alimento, ou indiretamente pelos insumos necessários para a criação e utilização, como rações, vacinas, selas, dentre outros (Souza, 1999).

Além da importância econômica, os equinos têm desempenhado função fundamental no lazer das pessoas, principalmente nos grandes centros urbanos, onde o estresse faz parte do cotidiano, sendo o esporte equestre uma forma de aliviar essas tensões (Souza, 1999). Outra atividade que tem crescido ultimamente é a equoterapia, que é um método terapêutico e educacional que utiliza o cavalo dentro de uma abordagem interdisciplinar, nas áreas de saúde, educacional e equitação, buscando o desenvolvimento biopsicossocial de pessoas portadoras de deficiência e/ou com necessidades especiais (Ande, 2002).

O estudo das claudicações em equinos é uma das áreas de maior importância para a espécie, uma vez que os problemas do sistema locomotor estão entre os mais frequentes entre os equinos. Dentre as afecções mais comuns do sistema locomotor, destaca-se a desmíte do suspensório. Esta é uma enfermidade que acomete tanto os membros torácicos quanto os pélvicos dos cavalos atletas, sendo classificada como proximal, intermédica e distal. Por meio dessa, grandes perdas econômicas podem ocorrer já que o animal pode diminuir sua performance mesmo antes que os sintomas clínicos se tornem evidentes. Além disso, durante o tratamento o animal necessita de repouso, ficando assim, afastado de competições e treinamento por um longo período de tempo.

Apesar de vários tratamentos terem sido utilizados para a desmíte do suspensório, o prognóstico dessa afecção ainda é considerado como reservado para o retorno à atividade atlética. Recentemente, tratamentos baseados no potencial de células tronco e fatores de crescimento em melhorar o reparo tecidual têm atraído a atenção de veterinários atuantes na

clínica de equinos atletas e pesquisadores no tratamento de tendinites e desmites. Assim, protocolos com o uso da fração celular da medula óssea a fresco (Barreira, 2005) e de células mesenquimais oriundas de tecido adiposo (VET STEM, 2007) vem sendo desenvolvidos.

O objetivo deste trabalho foi comparar o efeito de dois protocolos de terapia celular autóloga (células cultivadas do tecido adiposo ou células oriundas de medula óssea) no reparo de lesões do ligamento suspensório de equinos

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

Durante a filogênese, os membros dos equinos sofreram uma adaptação especial para se movimentarem em alta velocidade, incluindo uma simplificação de sua extremidade distal em um único e forte dedo, redução dos componentes musculares da extremidade distal dos membros e desenvolvimento de ligamentos acessórios que reforçam o comportamento passivo e automático dos membros. Os tendões e ligamentos dos equinos se tornaram estruturas anatômicas fortes que suportam carga e tensão altas, tanto com o animal parado como em movimento (Denoix, 1994).

As lesões tendíneas e ligamentares ocorrem com alta frequência nos cavalos atletas gerando grandes prejuízos à indústria equina. Das lesões tendíneas a de maior frequência é a tendinite do tendão flexor digital superficial com uma prevalência de 8 a 30% nos cavalos Puro Sangue Inglês de corrida. Um outro ponto importante é sua alta taxa de recorrência pós tratamento, em torno de 43 a 93% (Dahlgren, 2005).

Entre as lesões ligamentares, a de maior incidência é a desmíte do ligamento suspensório. Alguns autores consideram que essa seja a maior causa de claudicação e perda da função nos cavalos atletas (Herthel, 2001).

Vários são os tratamentos preconizados para essas lesões. Rotineiramente, são empregados anti-inflamatórios locais e/ou sistêmicos; injeções intralesionais de glicosaminoglicanos como o ácido aradônico (Reeding, 1998), que foi retirado do mercado; além de métodos

fisioterapêuticos como crioterapia, ultra-som, laser e, mais recentemente, a terapia por ondas de choque extracorpórea (Caminoto, 2003). No entanto, nenhum destes promove uma melhora na qualidade ou rapidez do reparo.

Recentemente, com a descoberta do potencial de diferenciação das células-tronco, tem-se explorado sua aplicação terapêutica em enfermidades complexas ou lesões de difícil reparo. A célula-tronco tem a capacidade de gerar diferentes tipos celulares e reconstituir diversos tecidos. Ela apresenta a propriedade de auto-renovação, ou seja, gerar uma cópia idêntica a si mesma (Raimondo et al., 2006).

## 2.1. Características morfológicas dos ligamentos

Em termos gerais, a morfologia estrutural dos ligamentos e tendões é semelhante. Ambos são compostos de células imersas em uma matriz extracelular (MEC). Os tenoblastos e tenócitos correspondem a 90 a 95% dos elementos celulares do tendão. Os primeiros são células tendíneas imaturas, compostas de numerosas organelas citoplasmáticas refletindo sua alta atividade metabólica. Com a maturidade, se tornam alongados e se transformam em tenócitos. Esses apresentam um menor número de organelas, caracterizando assim, uma diminuição de sua atividade metabólica. São eles os responsáveis pela síntese do colágeno e

de todos os componentes da MEC, além de fornecerem energia. O restante, de 5 a 10%, dos elementos celulares são os condrócitos dos ossos e locais de inserção, células sinoviais da bainha tendínea e células vasculares do endotélio capilar e da musculatura lisa das arteríolas (Sharma e Maffulli, 2006; Hoffmann e Gross, 2007).

A MEC consiste predominantemente de fibras colágenas paralelas interpostas entre as células, além de pequenos vasos sanguíneos, tecido conjuntivo frouxo, elastina, glicosaminoglicanos e proteoglicanos. A distribuição e proporção de células em relação à matriz diferem entre os tendões flexores e ligamento suspensório. Há uma influência recíproca entre as células e a MEC, já que são as células que mantêm a matriz (Goodship et al., 1994).

O colágeno e a elastina formam o componente fibroso que fornece a principal resistência tênsil dos tendões e ligamentos (Goodship et al., 1994).

A matéria seca de tendões humanos é aproximadamente 30% da massa total dos tendões, sendo o restante 70% composto de água. O colágeno tipo I representa 65-80%, e a elastina corresponde por aproximadamente 2% da matéria seca dos tendões (Sharma e Maffulli, 2006).

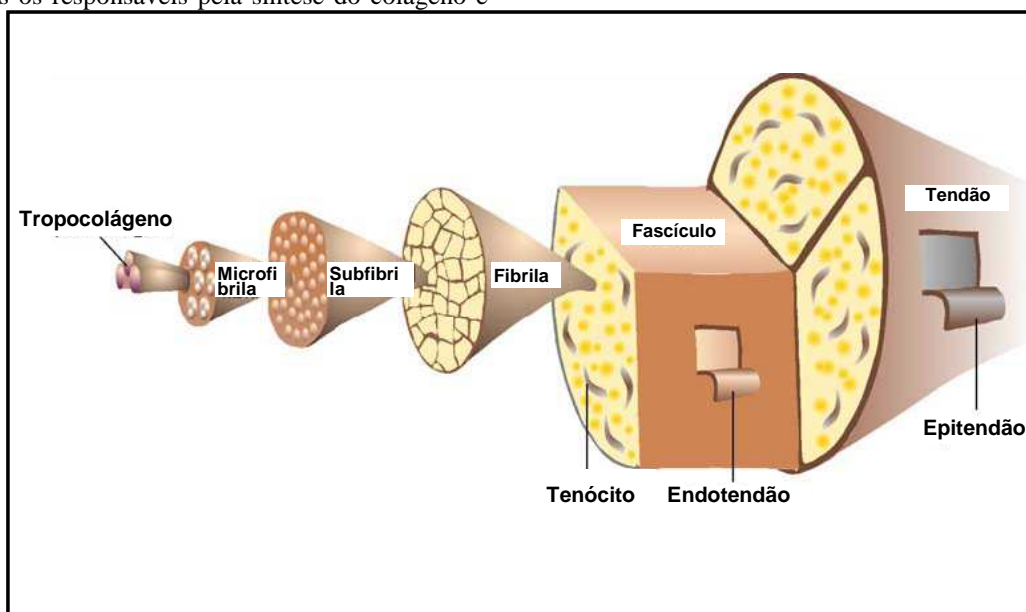


Figura 1. Estrutura organizacional dos tendões

Fonte: Adaptado de Hoffman e Gross, 2007.

O colágeno tipo I pode ser encontrado em todos os locais onde se encontram as fibras colágenas como tendões, fáscia, órgãos capsulados, camada adventícia dos vasos sanguíneos, epineuro entre outros. O colágeno tipo II, está relacionado à cartilagem elástica e hialina. O tipo III está presente em todas as estruturas nas quais as fibras de reticulina estão presentes (Montes, 1996).

Quando seções de tendões ou ligamento são vistos à microscopia de polarização, as fibras colágenas aparecem como uma alternância de bandas claras e escuras. Isto ocorre, pois as fibras têm um aspecto ondulado quando relaxadas. Tanto o comprimento de onda como o ângulo da ondulação pode variar entre as fibras e fibrilas, significando que algumas fibrilas podem se estender antes de outras quando o tendão for esticado. Assim, quando ocorrer uma máxima extensão, haverá uma ruptura parcial de fibras, o que acontece em muitos casos de tendinite. Ao microscópio eletrônico, em corte transversal, as fibras colágenas apresentam um formato circular. Nos animais de desenvolvimento rápido, como os cavalos, essas fibras tem um aspecto bi ou trimodal logo ao nascimento. Isso significa que os potros nascem com fibras colágenas pequenas, médias e grandes (Goodship et al., 1994).

Nos estágios precoces de reparo após uma lesão, as fibras são predominantemente de pequeno diâmetro e a mudança para um padrão normal de um cavalo adulto ocorre com a maturação cicatricial. Isso significa que as fibras mais finas são mecanicamente mais fracas que as mais largas. Assim, a elasticidade tecidual aumenta com o tempo, pois há um aumento no diâmetro da fibra e no número de ligações transversais. Dessa forma, um longo período de tempo é necessário para o tendão chegar à sua resistência máxima após uma lesão (Goodship et al., 1994).

Os tendões, assim como outras estruturas colágenas, apresentam uma característica não linear no seu gráfico de deformação. Inicialmente ocorrem grandes extensões para um pequeno aumento na carga, resultando em uma deformação não linear. Isto é seguido de uma região linear na qual cada aumento na carga resulta em um aumento equivalente na

extensão. Nessas regiões o tendão se recupera logo que a carga for removida, sem que ocorra danos teciduais, isto é, ele se comporta de forma elástica. Assim, se carregado e descarregado de forma cíclica, alguma energia será perdida na forma de calor da mesma forma que ocorre em tiras de borracha quando são esticadas repetidas vezes (Goodship, 1993).

Quanto maior a carga aplicada, ocorrem mudanças não lineares, de modo que uma extensão maior que a esperada ocorre para um dado aumento de carga. O ponto no qual isso ocorre é denominado de tensão de escoamento e indica danos à estrutura. Toda carga que ultrapassar a tensão de escoamento, ocorrerá deformação plástica e causará danos estruturais irreversíveis. Um aumento continuado na carga resultará em uma falha estrutural completa com ruptura do tendão (Butler et al., 1978).

Estudos têm mostrado que a magnitude de extensão de tendões flexores digitais superficiais em equinos é de 16%. Portanto, uma margem segura para um máximo de desempenho é muito pequena, e é por isso, que são encontradas tantas lesões nestes tendões. Cavalos de corrida tendem a ter mais lesões nos tendões flexores digitais superficiais e os animais trotadores nos ligamentos suspensórios (Stephens et al., 1989).

Nos tendões de um adulto normal há um predomínio do colágeno tipo I (95%) com uma pequena proporção dos tipo III e V associados com os vasos intra-tendíneos. Os colágenos tipo I e III são bastante semelhantes e formam fibras com a mesma periodicidade das bandas. Porém o diâmetro de suas fibras difere sendo a tipo III a de menor diâmetro e a tipo I a mais calibrosa. É a proporção destes dois tipos de colágeno que determina as propriedades mecânicas do tecido (Goodship et al., 1994).

## **2.2. Fisiopatologia da lesão e reparação ligamentar**

A fisiopatologia das lesões de tendões e ligamentos é foco de interesse de pesquisadores tanto em medicina humana como na medicina veterinária. Existe um equilíbrio entre os processos anabólicos e catabólicos que ocorrem

nos tendões e ligamentos normais. Em condições fisiológicas do exercício, os fibroblastos do parênquima de tendões e ligamentos mantêm um equilíbrio entre a decomposição da MEC danificada e a produção de proteínas de reposição. Esse balanço é mantido por dois grupos de proteínas: as metaloproteinases (MMPs) da matriz e os inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs). As MMPs são uma família de enzimas proteolíticas que degradam a MEC facilitando a remodelação, sendo essencial na manutenção e reparo tecidual (Dahlgren, 2007).

Assim, qualquer alteração mecânica nas células irá influenciar seu metabolismo, que por sua vez, irá interferir de forma direta no suprimento sanguíneo, alterando o fluxo de sangue e de nutrientes entre os tecidos que modulam a síntese da matriz pelas células (Goodship et al., 1994).

O consumo de oxigênio pelos tendões e ligamentos é 7,5 vezes menor que os músculos esqueléticos. Devido à baixa taxa metabólica e a sua capacidade de gerar energia anaeróbia bem desenvolvida, os tendões são capazes de suportar cargas e manter tensão por longos períodos, evitando o risco de isquemia e subsequente necrose. Entretanto, uma baixa taxa metabólica resulta em lenta cicatrização após lesão (Sharma e Maffulli, 2006).

Portanto, quando a intensidade do exercício excede o limite do tecido ou quando a natureza repetitiva das cargas danifica a MEC numa proporção que supera aquela na qual as células podem se manter com o reparo, as injúrias se acumulam e se manifestam clinicamente. Assim, se os fibroblastos do tendão ou ligamento falham em se adaptar ao aumento do estresse mecânico, um desequilíbrio se desenvolve entre síntese e degradação de matriz, resultando nos sinais clínicos da lesão. Vários fatores são importantes na etiologia das lesões tendíneas e ligamentares como, estresse mecânico, hipertermia no centro do tendão e o baixo fluxo sanguíneo na região, resultando em hipóxia e produção dos radicais livres de oxigênio dentro do tendão durante o exercício (Dahlgren, 2007).

A resolução de lesões de ligamentos e tendões, geralmente falha em restaurar as características morfológicas e funcionais da estrutura. Isso pode comprometer o desempenho futuro do animal ou predispor a um aumento no risco de recorrência de lesões (Goodship et al., 1994).

Qualquer lesão no tendão ou ligamento, seja por sobrecarga ou trauma, resulta em hemorragia e inflamação local. As células inflamatórias são recrutadas e a cicatrização ocorre, como em outras feridas, com a formação de um coágulo de fibrina e recrutamento de fibroblastos (Madison, 1995).

A cicatrização do tendão pode ocorrer intrinsecamente pela proliferação dos tenócitos do endotendão e epitendão ou extrinsecamente pela invasão de células da bainha e sinóvia. Os tenoblastos do epitendão iniciam o processo de reparo por sua proliferação e migração. Esses tenoblastos e os tenócitos sintetizam colágeno durante o reparo, assim, diferentes tipos celulares produzem diferentes tipos de colágeno em diferentes momentos. Inicialmente o colágeno é produzido pelas células do epitendão e, mais tardiamente, são as células do endotendão que o sintetizam. A contribuição de cada tipo celular vai variar. As células da bainha tendínea produzem menos colágeno e glicosaminoglicanos quando comparadas às células do epitendão e endotendão. Entretanto, os fibroblastos da bainha do tendão flexor se proliferam mais rapidamente (Sharma e Maffulli, 2006).

A cicatrização intrínseca resulta em um restabelecimento biomecânico e menos complicações. O mecanismo de deslizamento tendíneo dentro da bainha fica preservado. Com a cicatrização extrínseca há formação de aderências que dificultam o deslizamento tendíneo (Sharma e Maffulli, 2006).

É na fase final do processo de cicatrização que deve-se ter o maior cuidado numa tentativa de impedir a formação dessas aderências. A fase crítica para o retorno da capacidade atlética do animal se inicia por volta de 6 semanas pós lesão e progride por um período de 6 a 12 meses ou mais. É durante esse período que as fibras colágenas se tornam mais paralelas ao longo do eixo do tendão e as ligações cruzadas entre as

moléculas de colágeno promovem uma melhor resistência tecidual. Assim, após 12 meses, o tendão ou ligamento ainda necessita adquirir as propriedades mecânicas do seu tecido original, isto é, antes de ocorrer a lesão. Por isso, é de fundamental importância o monitoramento desses animais durante a fase de recuperação da lesão, pois esses animais apresentam grande predisposição a uma nova lesão (Dahlgren, 2007).

### 2.3. O ligamento suspensório

O músculo interósseo médio é denominado de ligamento sesamóide superior ou ligamento suspensório (LS). Ele contém pouco tecido muscular, sendo transformado, em grande parte, em uma faixa tendínea (*tendo interosseus*), bifurcada distalmente (Getty, 1986; Wilson et al., 1991).

A principal função do LS é evitar a extensão excessiva da articulação metacarpofalangeana/metatarsofalangeana (Getty, 1986; Wilson et al., 1991; Dyson et al., 1995) durante o apoio completo do membro e limitar a flexão das articulações interfalangeanas durante determinadas fases do passo por meio dos ramos extensores (Dyson et al., 1995).

Existem poucas informações sobre a estrutura interna do LS e as diferenças existentes entre os membros torácicos e pélvicos. Há também uma quantidade variável (entre 2,1 a 11%) de tecido muscular estriado, especialmente no centro do LS e em animais mais jovens, que tende a ser simétrica bilateralmente (Dyson et al., 1995) além da presença de tecido gorduroso (Riemersma e Bruyn, 1986). Predisposição genética, desuso e a idade parecem ser fatores que podem diminuir o conteúdo muscular do LS (Wilson et al., 1991).

Nos membros torácicos, o LS é mais largo, relativamente chato e mais curto, quando comparado com o LS dos membros pélvicos que são mais finos, arredondados e longos (Wilson et al., 1991).

Nos membros torácicos, o LS se origina a partir do ligamento carpal palmar e da borda proximal palmar do terceiro osso metacarpiano.

Mantém assim, uma relação direta com a cápsula das articulações intercárpica média e carpometacárpica. Nos membros pélvicos sua origem é na borda proximal plantar do terceiro osso metatarsiano, relacionando intimamente com a cápsula da articulação tarsometársica (Denoix, 1994).

O corpo do LS segue distalmente entre o segundo e quarto ossos metacarpianos/metatarsianos, no sulco metacárpico/metatársico e gradualmente se separa da face palmar/plantar do terceiro metacarpiano/metatarsiano. A partir daí se divide em ramos. Essa divisão pode ocorrer na região média ou no quarto distal do metacarpo/metatarso (Denoix, 1994).

Os ramos do LS se inserem nas superfícies abaxiais dos ossos sesamóides correspondentes. Cada ramo emite um fino ramo extensor dorsodistalmente que cruza obliquamente o eixo da falange proximal e se une ao tendão extensor digital comum, logo acima da articulação interfalangeana proximal. Cada ramo extensor se une, proximalmente, com seu ligamento sesamoideano colateral correspondente, formando uma pequena bursa subligamentar entre o ramo extensor e a região proximal-lateral da falange proximal (Denoix, 1994).

### 2.4. Exame do ligamento suspensório

O método de avaliação do LS consiste de palpação, de além de exames ultra-sonográficos, radiográficos, cintilografia (Dyson et al., 1995). A região proximal do LS não pode ser palpada pois essa se situa entre as bases do segundo e quarto ossos metacarpianos ou metatarsianos. Entretanto, pressão pode ser aplicada em sua região palmar ou plantar. Normalmente, o LS é denso em toda sua extensão. Seus ramos lateral e medial são uniformes e de tamanho semelhante (Dyson et al., 1995).

Nos últimos anos o diagnóstico de desmíte do suspensório tem aumentado devido à utilização de técnicas diagnósticas como analgesia local e ultra-sonografia. O uso de radiografias não é útil para detectar desmíte de suspensório, porém, ela tem a função de diagnóstico diferencial de lesões ósseas como fratura da cortical plantar do

terceiro metatarsiano ou fratura por avulsão na origem do LS (Crowe et al., 2002).

Várias técnicas de bloqueio anestésico regional foram descritas para diagnosticar afecções no LS. O bloqueio anestésico em quatro pontos altos é aplicado rotineiramente. Ele consiste na infiltração de anestésico local nos sulcos entre o tendão flexor digital profundo e o LS, atuando, assim, nos nervos digitais palmares e metacarpianos (Keg et al., 1996; Castro et al., 2005).

#### **2.4.1. Exame ultra-sonográfico**

O exame ultra-sonográfico foi introduzido na medicina equina no início da década de 80, desde então, tem sido uma ferramenta essencial no diagnóstico de claudicações de origem tendínea ou ligamentar. Apesar de inicialmente ter o propósito diagnóstico, tem sido também utilizado no acompanhamento de evolução de lesões e para monitorar a recuperação (Van Schie et al., 1998).

Mesmo com o advento da ressonância magnética (Whitcomb, 2004), a ultra-sonografia continua sendo o exame de primeira escolha para diagnosticar e caracterizar lesões tendíneas e ligamentares nos equinos (Denoix, 1994; Whitcomb, 2004). Porém, para um diagnóstico acurado é necessária uma boa qualidade da imagem além do conhecimento acurado da anatomia topográfica e ultra-sonográfica (Denoix, 1994; Whitcomb, 2004).

A ecogenicidade do LS geralmente é simétrica bilateralmente, porém varia entre os cavalos (Dyson et al., 1995; Whitcomb, 2004). O corpo do LS pode ser melhor examinado sem o auxílio do *stand-off* na face palmar ou plantar do membro, entretanto, a avaliação dos seus ramos lateral e medial deve ser realizada com o auxílio desse aparato (Dyson et al., 1995).

As lesões de tendões e ligamentos promovem mudanças na ecogenicidade. Em estruturas normais, a reflexão especular ocorre nas interfaces das fibras. Para cada estrutura, a perda da intensidade da ecogenicidade normal pode ser causada por interrupção nas fibras e processos inflamatórios (edema, hemorragia,

infiltrado celular) nos estágios iniciais. Durante o processo de cicatrização, fibroplasia e desalinhamento de fibras também diminui a ecogenicidade de tendões e ligamentos. Imagens hiperecóticas podem aparecer nos casos de tecido fibroso, calcificação e metaplasia óssea ou cartilaginosa (Denoix, 1994).

De acordo com a aparência ultra-sonográfica, as lesões são classificadas de grau I a IV, sendo de grau I as lesões que aparecem como áreas mais levemente hipocóticas do que a região do tendão que não foi acometido, as fibras apresentam ruptura mínima. Nas lesões de grau II, metade da área está ecogênica e metade está anecótica, há um maior grau de danos fibrilares. No grau III o aspecto anecótico das lesões é maior. Já as lesões de grau IV são totalmente anecóticas. Elas apresentam áreas negras significando ruptura total de fibras com formação de hematoma intratendíneo (McDiarmid, 1995).

#### **2.5. Afecções do ligamento suspensório**

Entre as lesões ligamentares, a desmíte do suspensório é uma das maiores causas de claudicação nos cavalos atletas (Cowles, 2000). Segundo McClure e Evans (2002), a desmíte do suspensório promove claudicação primária ou compensatória, diminuindo o desempenho do animal antes mesmo dele começar a claudicar. Para Jackman (2001), a desmíte do suspensório é uma lesão comum nos membros anteriores de cavalos de rédeas e apartação.

Uma das causas prováveis de desmíte do suspensório seria um exercício físico excessivo para um animal pouco condicionado. Além disso, a conformação também pode contribuir. A precocidade que os cavalos iniciam o treinamento parece ser a maior causa. Como prevenção foi citado, como mais importante, um condicionamento adequado para o tipo de exercício ao qual o animal é submetido, a conformação como sendo um segundo fator importante e um ferrageamento adequado como o terceiro fator (Cowles, 2000).

A região do LS mais acometida por desmíte no membro torácico está 6 a 18 cm distal ao osso acessório do carpo e, no membro pélvico, 15 a 24 cm distal à tuberosidade do calcâneo

(Cowles, 2000). De acordo com Jackman (2001), as lesões de LS geralmente ocorrem em sua região proximal e, em menor grau, nos seus ramos distais.

Clinicamente, as lesões do LS podem ser divididas em três regiões distintas: lesões restritas ao seu terço proximal (desmíte proximal do LS), lesões no terço médio (lesões no corpo) e lesões nos ramos lateral e medial (lesões do ramo) (Dyson et al., 1995).

O tratamento consiste em repouso, casqueamento corretivo, antiinflamatório não esteróide sistêmico e, ocasionalmente, injeção local de corticóides na lesão proximal do suspensório. A duração do repouso varia de acordo com anormalidades ao ultra-som, grau de claudicação e ultra-sonografias subseqüentes que monitorarão o edema. Na maioria dos casos, repouso por 60 dias é recomendado, podendo o animal começar a ser puxado pelo cabresto duas semanas após o exame (Jackman, 2001). Mesmo com tratamento adequado, o índice de recorrência varia de 20% para os membros torácicos e 65% para os membros pélvicos (Cowles, 2000).

Para uma recuperação satisfatória repouso e exercício controlado são essenciais. Pode-se também aplicar blíster com iodo e óleo de amendoim, injeção de medula óssea na lesão e neurectomia tibial nos membros posteriores, ou fasciotomia com neurectomia do ramo profundo do nervo plantar lateral. O prognóstico para desmíte de suspensório dos posteriores é reservado (Crowe et al., 2002).

Devido à baixa eficácia dos tratamentos e ao alto índice de recidiva associado à descoberta do potencial terapêutico das células-tronco iniciaram-se os primeiros estudos sobre a aplicabilidade da terapia celular no tratamento das desmites do suspensório dos eqüinos.

## 2.6. Células-tronco

A terminologia “célula-tronco” é uma tradução do inglês “*stem cell*”. *Stem* significa caule, haste. O verbo “*to stem*” quer dizer originar (Iglézias, 2004; Del Carlo, 2005). Assim, células-tronco (CT) têm essa denominação por

ser um tronco comum do qual se originam outras células (Iglézias, 2004). Essa versatilidade as tornam a grande promessa para o tratamento de doenças graves como problemas cardíacos, câncer, disfunções neurológicas, distúrbios hepáticos e renais, osteoporose entre outras (Mayhall et al., 2004). Na medicina eqüina elas são uma grande promessa para o tratamento das lesões de tecido mole dos membros dos cavalos atletas.

A CT é uma célula que tem a capacidade de auto-renovação e se diferencia em um ou vários tipos celulares (Fuchs e Segre, 2000; Babinet e Mandelbaum, 2002; Presnell et al., 2002; Grove et al., 2004; Lerou e Daley, 2005; Raimondo et al., 2006). Elas são classificadas, de acordo com o seu potencial de se desenvolver, em totipotentes, capazes de se diferenciar em todos os tipos celulares existentes nos vários tecidos do indivíduo completamente formado ou desenvolvido; pluripotentes, capazes de se diferenciar em quase todos os tipos de tecidos embrionários, exceto placenta e anexos embrionários; multipotentes, originam um menor número de linhagens celulares; oligopotentes, originam um número ainda menor de células quando comparadas às multipotentes; e unipotentes, que se diferenciam em um único tipo celular (Wagers e Weissman, 2004).

A diferenciação dos tipos celulares está totalmente completa no momento ou logo após o nascimento. Ao longo da vida, vários tecidos do indivíduo adulto se renovam. Essa renovação ocorre graças à existência das células-tronco adultas (CTA) (Fuchs e Segre, 2000). Essas células são ativadas e recrutadas em resposta aos sinais oriundos de tecidos lesados no organismo (Presnell et al., 2002).

Tradicionalmente, considera-se que as CTA têm potencial limitado, embora sejam capazes de produzir variedades dentro de sua própria linhagem (Soares, 2005). Segundo Cookson (2005), a terminologia CTA é adequada quando a fonte é realmente um adulto, mas enganador quando, como é comum, as células vêm de um bebê ou de um feto. O emprego da terminologia CT somática seria mais adequada a essas células.

A célula-tronco somática (CTS) é uma célula multipotente indiferenciada encontrada entre as células diferenciadas que fazem parte de um tecido ou órgão (Grove et al., 2004) cuja função é manter e reparar o tecido nos quais são encontradas (Shenfield et al., 2002; Grove et al., 2004). Essa propriedade de auto-renovação, isto é, de se diferenciar e originar vários tipos celulares do tecido no qual residem (Fuchs e Segre, 2000; Grove et al., 2004) ocorre diante de sinais específicos do meio ambiente (Fuchs e Segre, 2000).

Até o momento, as CTS mais estudadas são as da medula óssea. Elas apresentam pelo menos dois tipos de CTS. Um deles são as células-tronco hematopoiéticas e o outro as células-tronco mesenquimais (CTM) (Grove et al., 2004).

As células-tronco hematopoiéticas são células de auto-renovação que produzem progenitoras que se diferenciam em várias células sanguíneas maduras como eritrócitos, linfócito B, linfócito T, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, monócitos, macrófagos e plaquetas (Grove et al., 2004).

As CTM se localizam na medula óssea e em outros tecidos como o adiposo. Na presença de um estímulo apropriado, elas se diferenciam *in vitro* e *in vivo* em adipócitos, condrócitos, osteoblastos (Grove et al., 2004; Smith e Webbon, 2005), tenócitos, fibroblastos e miofibroblastos (Smith e Webbon, 2005).

Injeções de CT derivadas do tecido adiposo já estão ganhando popularidade como forma de acelerar a recuperação de lesões ósseas e da cartilagem de cavalos. Para certas aplicações em seres humanos, essas células também podem ser mais fáceis de colher do que as mesenquimais presentes na medula óssea. No entanto, tem sido demonstrado que o vigor celular diminui à medida que as pessoas envelhecem. Como, geralmente, é na senilidade que as pessoas mais necessitam que reparos sejam realizados em seu organismo as suas células já não poderiam mais serem utilizadas (Soares, 2005).

Outros tecidos que também apresentam CTA são o sangue periférico, fígado, trato gastrointestinal (Presnell et al., 2002), sistema nervoso periférico, pâncreas (Mayhall et al.,

2004), vasos sanguíneos, coração (Grove et al., 2004), e dente (Fuchs e Segre, 2000).

### **2.6.1. Células-tronco da medula óssea e do tecido adiposo**

A medula óssea (MO) tem sido a maior fonte para isolamento de CTM. Porém, a colheita da MO é um procedimento invasivo e o número, o potencial de diferenciação e o período de vida das CTM da MO diminuem com o aumento da idade (Kern et al., 2006).

Quando em cultura, as CTM da MO se aderem rapidamente ao frasco e podem ser separadas facilmente das células hematopoiéticas não aderentes. As colônias formadas são bastante heterogêneas, com várias taxas de crescimento, tamanho variado e diferente morfologia celular (Bianco et al., 2001).

O tecido adiposo (TA) é capaz de se expandir e se encolher de forma dinâmica ao longo da vida de uma pessoa. Esta propriedade é mediada pela presença de células vasculares e não vasculares que produzem uma quantidade de células progenitoras com capacidade regenerativa (Strem et al., 2005). Da mesma forma que a MO, o TA tem origem mesodérmica contendo uma população de células do endotélio microvascular, musculatura lisa e CT (Strem et al., 2005).

Assim, o TA é uma alternativa para obtenção de CTM menos invasiva e em maior quantidade que a MO. As células oriundas de TA e da MO possuem as características típicas das CTM: morfologia fibroblastóide, a formação de unidade formadora de colônia (UFC), a capacidade de diferenciação multipotencial e a expressão de um conjunto típico de proteínas de superfície (Kern et al., 2006).

As CT podem ser enzimaticamente digeridas do TA e separadas do sobrenadante de adipócitos por centrifugação. Uma população mais homogênea emerge em cultivo, nas mesmas condições de crescimento das CTM. Essa população chamada de células-tronco derivadas de tecido adiposo tem muitas características semelhantes à MO como potencial proliferativo

extenso e capacidade de diferenciação (Strem et al., 2005).

*In vitro*, as células-tronco derivadas de tecido adiposo se diferenciam em linhagens osteogênicas, adipogênicas, miogênicas e condrogênicas quando tratadas com fatores específicos (Zuk et al., 2002). Culturas desse tipo celular gera nódulos que produzem grande quantidade de moléculas de matriz extra-celular como proteoglicanos sulfatados, colágeno tipo II e IV (Strem et al., 2005).

### **2.6.2. Células-tronco e sua aplicabilidade no tratamento de lesões tendíneas e ligamentares nos membros dos eqüinos**

Devido à baixa eficácia dos tratamentos e ao alto índice de recidiva das lesões tendíneas e ligamentares associados à descoberta do potencial terapêutico das CT, iniciaram-se os primeiros estudos sobre a aplicabilidade da terapia celular no tratamento das tendinites e desmites (Barreira, 2005).

A princípio, são dois os benefícios da terapia celular. O primeiro é que a injeção de CTM na região danificada gera sua diferenciação em fibroblastos maduros do tendão ou ligamento, sinalizando a influência do tecido na produção de matriz apropriada ao reparo. Além disso, a MO contém alta concentração de fatores de crescimento acelerando a cicatrização (Dahlgren, 2005).

Os fatores de crescimento são peptídeos que regulam o metabolismo celular. Eles induzem a cicatrização tendínea e ligamentar por aumentar a síntese da matriz extra-celular, promovendo proliferação e diferenciação celular e estimulando a neovascularização (Dahlgren, 2005).

Com o animal em estação, sob sedação, as CTM da MO têm sido implantadas no local da lesão tendínea, guiadas pelo ultra-som. O momento ideal para implantação dessas células é um a dois meses após a lesão. Assim, espera-se passar a fase de debridamento e o início da formação de um leito de tecido de granulação que será um suporte para as células implantadas. Após o implante, os animais entram em um regime

controlado de exercícios com avaliações ultrasonográficas a cada dois ou três meses, e podem retornar ao treinamento após 48 semanas (Smith e Webbon, 2005).

No Brasil foi realizado um único experimento controlado com a aplicação das CT nos tendões de eqüinos. Barreira (2005), induziu lesão do tendão flexor digital superficial com colagenase e, de forma diferente de Smith e Webbon (2005), após 14 dias, fez a aplicação das CTM. Essa aplicação, guiada pelo ultra-som, foi realizada com o animal em estação, sob sedação e bloqueio regional dos nervos palmares medial e lateral. Após 15 dias, foi iniciado exercício leve (andar a passo por 5 minutos, uma vez ao dia) que foi aumentando em 5 minutos a cada 12 dias até o dia 48. Aos 48 dias pós terapia celular, houve uma melhora da lesão tendínea, confirmada por meio de avaliação ultrasonográfica, histopatológica e imunoistoquímica.

Herthel (2001) relatou um estudo retrospectivo (1991-1998) do tratamento de 100 cavalos que apresentavam lesões no LS e que foram tratados com injeção intralesional de CT autóloga, associada a componentes da MO para estimular a cicatrização natural do ligamento. Esse autor obteve 90% de sucesso no tratamento da desmite desses animais.

Mountford et al. (2006) trataram um cavalo com uma lesão no ramo lateral do LS, que em 4 meses não obteve cura, com CTM coletadas da MO e cultivadas por 17 dias. Após 19 meses, depois de completa recuperação e retorno ao trabalho, esse animal foi eutanasiado por razões não relatadas. À histologia foi encontrada evidência de melhora da cicatrização e formação de tecido semelhante ao LS.

O baixo número de CTM obtidas no aspirado da MO pode não ser adequado em promover os efeitos benéficos dessa terapia. Grandes volumes (20 a 30 mL seriam necessários e esses produziram lesões mecânicas na matriz extra celular. Além disso, um alto nível de TGF- $\beta$ 1 (fator de crescimento) no fluido aspirado pode resultar em excesso de formação de tecido cicatricial, o que não seria benéfico na cicatrização de tendões flexores e ligamentos,

pois esses teriam sua elasticidade diminuída (Dahlgren, 2005).

### **2.6.3. Colheita de células-tronco adultas nos eqüinos**

São descritas duas modalidades de recuperação de CTA nos eqüinos. Uma é a utilização de CTM obtidas do TA e a outra é através da punção da MO.

As CTM podem ser obtidas por meio de aspiração de sangue diretamente da MO do indivíduo. O método tradicional de coleta é punção esternal com o animal sob anestesia geral e em decúbito dorsal (Herthel, 2001; Barreira, 2005). Uma outra forma de abordagem esternal seria com o animal em estação (Barreira, 2005; Sutter, 2007).

Os locais possíveis para a punção de MO em animais adultos são os ossos do esterno, costela e crânio, e os ossos longos como úmero, fêmur e tibia, pois nestes locais há uma constante função hematopoiética. O esterno é um local frequentemente utilizado para se obter amostras de MO em eqüinos, pois a atividade hematopoiética persiste na esternébra ao longo da vida, os ossos não são cobertos por uma grande massa muscular, e a cavidade medular é coberta por uma fina camada de osso, facilitando o acesso a essa região. As desvantagens da punção neste local são a posição desconfortável e perigosa em que o coletor é forçado a assumir na obtenção das amostras e a relativa proximidade dos órgãos vitais, incluindo o coração (Barreira, 2005). Pode-se também aspirar MO do tuber coxal com o animal em estação ou decúbito. Uma agulha seria introduzida na protuberância e direcionada caudoventralmente e, a seguir, aspira-se a medula (Sutter, 2007).

Uma metodologia prática de ser utilizada será descrita a seguir. A coleta no esterno é realizada com o animal em estação sob o efeito de sedação e bloqueio anestésico do sub-cutâneo, músculo e região próxima ao perióstio. Faz-se então, uma pequena incisão de pele e sub-cutâneo com lâmina de bisturi 11, permitindo a introdução da agulha (*Jamshid, Illinois sternal* ou *Rosenthal*) na musculatura por 4 a 6 cm de profundidade até chegar na superfície da

esternébra. Após sentir a extremidade óssea na superfície da agulha, faz-se uma pressão sobre a mesma permitindo sua penetração por mais 4 a 5 cm até que a agulha fique firme. Faz-se então uma aspiração nas células da MO com o auxílio de uma seringa de 20 mL, sem anti-coagulante. Para conferir se o material é realmente da MO realiza-se um esfregaço (Barreira, 2005).

Após a coleta da MO do eqüino, o material é encaminhado ao laboratório onde as CTM são recuperadas e expandidas, *in vitro*, até um número de  $4 \times 10^5$  células. Essas são então ressuspendidas em um sobrenadante oriundo da MO e aplicadas no animal (Dahlgren, 2005; Smith e Webbon, 2005). Uma desvantagem desse método é que o material fica no laboratório por três a quatro semanas e, durante esse período pode se desenvolver um tecido cicatricial na lesão do animal (Dahlgren, 2005).

O TA pode ser colhido da região proximal abaxial da cauda de forma simples, com o animal em estação e enviado ao laboratório para isolamento de células nucleadas (uma porção das quais são CTM). Em um período de 48 horas essas células são encaminhadas ao veterinário e podem ser aplicadas nos tendões ou ligamentos lesados. O volume empregado varia de acordo com o tamanho da lesão (Dahlgren, 2005; Sutter, 2007).

### **2.6.4. Complicações da punção de medula óssea nos eqüinos**

Quando se utiliza de contenção e sedação adequadas, as complicações decorrentes da punção aspirativa da MO são mínimas. As infecções iatrogênicas são minimizadas por meio da utilização de assepsia e anti-sepsia adequadas, uso de luvas e instrumentos esterilizados. Quando se utiliza o esterno ou a aproximação costal, deve-se ter cuidado de introduzir a agulha diretamente na esternébra ou costela para evitar entrar na cavidade torácica. O risco de pneumotórax, hemorragia incontrolada ou laceração cardíaca pode ser diminuído pelo uso da vigilância e monitoria da agulha durante o procedimento (Barreira, 2005).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Local e período

A pesquisa foi realizada no Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), no período compreendido entre 15 de Julho a 23 de Dezembro de 2007. Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG, protocolo 19/07.

#### 3.2. Animais

Foram utilizados seis equinos, um macho castrado e cinco éguas (três não gestantes), com idade entre 4,5 e 16 anos, pesando  $375 \pm 75$  kg, com escore corporal entre 2,5 e 3 (Speirs, 1999). Tais animais foram oriundos da Fazenda Experimental localizada no município de Pedro Leopoldo/MG. Esses animais ficaram alojados na Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, onde o experimento foi realizado. Os equinos foram selecionados considerando condições nutricionais e higidez com auxílio de exames clínicos, laboratoriais, radiográficos e ultra-sonográficos. Os animais selecionados para o estudo passaram por um período de adaptação de 15 dias com dieta padronizada, tratamento de verminoses (moxidectina 0,4 mg/kg)<sup>1</sup> e vacinação contra tétano<sup>2</sup>.

#### 3.3. Indução das lesões

##### 3.3.1. Protocolo anestésico

Após jejum alimentar por um período de 12 horas, os animais foram pré-medicados com acepromazina (0,03 mg/kg, IV)<sup>3</sup>, xilazina<sup>4</sup> (0,5 mg/kg, IV) e quetamina (2 mg/kg, IV)<sup>5</sup>. Após decúbito lateral os animais foram intubados com sonda orotraqueal e a indução e manutenção anestésicas foram feitas através de aparelho de anestesia inalatória, com vaporizador

compensado em circuito semifechado. Foi utilizado o isoflurano volatilizado em 15 ml/kg/min de oxigênio via sonda orotraqueal de forma que o paciente permaneceu no segundo plano do terceiro estágio anestésico. Logo após a cirurgia, os animais receberam uma dose de sulfadiazina (20 mg/kg PO) mais trimetoprim (5mg/kg PO)<sup>6</sup> e esta continuou a cada 24 horas por mais 4 dias para prevenção de possíveis infecções. Também foi administrado fenilbutazona (4,4 mg/kg IV)<sup>7</sup>, a cada 24 horas, durante 7 dias para controle da dor.

##### 3.3.2. Metodologia cirúrgica

Sob anestesia, o LS de ambos os membros torácicos e pélvicos foram expostos cirurgicamente por meio de incisão de pele de aproximadamente 3 cm na região lateral dos membros, 3 cm proximal à bifurcação. No centro do ligamento suspensório, uma lesão circular foi realizada com a utilização de um punch para biópsia de 0,6 cm de diâmetro<sup>8</sup> (Figuras 2 e 3). Na seqüência, a pele foi suturada com pontos simples separados com fio mononáilon 0. Foi utilizado de forma tópica rifamicina<sup>9</sup> nas feridas cirúrgicas e feita bandagem com algodão e atadura de crepom nos membros.



Figura 2: Excisão de fragmento de ligamento suspensório por meio de punch para biópsia

<sup>1</sup> Equest, Fort Dodge Saúde Animal, Campinas, SP

<sup>2</sup> Vacina Anti-tetânica Hertape, Hertape Calier Saúde Animal S/A, Juatuba, M.G.

<sup>3</sup> Acepran 1%, Univet Indústria Veterinária, Mogi Mirim, S.P.

<sup>4</sup> Sedazyn, Fort Dodge Saúde Animal, Campinas, SP

<sup>5</sup> Dopalen, Vetbrands Saúde Animal, Paulínea, SP

<sup>6</sup> Tridiazin Pasta, Vansil Indústria Veterinária, Descalvado, SP

<sup>7</sup> Fenilvet, Vansil Indústria Veterinária, Descalvado, SP

<sup>8</sup> Punch trépano, Richter LTDA, São Paulo, SP

<sup>9</sup> Rifocina Spray, Hoechst Marion Roussel, São Paulo, SP



Figura 3: Fragmento retirado do ligamento suspensório para indução de lesão

### 3.4. Grupos experimentais e preparo dos animais

Foram estabelecidos quatro grupos experimentais, constituídos de seis membros cada um: um grupo controle sem qualquer outro tipo de tratamento ou controle negativo (GCN), um grupo controle tratado com solução fisiológica 0,9% ou controle positivo (GCP), um grupo tratado com células colhidas da medula óssea (GMO) e um grupo tratado com células colhidas de tecido adiposo periférico (GTA). No sentido de minimizar a influência de um tipo de tratamento sobre o outro os tratamentos foram distribuídos conforme a seqüência descrita no quadro 1.

Quadro 1- Seqüência dos tratamentos nos membros por animal

Animal	Torácico Direito	Torácico Esquerdo	Pélvico Direito	Pélvico Esquerdo
1	GCP	GTA	GMO	GCN
2	GTA	GMO	GCN	GCP
3	GMO	GCP	GTA	GCN
4	GCP	GMO	GTA	GCN
5	GTA	GCP	GMO	GCN
6	GMO	GTA	GCP	GCN

GCN – Grupo Controle Negativo; GCP – Grupo Controle Positivo; GTA – Grupo Tecido Adiposo; GMO – Grupo Medula Óssea

### 3.5. Colheita, processamento e cultivo de células oriundas de tecido adiposo

#### 3.5.1. Colheita do tecido adiposo

Oito dias antes da indução das lesões, o tecido adiposo foi colhido da região abaxial ao sacro, lado esquerdo. Foi feita tricotomia de cerca de 15 cm de largura por 20 cm de comprimento. Após contenção em tronco e sedação com acepromazina (0,03 mg/kg/ IV)<sup>10</sup> e xilazina<sup>11</sup> (0,5 mg/kg), fez-se a anti-sepsia (iodopovidona degermante mais álcool 70) e anestesia local com lidocaína 2%. A incisão de pele foi em formato de meia lua, no centro da tricotomia, com aproximadamente 10 cm de comprimento. Após a troca da lâmina do bisturi, um fragmento com cerca de 3 cm de comprimento por 0,5 cm

de largura por 0,2 cm de espessura de tecido adiposo foi removido do tecido subcutâneo (Fig. 4). O tecido foi então acondicionado em frasco estéril com meio RPMI (Roswell Park Memorial Institut), que é um meio de cultura composto de bicarbonato, aminoácidos essenciais e vitaminas; acrescido de antibióticos e encaminhado ao laboratório para o cultivo celular. Foi realizada sutura de pele com ponto simples separado com mononáilon 0. Sobre a ferida cirúrgica aplicou-se uma camada de pomada a base de alantoína<sup>12</sup>. Diariamente era feita limpeza com solução alcoólica de clorexidine 2% e aplicado a pomada a base de alantoína. Após 10 dias retiraram-se os pontos.

<sup>10</sup> Acepran 1%, Univet Indústria Veterinária, Mogi Mirim, S.P.

<sup>11</sup> Sedazyne, Fort Dodge Saúde Animal, Campinas, SP

<sup>12</sup> Alantol, Vetnil Ind. Com. Produtos Veterinários Ltda, Louveira, SP

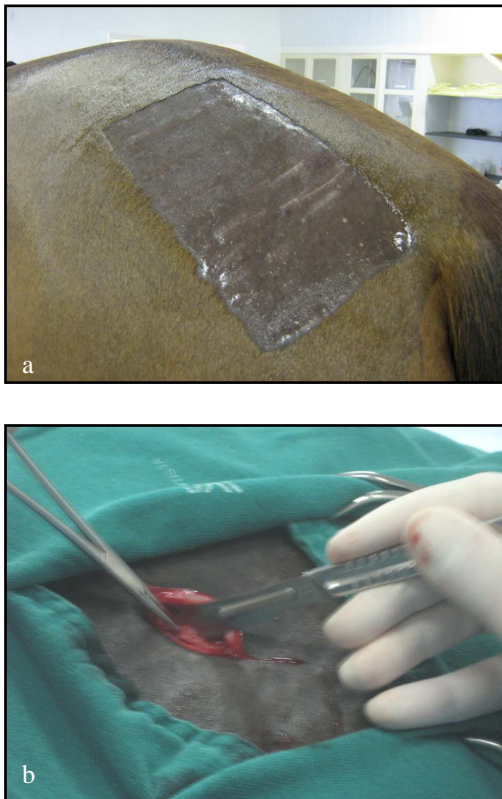


Figura 4: a- Área tricotomizada para coleta de tecido adiposo na região abaxial ao sacro, lado esquerdo; b- coleta de tecido adiposo após troca da lâmina de bisturi

### 3.5.2. Separação e cultivo das células

Em capela de fluxo laminar o tecido foi picotado, dissociado com collagenase e incubado em meio de cultura celular a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Após atingir 80% de confluência foi preparada a cultura secundária a qual foi observada diariamente até o momento da administração.

### 3.6. Colheita e processamento das células da medula óssea

Dois dias após a indução da lesão, os animais foram mantidos em estação, contidos em brete e sedados com acepromazina (0,03 mg/kg/IV)<sup>13</sup> e xilazina (0,5 mg/kg/IV)<sup>14</sup>. Em seguida, foi realizada tricotomia de uma área de 5 X 20 cm na região referente ao osso esterno de cada

equino, permitindo a execução do exame ultrassonográfico. Após ser localizada uma esternébra, foi realizada anestesia local com lidocaína 2%, seguido de anti-sepsia com solução de clorexidine degermante. Uma agulha para aspiração de medula óssea tipo *Jamshidi*<sup>15</sup> foi inserida na região do bloqueio. Após sua fixação no esterno, retirou-se o mandril e aspirou-se 10 mL de MO com o auxílio de uma seringa de 20 mL. Essa alíquota foi expelida em placa de Petri para verificação a olho nu da presença de espículas ósseas e gotículas de gordura, sugerindo a origem medular da amostra. A seguir retirou-se mais MO por meio de uma seringa de 20 mL contendo 1 mL de heparina a 5.000 UI/mL. Foi realizada centrifugação a 1500 rpm, durante 10 minutos, para separação da fração mononuclear. Após centrifugação, formou-se um anel esbranquiçado, rico na fração mononuclear de MO, entre o plasma e os resíduos de eritrócitos. Esta camada foi retirada com o auxílio de Pipetex e encaminhada ao Centro Cirúrgico de Grandes Animais para ser implantada no local da lesão. Todo processamento laboratorial da amostra foi realizado em capela de fluxo laminar.

### 3.7. Administração dos tratamentos

Quarenta e oito horas após a indução da lesão, a administração intralesional de soro fisiológico ou dos tratamentos foi realizada com o animal sob sedação, conforme descrito anteriormente, e bloqueio anestésico proximal dos nervos palmares medial e lateral (quatro pontos altos) com lidocaína 2% (Stashak, 1987).

Após anti-sepsia local com solução de clorexidine degermante e álcool 70°, administrou-se no foco da lesão produzida previamente cerca de 0,8 mL de suspensão celular de medula óssea no GMO, 0,8 mL de solução contendo 1x10<sup>6</sup> células cultivadas oriundas de tecido adiposo no GTA, e 0,8 mL de solução fisiológica 0,9% no GCP. A injeção foi realizada por meio de uma agulha 30X10 inserida na face lateral do membro e posicionada no centro da lesão ligamentar. Para se ter certeza do correto posicionamento da agulha e da injeção, o procedimento foi

<sup>13</sup> Acepran 1%, Univet Indústria Veterinária, Mogi Mirim, S.P.

<sup>14</sup> Sedazyne, Fort Dodge Saúde Animal, Campinas, SP

<sup>15</sup> Cânula para aspiração de medula óssea, Euromed Catéteres, Lagoa Santa, MG

monitorado por exame ultra-sonográfico simultâneo à administração dos tratamentos.

### 3.8. Exame clínico e ultra-sonográfico

Após a indução da lesão ligamentar os animais foram acompanhados por 77 dias. Nos primeiros 15 dias, foi realizado o exame clínico diário. Após a avaliação inicial foi mantido um intervalo de 12 dias entre os exames, até o final do experimento. O exame clínico consistia de exame visual e palpação do local da lesão, conferindo escores para presença de edema, sensibilidade dolorosa, e aumento de temperatura: 0 - ausente, 1 - discreta, 2 - leve, 3 - moderada, 4 - intensa. Para avaliação de edema também utilizou-se da medida dos perímetros dos membros no local da lesão com o auxílio de uma fita métrica. Para a avaliação da temperatura, utilizou a sensação térmica obtida pelo contato da mão do avaliador com o membro do animal.

O exame ultra-sonográfico dos ligamentos foi realizado com aparelho portátil, provido de transdutor linear multifrequencial (5 a 10 MHz)<sup>16</sup>, operando sempre na frequência de 7,5 MHz. As avaliações foram realizadas antes e aos 3, 8, 12, 17, 29, 42, 54, 66 e 77 dias após indução da lesão. Foram avaliados os planos transversais e longitudinais do ligamento e da lesão e as imagens obtidas foram digitalizadas e transferidas para um microcomputador portátil, para posterior avaliação morfológica e comparação entre os diferentes tratamentos.

A avaliação morfológica do ligamento e sua lesão foram realizadas por meio de um programa computacional de análise de imagens<sup>17</sup>. Os seguintes parâmetros foram avaliados nas lesões: área do ligamento (mensuração de toda a área do LS), área da lesão ligamentar (mensuração da área absoluta e percentual da lesão no LS), perímetro da lesão ligamentar (mensuração do perímetro da lesão produzida no LS), diâmetro de Ferret da lesão ligamentar (média das maiores dimensões em uma dada direção), intensidade de cor cinza na área da lesão ligamentar (mínima, média e máxima).

<sup>16</sup> Honda 2000V, Echo, São Paulo, SP

<sup>17</sup> Image J, National Institute of Health, EUA, disponível in <http://rsb.info.nih.gov/ij/>

## 4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados paramétricos foram tabulados, obtendo-se as respectivas médias e erros padrões. Para comparar tempos de cada grupo utilizou-se a análise de variância em blocos ao acaso e para grupos em cada tempo a análise de variância inteiramente casualizada, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey. Os dados não paramétricos também estão apresentados em médias e erros padrões. Nesse caso, os tempos de cada grupo foram submetidos ao teste de Friedman e os grupos dentro de cada tempo submetidos ao teste de Kruskal Wallis, sendo as médias posteriormente comparadas pelo teste de Dunn. Para todos os testes considerou-se como significante  $P < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Indução das lesões

O acesso cirúrgico ao LS foi simples e não se verificou qualquer complicação no protocolo anestésico. O punch utilizado se mostrou eficiente permitindo a obtenção de uma porção circular de LS, desde sua face dorsal até a palmar/plantar, em todos os animais. Tais lesões tinham forma circular, uniforme, de aproximadamente 0,5 cm de diâmetro, que foram completamente preenchidas por coágulo logo após a indução (Fig. 5).

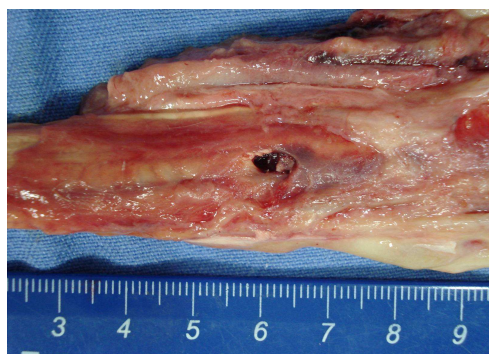


Figura 5: Fotografia do ligamento suspensório equino. Observa-se lesão circular preenchida por coágulo sanguíneo. Essa lesão foi induzida por meio de punch para biópsia com 0,6 cm diâmetro, 48 horas antes do óbito.

No membro pélvico esquerdo (GCP) do animal número 2 observou-se, junto ao material

ligamentar colhido com o punch, um segmento de aproximadamente 0,5 cm de vaso com característica de artéria. Contudo, não houve hemorragia profusa durante o procedimento e o animal se recuperou normalmente no pós-cirúrgico.

As lesões produzidas foram visualizadas ao ultra-som no dia seguinte ao procedimento cirúrgico mostrando área anecóica devido à ausência de tecido ligamentar. Em dois membros posteriores, a lesão ficou em posição mais lateral, contudo todas as outras apareceram na área central do ligamento (Fig. 6).



Figura 6: Imagem digitalizada de exame ultra-sonográfico palmar transversal de membro torácico esquerdo eqüino. Observa-se no centro do ligamento suspensório, lesão induzida por meio de punch para biópsia de 0,6 cm diâmetro, 48 horas antes.

## 5.2. Obtenção das células para os tratamentos

### 5.2.1. Colheita do tecido adiposo

A metodologia empregada para obtenção do tecido adiposo foi rápida e eficaz. A sedação e o bloqueio local foram suficientes para permitir uma coleta segura do material. Mesmo o animal com escore corporal 2,5 forneceu uma quantidade adequada de tecido adiposo. Nenhum animal apresentou qualquer tipo de intercorrência (como desconforto, deiscência de sutura, contaminação da ferida cirúrgica, cicatriz exagerada) durante ou após a coleta. Após o acondicionamento no meio RPMI, esse material não necessitou de cuidados específicos como refrigeração. Nenhum animal apresentou dor local, o que dispensou a administração de

antiinflamatório nos animais no período pós-cirúrgico do procedimento de colheita.

### 5.2.2. Separação e cultivo das células

A metodologia empregada no cultivo celular mostrou-se eficaz. Todas as amostras de tecido adiposo encaminhadas geraram células viáveis de morfologia fibroblastóide, característica de CTM (Fig. 7). Não se verificou contaminação em nenhuma delas, não sendo necessária a realização de uma segunda coleta em nenhum dos animais.



Figura 7: Imagem das células oriundas de tecido adiposo 10 dias após cultivo. Observa-se predominância de células com morfologia fibroblastóide característica de células tronco mesenquimais.

### 5.2.3. Punção aspirativa da medula óssea

Durante a punção aspirativa da MO, os animais não demonstraram sinais de dor, sugerindo que a infiltração de anestésico local associado à sedação foi suficiente. O volume coletado em cada animal foi suficiente para obtenção da alíquota previamente designada, a ser implantada na lesão. Em todas as colheitas foi possível identificar macroscopicamente a origem medular do material obtido por meio da presença de espículas ósseas e gotículas de gorduras que foi posteriormente confirmado pela presença de blastos em esfregaço das amostras.

Nas primeiras colheitas, durante o posicionamento da cânula, um animal se desequilibrou no tronco e caiu. Apesar dos esforços em reanimá-lo, o animal veio a óbito logo em seguida. Durante a necropsia, não

foram encontradas lesões cardíacas, hemorragias ou qualquer outro tipo de achado que fosse capaz de indicar com segurança a causa da morte. Esse animal foi substituído por outro no experimento.

#### 5.2.4. Separação da fração mononuclear

Após a centrifugação, a camada acinzentada contendo a fração mononuclear foi de fácil visualização. O volume coletado de 20 mL de MO possibilitou obtenção de 0,8 mL da fração mononuclear a ser implantada na lesão ligamentar.

#### 5.3. Administração dos tratamentos

A sedação e o bloqueio anestésico foram suficientes para os procedimentos de inoculação dos tratamentos, que foi simples quando guiado suficientes para os procedimentos de inoculação

pelo ultra-som. A agulha hipodérmica 30X10 mostrou-se adequada para esse fim. A maioria das lesões foi acessada pela face lateral do membro. Em dois animais houve a necessidade de acessar a lesão pela face medial devido a sangramento.

#### 5.4. Avaliação clínica

##### 5.4.1. Dor

Os dados relativos aos escores de dor estão apresentados na Figura 8 e Anexo 1.

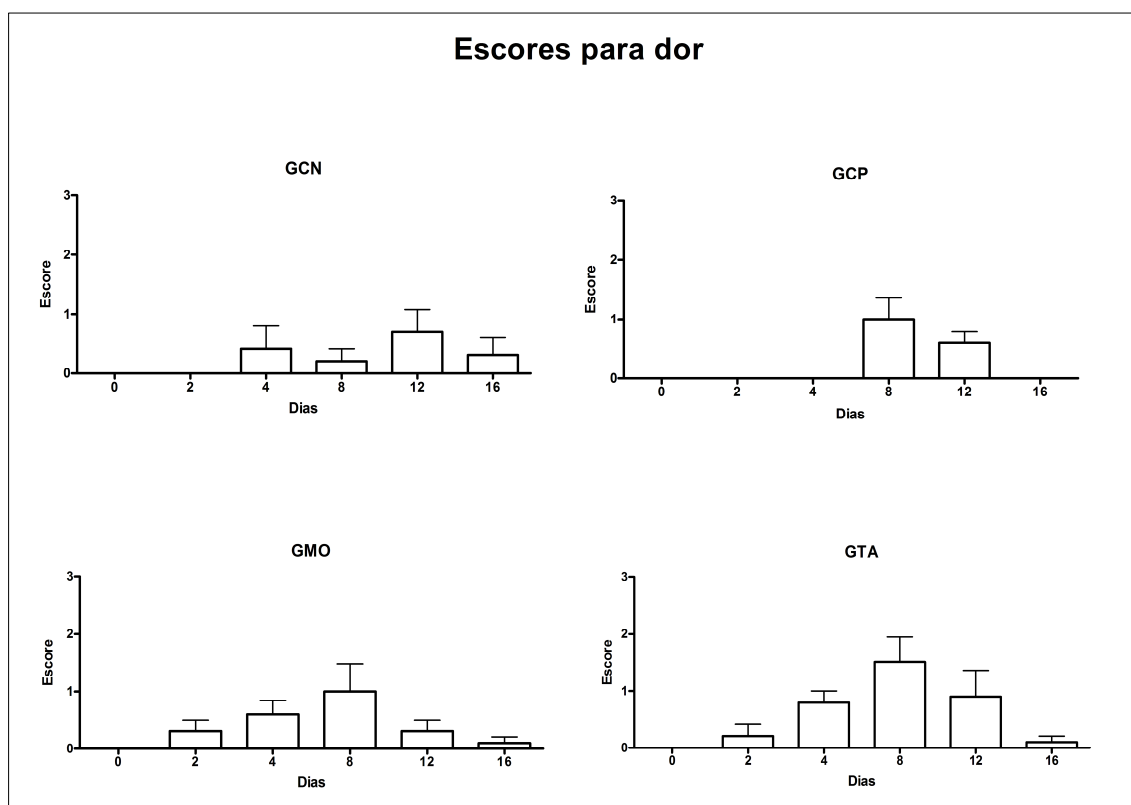


Figura 8 – Médias ( $\pm$  erros padrões) dos escores para presença de dor local em equinos submetidos a lesão do ligamento suspensório sem tratamento (GCN) ou tratados com solução fisiológica (GCP) ou terapia celular com medula óssea (GMO) ou células oriundas de tecido adiposo (GTA).

Não houve diferença estatística entre grupos ou tempos. Observou-se que a dor foi mais facilmente identificada entre 8 e 12 dias após a indução da lesão coincidindo com o término da administração da fenilbutazona 7 dias após a indução da lesão.

Somente o GTA apresentou um nível de sensibilidade dolorosa com média superior ao escore 1 (dor discreta), porém esse valor não foi

estatisticamente diferente do basal ou de outros grupos no mesmo tempo.

#### 5.4.2. Edema

Os dados relativos aos escores de edema de membro, no local da lesão, estão representados na Figura 9 e Anexo 2 e os relativos à medida do perímetro, na Figura 10 e Anexo 3.

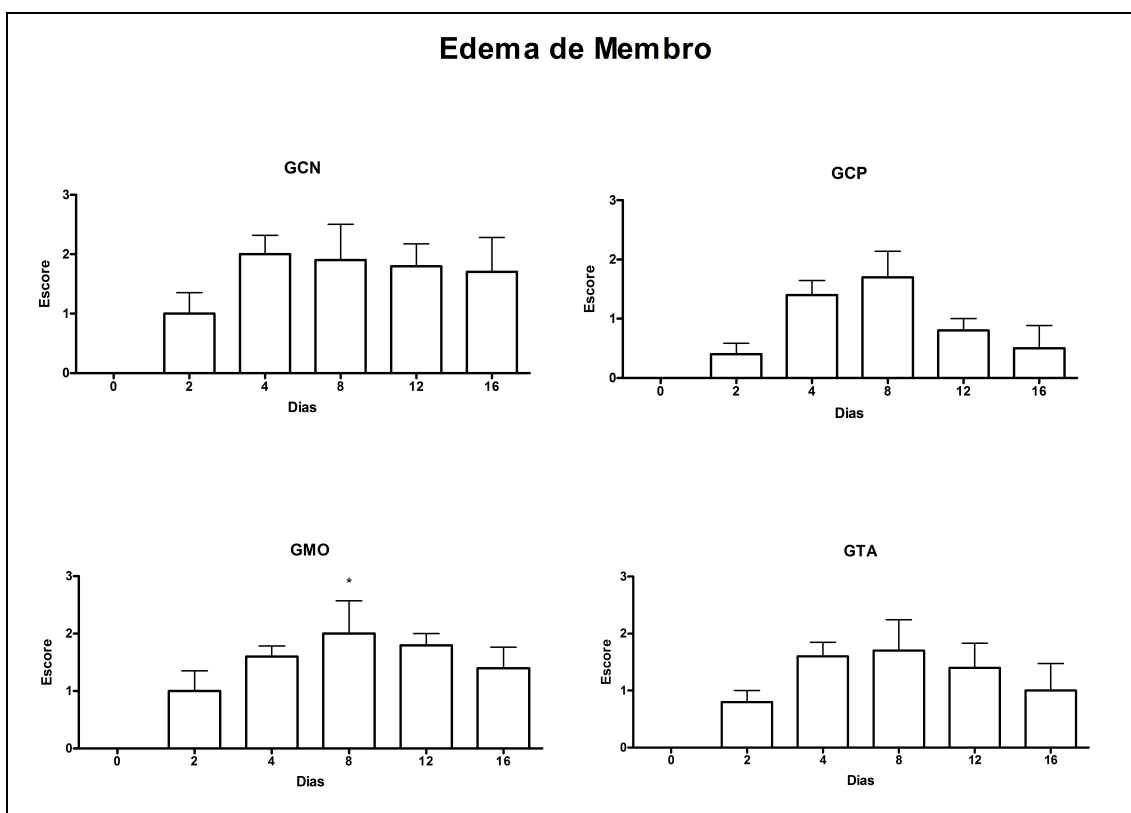


Figura 9 – Médias ( $\pm$  erros padrões) dos escores para presença de edema no local da lesão, em equinos submetidos a lesão do ligamento suspensório sem tratamento (GCN) ou tratados com solução fisiológica (GCP) ou terapia celular com medula óssea (GMO) ou células oriundas de tecido adiposo (GTA). \* No mesmo grupo, diferente do valor registrado no dia 0,  $P < 0,05$ .

Em todos os grupos observou-se edema na região da lesão, de grau discreto a moderado nos dias subsequentes à cirurgia, contudo apenas o

GMO, no dia 8, apresentou um aumento de volume estatisticamente superior ao valor basal.

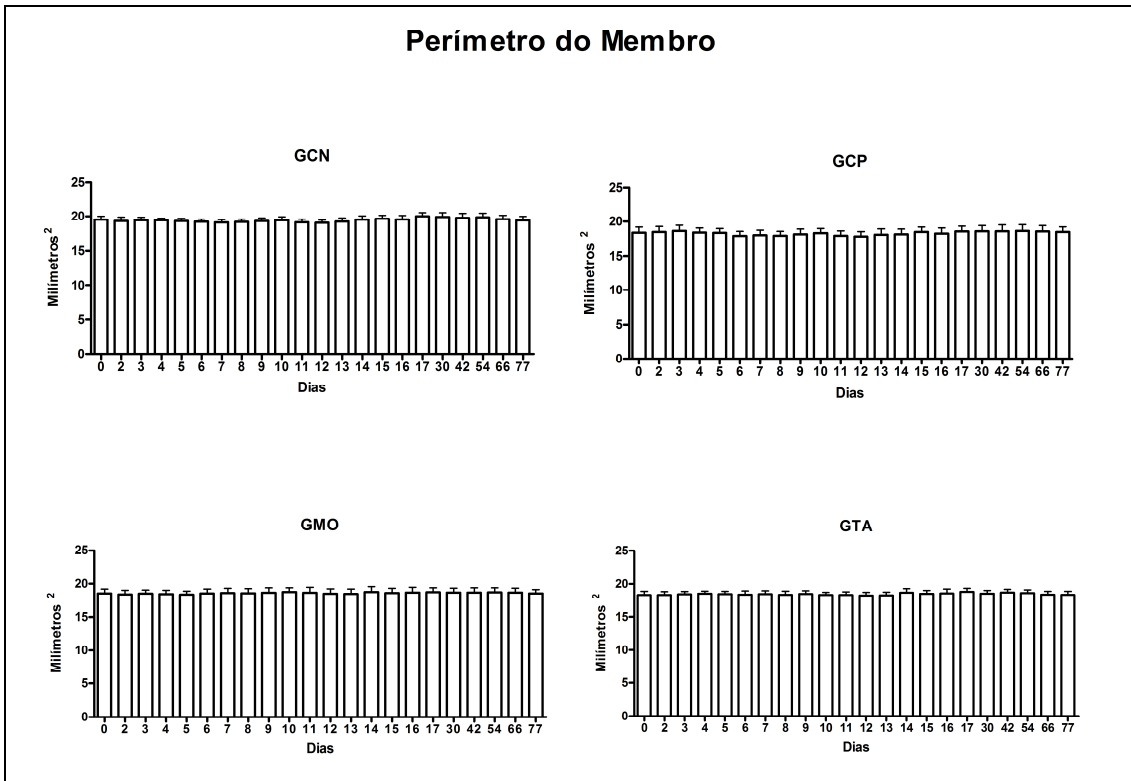


Figura 10 – Médias ( $\pm$  erros padrões) das medidas do perímetro dos membros, no local da lesão, em equinos submetidos a lesão do ligamento suspensório sem tratamento (GCN) ou tratados com solução fisiológica (GCP) ou terapia celular com medula óssea (GMO) ou células oriundas de tecido adiposo (GTA).

Não foi encontrada diferença estatística significativa entre os grupos ou tempos para a

mensuração do perímetro dos membros com ou sem tratamentos.

### 5.4.3. Temperatura

Os dados relativos aos escores de temperatura estão apresentados na Figura 11 e Anexo 4.

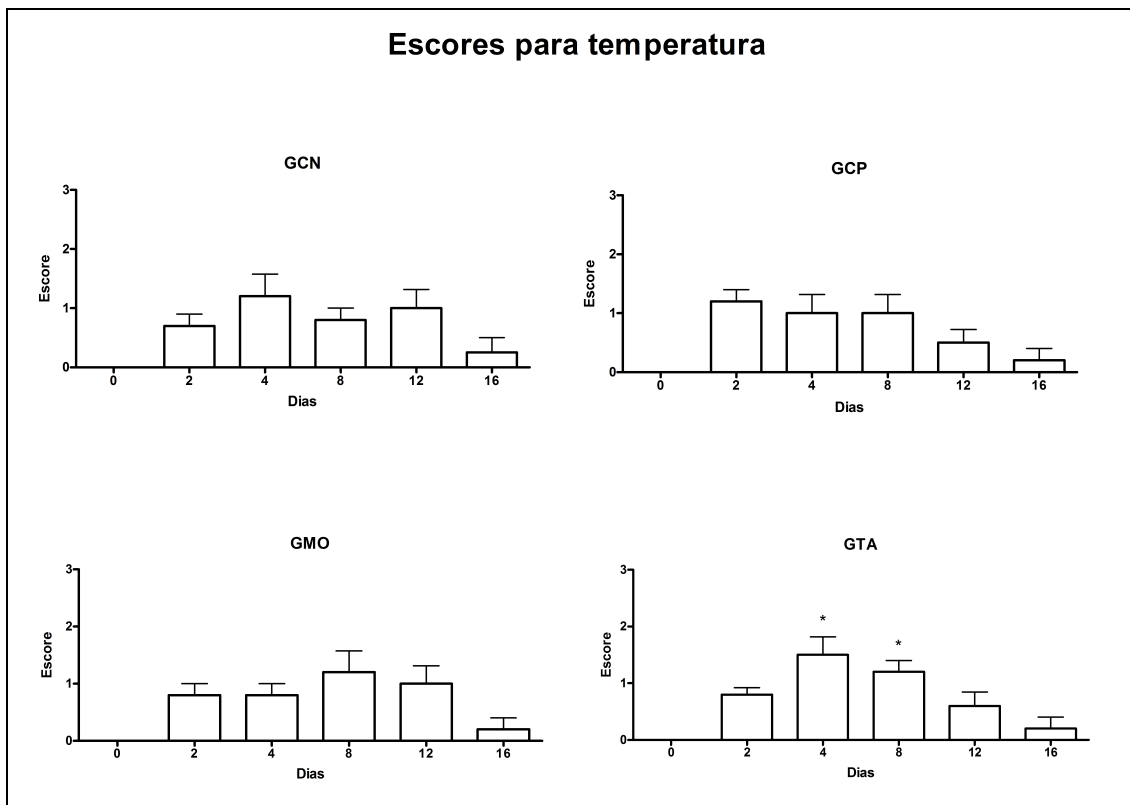


Figura 11 – Médias ( $\pm$  erros padrões) dos escores para presença de aumento de temperatura local em equinos submetidos a lesão do ligamento suspensório sem tratamento (GCN) ou tratados com solução fisiológica (GCP) ou terapia celular com medula óssea (GMO) ou células oriundas de tecido adiposo (GTA). \* No mesmo grupo, diferente do valor registrado no dia 0,  $P < 0,05$ .

Em todos os grupos, observou-se aumento de temperatura local de grau discreto a leve após a cirurgia que foi mais evidente entre os dias 2 e 12. Contudo, diferença significativa ocorreu

apenas no grupo GTA que apresentou um aumento de temperatura em relação ao basal nos dias 4 e 8, retornando a valores semelhantes aos basais no dia 12.

## 5.5. Exame ultra-sonográfico

### 5.5.1. Intensidade de cor cinza na área da lesão

Os dados relativos às intensidades média, mínima e máxima de cor cinza na área da lesão estão apresentados respectivamente nas Figuras 12, 13 e 14.

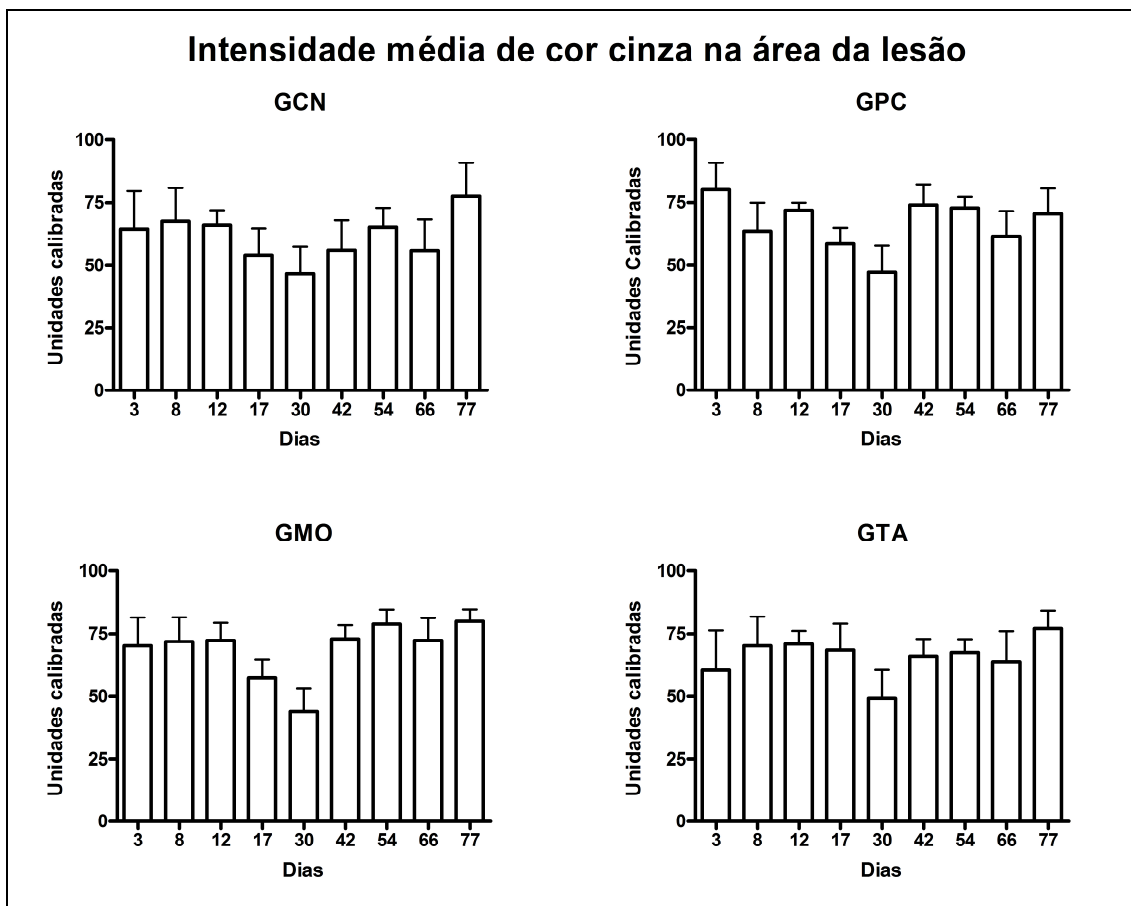


Figura 12 – Médias ( $\pm$  erros padrões) dos escores da intensidade de cor cinza na área da lesão de eqüinos submetidos a lesão do ligamento suspensório sem tratamento (GCN) ou tratados com solução fisiológica (GCP) ou terapia celular com medula óssea (GMO) ou células oriundas de tecido adiposo (GTA).

Não houve diferença significativa entre os grupos e tempos. No entanto, nos quatro grupos

foi possível observar que a menor média da intensidade da cor cinza ocorreu no dia 30.

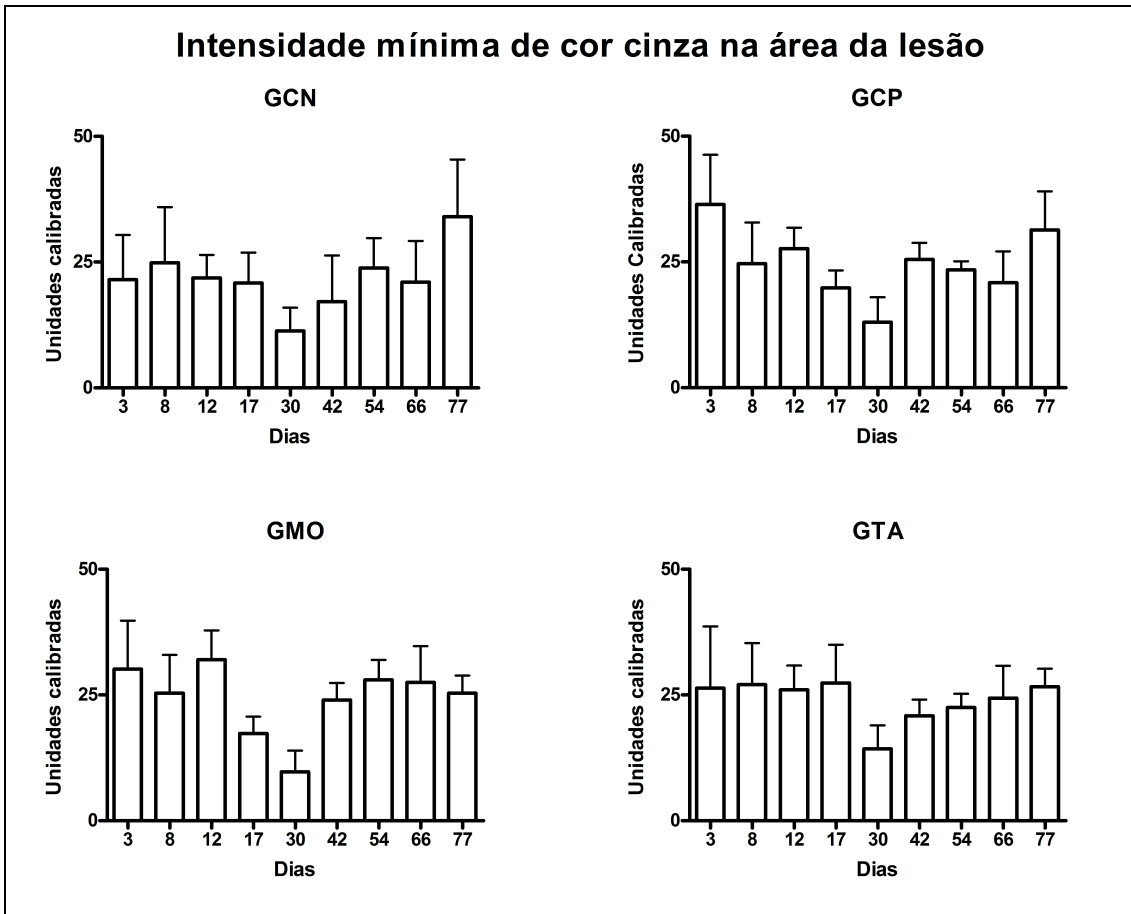


Figura 13 – Médias ( $\pm$  erros padrões) para intensidade mínima de cor cinza na área da lesão de equinos submetidos a lesão do ligamento suspensório sem tratamento (GCN) ou tratados com solução fisiológica (GCP) ou terapia celular com medula óssea (GMO) ou células cultivadas oriundas de tecido adiposo (GTA).

Não houve diferença estatística significativa entre os grupos e tempos. No entanto, nos quatro grupos foi possível observar que a menor

intensidade mínima da cor cinza ocorreu no dia 30.

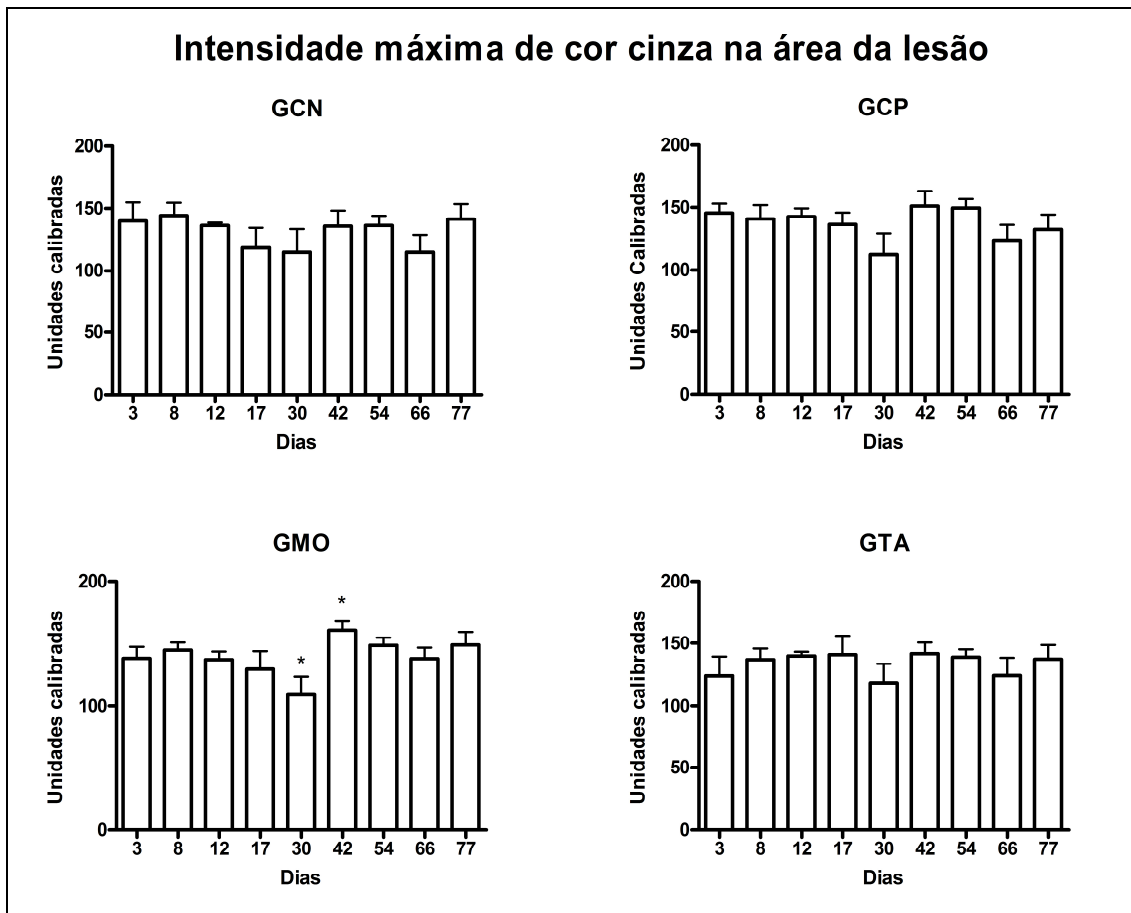


Figura 14 – Médias ( $\pm$  erros padrões) dos escores para intensidade máxima de cor cinza na área da lesão de equinos submetidos a lesão do ligamento suspensório sem tratamento (GCN) ou tratados com solução fisiológica (GCP) ou terapia celular com medula óssea (GMO) ou células cultivadas oriundas de tecido adiposo (GTA). \* Diferem entre si,  $P < 0,05$ .

Nos quatro grupos foi possível observar que a menor média de intensidade máxima da cor cinza ocorreu no dia 30. Contudo, apenas no

GMO ocorreu uma diferença estatística entre os dias 30 e 42.

### 5.5.2. Área da lesão

Os dados relativos à área da lesão estão apresentados na Figura 15.

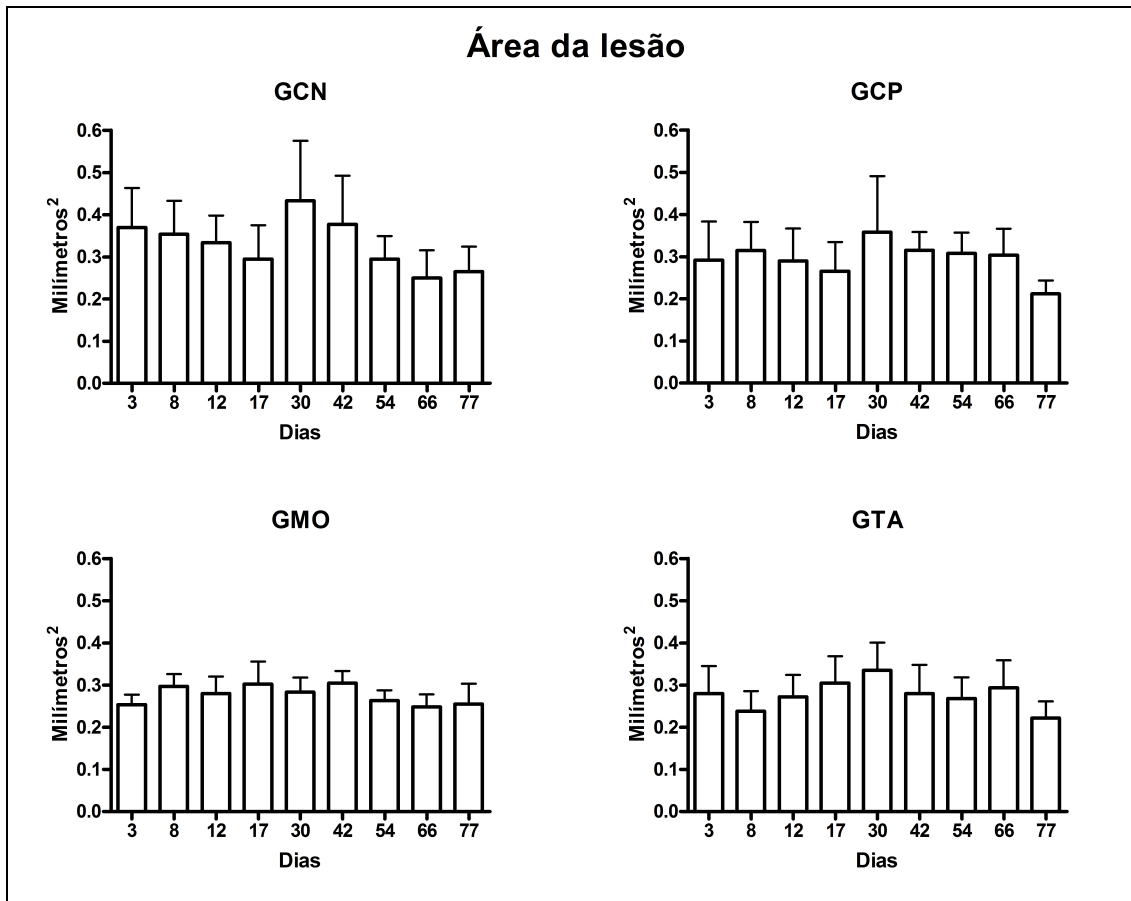


Figura 15 – Médias ( $\pm$  erros padrões) dos valores para área da lesão de equinos submetidos a lesão do ligamento suspensório sem tratamento (GCN) ou tratados com solução fisiológica (GCP) ou terapia celular com medula óssea (GMO) ou células cultivadas oriundas de tecido adiposo (GTA).

Não houve diferença significativa entre os grupos e entre os tempos para a área da lesão. Porém, de forma coincidente, nos grupos GCN,

GCP e GTA observou-se que a maior média na área da lesão ocorreu no dia 30.

### 5.5.3. Diâmetro de Ferret e perímetro da lesão

Os dados relativos ao diâmetro de Ferret e do perímetro da lesão estão apresentados

respectivamente nas Figuras 16 e 17.

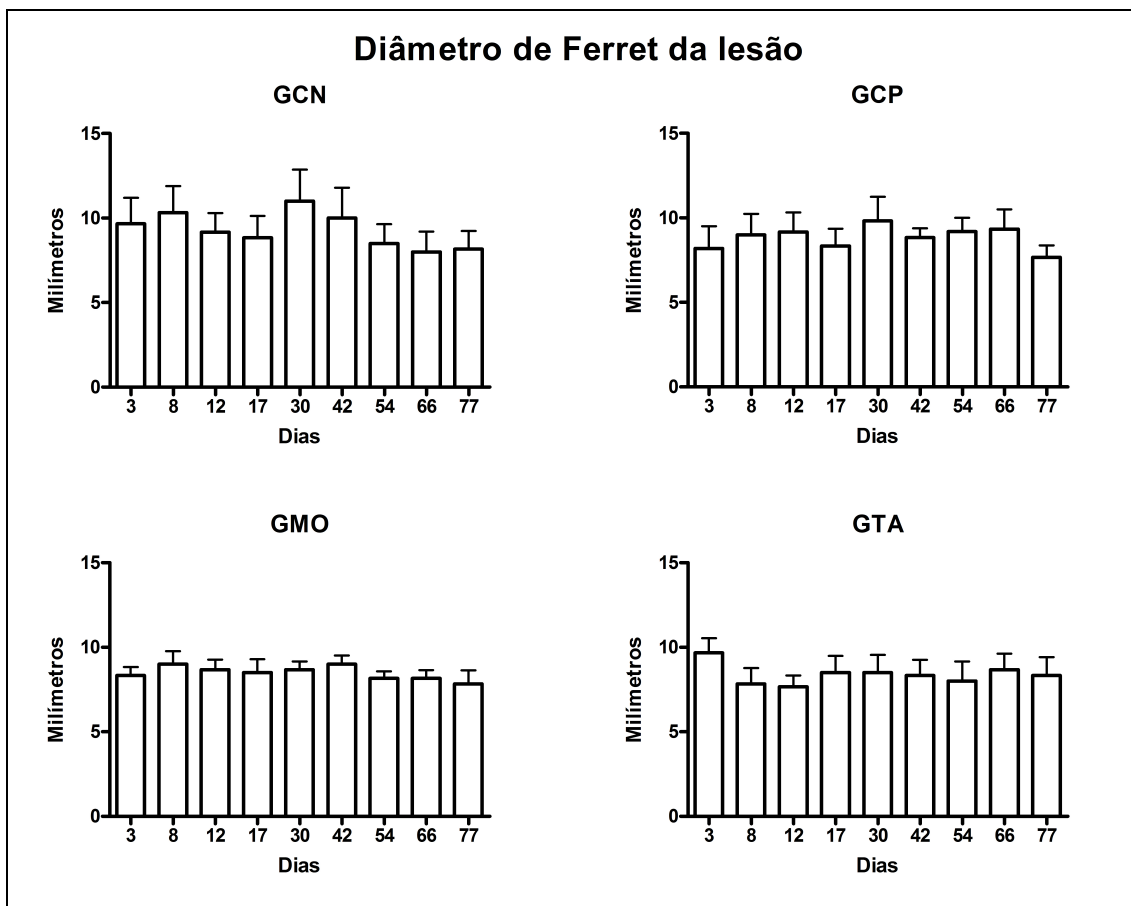


Figura 16 – Médias ( $\pm$  erros padrões) do diâmetro de Ferret da lesão de equinos submetidos a lesão do ligamento suspensório sem tratamento (GCN) ou tratados com solução fisiológica (GCP) ou terapia celular com medula óssea (GMO) ou células cultivadas oriundas de tecido adiposo (GTA).

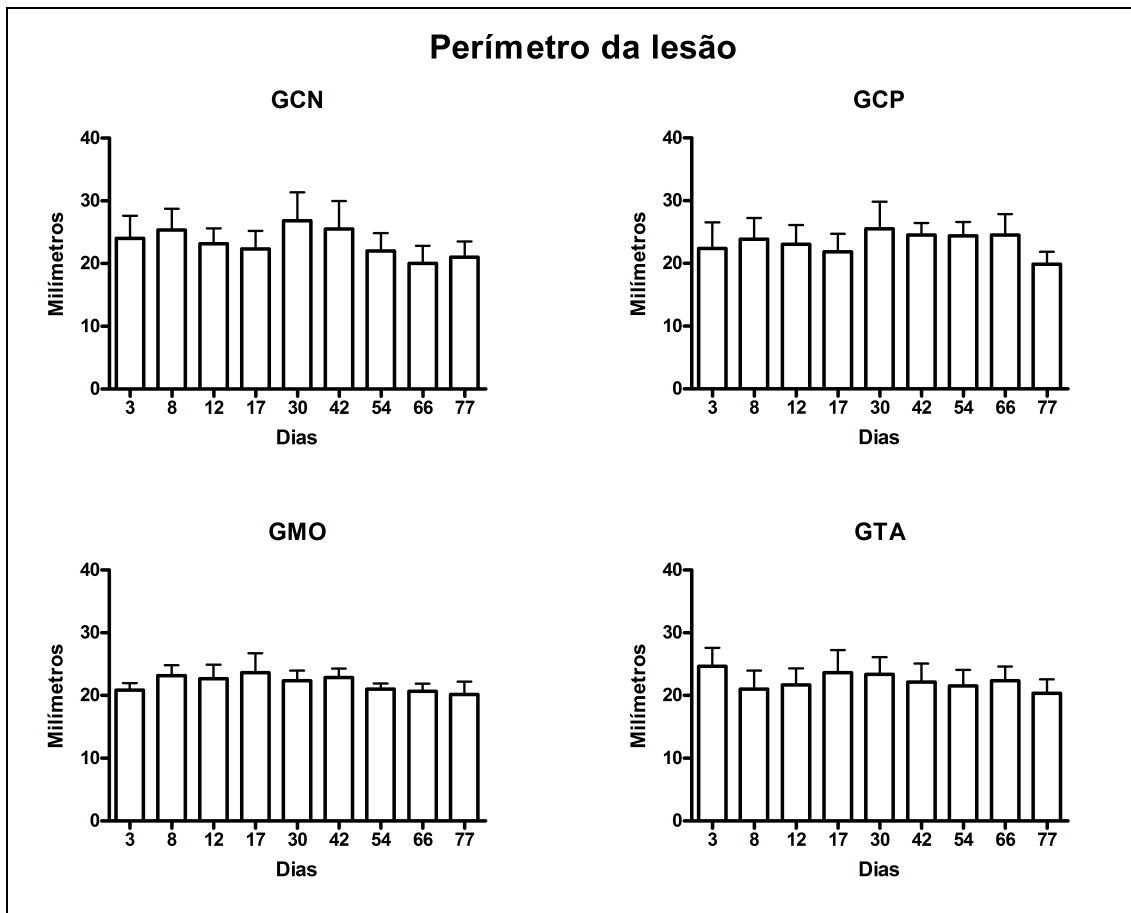


Figura 17 – Médias ( $\pm$  erros padrões) dos perímetros das lesões de equinos submetidos a lesão do ligamento suspensório sem tratamento (GCN) ou tratados com solução fisiológica (GCP) ou terapia celular com medula óssea (GMO) ou células cultivadas oriundas de tecido adiposo (GTA).

Não houve diferença estatística entre os grupos e tempos para perímetro e diâmetro de Ferret. Contudo, nos grupos sem terapia celular (GCN

e GCP) observaram-se valores superiores no dia 30 nos grupos GCN e GCP.

#### 5.5.4. Área total do ligamento e área percentual da lesão

Os dados relativos à área total do ligamento e área percentual da lesão estão apresentados respectivamente nas Figuras 18 e 19.

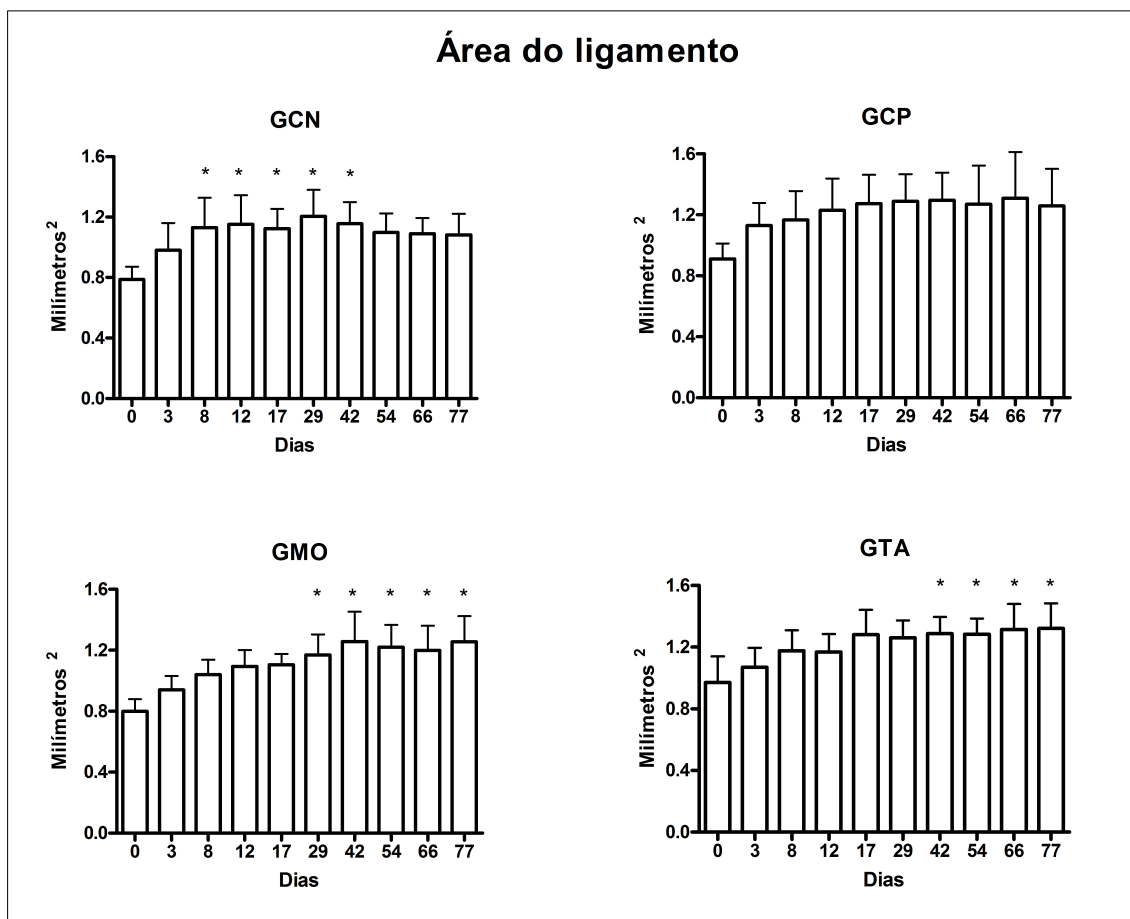


Figura 18 – Médias ( $\pm$  erros padrões) das áreas dos ligamentos de equínos submetidos a lesão do ligamento suspensório sem tratamento (GCN) ou tratados com solução fisiológica (GCP) ou terapia celular com medula óssea (GMO) ou células cultivadas oriundas de tecido adiposo (GTA). \* Diferem entre si,  $P < 0,05$ .

Em todos os grupos observou-se um aumento na área do ligamento, ao longo do tempo, que foram significativos nos grupos GCN, GMO, GTA. Esse aumento ocorreu mais precocemente

no GCN, a partir do dia 8. No GMO, o aumento na área ligamentar foi a partir do dia 29 e no GTA, a partir do dia 42.

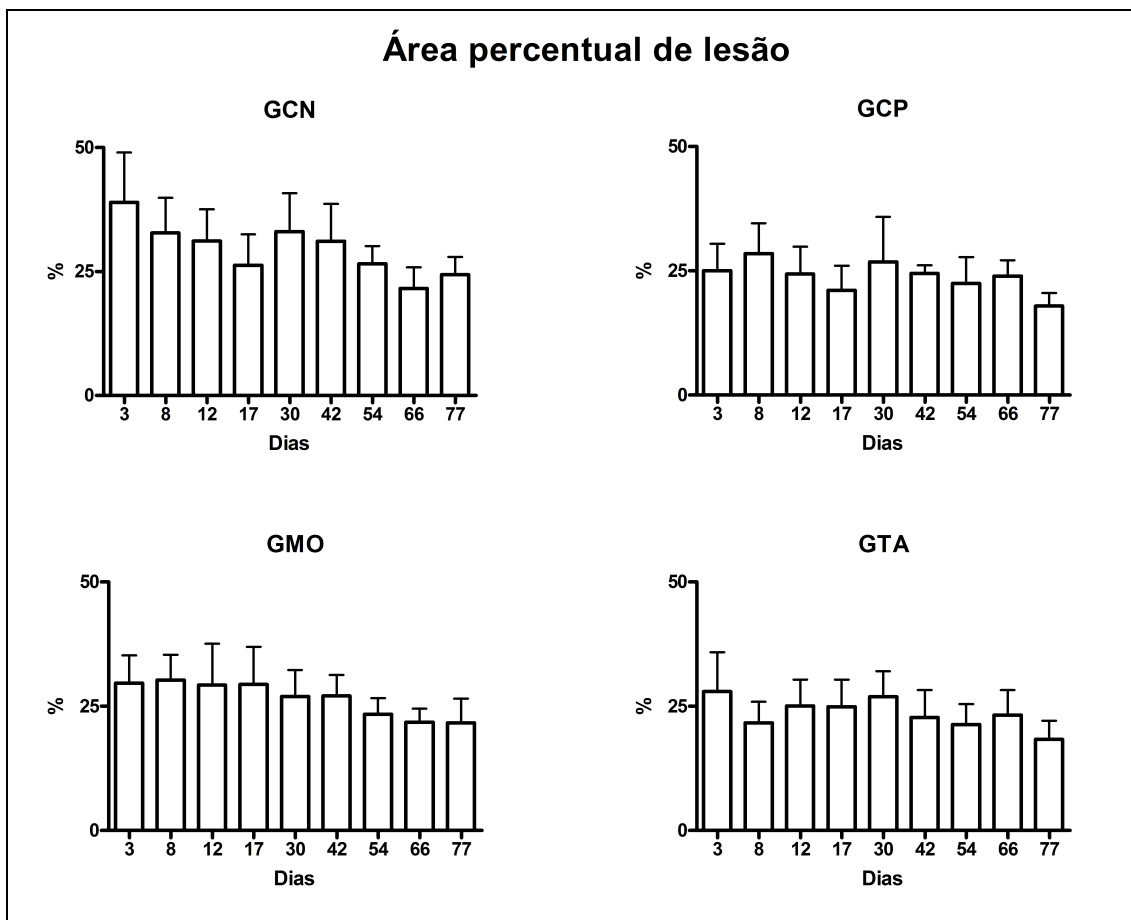


Figura 19 – Médias ( $\pm$  erros padrões) das áreas percentual de lesão dos ligamentos de eqüinos submetidos a lesão do ligamento suspensório sem tratamento (GCN) ou tratados com solução fisiológica (GCP) ou terapia celular com medula óssea (GMO) ou células cultivadas oriundas de tecido adiposo (GTA).

Não houve diferença significativa na área percentual da lesão entre grupos ou tempos. Contudo, de modo geral, observou-se que o

valor médio do dia 77 era inferior ao valor do dia 3 em todos os grupos.

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. Indução das lesões

Atualmente, o modelo de indução de lesão em tendões e ligamentos é por meio de injeção de colagenase. Vários são os protocolos utilizados. Pode-se induzir lesão em tendões flexores digitais superficiais nos membros torácicos de eqüinos com a injeção de 4000 UI de colagenase em um volume de 1,5 mL; sendo 0,5 mL 10 cm distal ao acessório do carpo e mais duas injeções de 0,5 mL, uma 1 cm distal e outra 1 cm proximal à primeira aplicação (Redding et al., 1999). Existem casos onde uma

única aplicação de colagenase não é suficiente. Caminoto (2003) utilizou 0,6 mL de colagenase (2,5 mg/mL) no LS e não obteve sucesso, sendo necessária uma segunda aplicação na dose de 0,5 mL (5 mg/mL), no mesmo local da primeira aplicação.

Um inconveniente da injeção da colagenase é que o efeito desta enzima depende da quantidade e do tipo de colagenase (potencial enzimático), do volume injetado (difusão próximo-distal e dispersão para o paratendão) e do grau de pureza da solução (Clayton et al., 2000). Porém esse método dispensa anestesia geral e se aproxima melhor do que ocorre

rotineiramente na clínica, onde não há perda de um fragmento tecidual.

A metodologia utilizada no presente estudo mostrou-se bastante efetiva e capaz de produzir uma lesão homogênea. Por meio do modelo com punch pôde-se controlar melhor o tamanho da lesão criada. Um único procedimento foi suficiente para criar uma lesão de boa qualidade e de fácil visualização ao ultra-som, logo após o procedimento cirúrgico. O modelo com punch não causou grande desconforto aos animais. O método associado ao tratamento com fenilbutazona produziu inflamação discreta nos membros sem prejudicar a locomoção e alimentação dos animais respeitando, assim, o que é preconizado no bem estar animal.

Diante dessas considerações, o método de indução de lesão utilizado foi considerado eficaz, por promover lesão de tamanho controlado, em toda extensão do ligamento, que pôde ser facilmente visualizado ao ultra-som logo após a indução, não havendo a necessidade de esperar por um período (dias ou semanas) até que a lesão se estabelecesse. A área anecóica vista, certamente, foi devida à ausência de fibras e não à hemorragia ou edema, como ocorre em modelos induzidos por colagenase (Barreira, 2005). Isso permite o estudo da validade das terapias celulares empregadas no processo de reparação tecidual.

Outra vantagem do método com o punch é que pode-se avaliar histologicamente o fragmento biopsado e, assim, ter a certeza que aquela área a ser tratada não apresenta nenhuma lesão prévia.

Este modelo é válido não somente para trabalhos cujo objetivo seria avaliar processos de inflamação tecidual como também serve para se estudar processos de ruptura de tendões e/ou ligamentos.

## **6.2. Obtenção das células para os tratamentos**

Para se ter absoluta certeza de que as células cultivadas a partir do TA representavam uma população de CT recomenda-se que testes imunológicos e bioquímicos sejam realizados com a utilização de marcadores específicos para esse tipo de célula (Zuk et al., 2002). No

presente estudo, devido a questões técnicas e financeiras tais testes não foram realizados. Contudo em todas as culturas, as células cultivadas apresentaram morfologia fibroblástica característica das denominadas "fibroblast-like precursor cells" (células precursoras semelhantes ao fibroblasto), que têm capacidade multipotencial de se diferenciar em vários tipos de células (Vidal et al., 2007). Essas células têm sido denominadas como células tronco derivadas do tecido adiposo (ASC). Recentemente, Vidal et al. (2007), utilizando protocolo de extração dessas células do TA semelhante ao utilizado no presente estudo, demonstraram a capacidade de diferenciação das ASC equínas. Devido às características morfológicas, considerou-se que as células cultivadas oriundas do TA no presente estudo se tratavam de ASC.

### **6.2.1. Colheita, processamento e cultivo de células oriundas de tecido adiposo**

São raros os artigos científicos que relatam a metodologia utilizada para a coleta de tecido adiposo na região abaxial da cauda. O método utilizado foi de simples execução e pode ser utilizado na rotina de colheita de TA equino para obtenção de CTM.

Geralmente, essa região possui uma grande quantidade de TA, mesmo em animais com escore corporal 2 (Speirs, 1999). O procedimento mostrou-se livre de complicações como infecções e deiscência de sutura, tendo as práticas de anti-sepsia citadas no material e métodos se mostrado eficientes. Em estudo piloto realizado antes de se iniciar a fase experimental, houve contaminação por fungos da cultura de uma amostra. No presente estudo, um cuidado considerado importante para que isso não ocorresse foi a não utilização da lâmina de bisturi usada para incisão de pele para realizar a colheita do TA.

Uma grande vantagem da técnica utilizada é a pequena quantidade de tecido adiposo necessário para o cultivo celular. Comercialmente tem-se colhido de 20 a 30g de tecido adiposo para terapia celular (Sutter, 2007). Porém, esse volume foi superior ao coletado no presente trabalho. Além disso, o tecido coletado deve ser acondicionado em frasco com meio apropriado (RPMI) e

encaminhado ao laboratório para cultivo celular. Esse cultivo dura, em média, 10 a 12 dias.

### **6.2.2. Colheita e processamento de medula óssea**

A técnica de punção da MO em esterno de equinos em estação é viável, mas requer adaptação da pessoa que coleta a amostra, devido à posição em relação ao animal e a força ventro-dorsal necessária para a penetração da cânula (Barreira, 2005). Mesmo assim a punção em estação tem vantagem sobre a técnica de coleta com os animais em decúbito dorsal (Herthel, 2001) por dispensar a anestesia geral.

O processamento utilizado permitiu o uso de um volume de apenas 0,8 mL. Volume semelhante foi utilizado por Barreira (2005) para injeção em tendões. Outros trabalhos relatam volumes superiores ao utilizado no presente trabalho. Rosenbrock et al., 2004, utilizou um volume de 10 a 15mL do aspirado de MO para tratar lesões proximais do LS e 5 a 8 mL nos casos de lesões nos ramos do LS. Não foi informado se o material foi filtrado ou sofreu algum tipo de tratamento. Outra alternativa seria injetar um pequeno volume de 1 mL, com  $2 \times 10^6$  de células suspensas de medula óssea cultivada por 17 dias (Mountford et al., 2006) ou o mesmo número de células provenientes de cultivo de MO por um período de 4 semanas (Smith, 2004; Smith e Webbon, 2005). Assim, uma vantagem do protocolo utilizado no presente estudo foi o reduzido volume, mais fácil de ser aplicado e que, hipoteticamente, traria menor pressão no local da lesão e menor desconforto para o animal.

Mais pesquisas ainda serão necessárias para estabelecer qual seria o melhor local e técnica para coletar MO no cavalo. Quando a MO for cultivada para isolamento de células progenitoras, a contaminação por sangue não é relevante. Ao contrário, se a MO for implantada diretamente ou for centrifugada, deve-se coletar a maior quantidade de células progenitoras que for possível (Sutter, 2007). Deve-se também verificar se há necessidade de realizar algum tratamento no material colhido e, a partir de então, estabelecer o volume necessário a ser colhido e implantado no local a ser tratado.

Com relação ao acidente ocorrido durante a colheita de MO, não foi possível determinar a causa do óbito do animal. Complicações como hemorragia incontrolada, laceração cardíaca ou pneumotórax são conhecidos (Barreira, 2005). Durante a necropsia não foram encontradas lesões no animal que pudesse sugerir a ocorrência de alguma destas complicações. Assim, parece que a punção da MO não foi um fator determinante. Após o ocorrido, as colheitas foram realizadas com maior precaução quanto à sedação do animal e passou-se a posicionar a agulha de biópsia em esternóbras mais craniais.

### **6.3. Administração dos tratamentos**

A administração dos tratamentos mostrou-se fácil quando guiado pelo ultra-som, em animal em estação sob sedação e bloqueio regional dos nervos palmares/plantares medial e lateral. Foi possível visualizar a área lesionada e acompanhar o seu preenchimento.

A metodologia corrobora os resultados de outros autores (Mountford, 2006). Pode-se implantar células oriundas de MO no tendão flexor digital superficial, após visualizar a lesão pelo ultra-som, porém sem que o implante seja guiado por esse (Rosenbrock, 2004). Outra abordagem seria com o animal em estação, sob sedação, sem o bloqueio anestésico local, e o implante sendo guiado pelo ultra-som (Smith, 2004; Smith e Webbon, 2006). Há ainda a possibilidade de se implantar medula óssea logo após a coleta, ambas sob anestesia geral, com agulha calibre 18 guiada pelo ultra-som (Anguiano-Estrella et al., 2005).

A metodologia empregada mostrou-se eficaz, pois, pode-se ter a certeza do local onde o implante deve ser realizado. A visualização do preenchimento do local da lesão acompanhado por ultra-som no momento da injeção foi considerada fundamental para certificar a correta administração. Como verificou-se em estudo piloto que o local da lesão era preenchido por um coágulo (Fig. 5), acredita-se que as células inoculadas tiveram um meio adequado para se fixar no local da lesão. Considerou-se que a sedação e bloqueio regional são técnicas seguras tanto para o veterinário quanto para o paciente.

#### 6.4. Avaliação clínica dos animais

A dor induzida pelo modelo foi classificada apenas como discreta. Esse achado demonstra que, apesar de produzir nítida lesão no ligamento, os animais não apresentaram sinais clínicos marcantes de dor enquanto estavam sob efeito da fenilbutazona na posologia empregada. Uma possível explicação para a manifestação mais nítida de dor entre 8 e 12 dias após a indução da lesão foi o final do tratamento com fenilbutazona que foi interrompido no dia 7. A fenilbutazona tem meia-vida de  $68 \pm 25$  horas, que poderia justificar essa ausência da dor. Da mesma forma, Barreira (2005) também não encontrou diferença de sensibilidade dolorosa entre os grupos controle e tratados com implante de CTM oriundas de MO nos tendões flexores.

A presença de edema e aumento de temperatura logo após a indução da lesão era esperado devido à manipulação cirúrgica que os animais foram submetidos.

#### 6.5. Exame ultra-sonográfico dos animais

Não se verificaram diferenças significativas entre grupos quanto à tonalidade cinza da lesão à ultra-sonografia. A avaliação estatística do nível de tonalidade cinza tem sido usada para avaliar lesões tendíneas. Porém, essas observações não são suficientes para quantificar de forma detalhada e documentar mudanças sutis que ocorrem no tendão. Assim, esses parâmetros, não são suficientemente precisos para caracterizar de modo confiável, como é desejável em estudos que tem como objetivo avaliar o tratamento, ou monitorar de forma detalhada a cicatrização de lesões (van Schie, 2000).

Nesses casos de lesões tendíneas e ligamentares, acredita-se que a redução da intensidade ecogênica expressa em tonalidade de cinza é compatível com áreas de hemorragia, edema e tecido de granulação inicial na fase aguda da lesão (Barreira, 2005). Uma possível explicação para essa observação seria que nos primeiros 30 dias haveria uma redução da inflamação e, a partir daí, o início de uma fase cicatricial de deposição de colágeno. Esses dados corroboram Barreira (2005), que em um estudo semelhante encontrou uma intensa atividade de reparo a

partir do 36° de implante de células mesenquimais oriundas de MO nos tendões flexores de eqüinos.

O diâmetro de Ferret é definido como a medida das maiores dimensões em uma dada direção. Ele é de utilidade na mensuração dessas lesões devido à irregularidade de suas bordas. Esses valores, assim como o perímetro, oscilaram muito pouco durante todo o experimento demonstrando que não houve uma diferença significativa na diminuição no tamanho da lesão. Assim, esses 77 dias de acompanhamento não foram suficientes para verificar uma regressão no tamanho da lesão.

Nesse estudo foi encontrada uma diferença no período de aumento do tamanho do ligamento nos grupos GCN, GTA e GMO. No GCN esse aumento ocorreu no 1° mês e nos grupos tratados a partir do 2° mês. Esses achados sugerem que houve uma maior reação inflamatória no GCN no 1° mês e que nos grupos tratados com terapia celular aconteceu maior atividade cicatricial no ligamento a partir do 2° mês.

Estudos sugerem um período mínimo de cicatrização de três meses (Barreira, 2005). No dia 77 em todos tratamentos do experimento a área percentual da lesão era menor que no dia 3, sugerindo uma tendência à diminuição da área percentual da lesão a partir de então.

### 7. CONCLUSÕES

Nas condições do presente estudo e com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- O modelo experimental utilizado para indução da lesão, com a utilização do punch para biópsia, se mostrou eficiente. Por meio dele obtiveram-se lesões padronizadas nos quatro membros, sem que houvesse desconforto e sofrimento desnecessários aos animais. Pode-se assegurar que a região anecóica, observada ao ultra-som, era devido à ausência de tecido e não a edema e hemorragia como supostamente acontece com o modelo da colagenase.

- As metodologias empregadas para colheita das células mesenquimais tanto da medula óssea como do tecido adiposo se mostraram tecnicamente factíveis e não causaram infecção,

complicações de cicatrização e sinais evidentes de dor ou desconforto aos animais. O acidente ocorrido durante a colheita de uma das amostras de medula óssea não foi diretamente associado ao procedimento.

- Os dois protocolos de terapia celular se mostraram seguros, já que não se observaram reações indesejáveis nos membros dos grupos tratados quando comparados aos membros de grupos sem tratamento ou tratados com solução fisiológica.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDE (Associação Nacional de Equoterapia). On line. Disponível em: [www.equoterapia.org.br](http://www.equoterapia.org.br). Acesso em: 08 set. 2002.

ANGUIANO-ESTRELLA, R., ANGUIANO-ESTRELLA, J., TOPETE-URIBE, R., et al. Uso clínico de los componentes medulares para estimular la regeneración de los tendones flexores y ligamento suspensor en los equinos. In: SEMANA DE LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA, XVI., 2005, Cuba. *Proceedings...* Disponível em: [www.cucba.udg.mx/.../avances/avances\\_2005/Veterinaria/AnguianoEstrellaRuben.pdf](http://www.cucba.udg.mx/.../avances/avances_2005/Veterinaria/AnguianoEstrellaRuben.pdf). Acesso em: 19 jul. 2007.

BABINET, C.; MANDELBAUM, J. Stem cells. *Hum. Reprod.*, v. 17, n. 5, p. 1409-1410, 2002.

BARREIRA, A.P.B. *Implante autólogo de células mesenquimais no tratamento de tendinites induzidas em equinos: avaliação clínica, ultra-sonográfica, histopatológica e imunoistoquímica*. 2005. 86f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu.

BIANCO, P., RIMINUCCI, M., GRONTHOS, S., et al. Bonemarrow stromal stem cells: nature, biology, and potencial applications. *Stem Cells*, v. 19, p. 180-192, 2001. Disponível em: <http://www.stemcells.com>. Acesso em: 20 ago. 2006.

- Com face nas avaliações clínica e ultrasonográfica não foi possível verificar diferenças entre os tratamentos. O maior diâmetro dos ligamentos tratados com terapia celular, em relação aos valores basais, a partir de 42 dias de lesão indica maior atividade cicatricial nesses grupos. Novos estudos com base em avaliação histológica deverão ser realizados para avaliar mais objetivamente a qualidade do processo de reparação tecidual.

BUTLER, D.L.; GROOD, E.S.; NOYES, F.R. et al. Biomechanics of ligaments and tendons. *Exerc. Sport Sci. Rev.* v. 6, p. 125-181, 1978.

CAMINOTO, E.T.C. *Efeito das ondas de choque extracorpóreas na desmíte experimentalmente induzida em equinos*. 2003. 97f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu.

CASTRO, F.A. et al. A new approach for perineural injection of the lateral palmar nerve in the horse. *Vet. Surg.*, v.34, p.539, 2005.

CLAYTON, H.M., SCHAMHARDT, H.C., WILLEMEN, M.A., et al. Kinematics and ground reaction forces in horses with superficial digital flexor tendonitis. *Am. J. Vet. Res.*, v.61, n.2, p.191-196, 2000.

COOKSON, C. Mãe de todas as células. *Scientific Am. Brasil.*, n. 39, p. 62-69, 2005.

COWLES, R.R. Proximal suspensory desmitis – a qualitative survey. *Am. Assoc. Equine Pract.*, v. 46, p. 143-144, 2000.

CROWE, O., DYSON, S.J., WRIGHT, I.M., SCHRAMME, M.C., SMITH, R.K. Treatment of chronic hindlimb proximal suspensory desmitis by radial extracorporeal shockwave therapy. *Am. Assoc. Equine Pract.*, v. 48, p. 322-325, 2002.

DAHLGREN, L.A. Review of treatment options for equine tendon and ligament injuries: what's new and how do they work. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE

- PRACTITIONERS, 51, 2005, Seattle. *Proceedings...* Lexington KY: American Association of Equine Practitioners, 2005. Disponível em: [www.ivis.org](http://www.ivis.org). Acesso em: 26 out. 2006.
- DAHLGREN, L.A. Pathobiology of tendon and ligament injuries. *Clin. Tech. Equine Pract.* v.6, p.168-173, 2007. Disponível em: <http://www.elsevier.com.br> Acesso em: 03 jan. 2008.
- DENOIX, J. Functional anatomy of tendons and ligaments in the distal limbs (manus and pes). *Vet. Clin. North Am.*, v. 10, n. 2, p. 273-322, 1994.
- DEL CARLO. R.J. Células Tronco: Uma alternativa de enxerto em ortopedia veterinária. *Rev. CRMV-MG*, n. 85, p.16-19, 2005.
- DYSON, S. Proximal suspensory desmitis: clinical, ultrasonographic and radiographic features. *Equine Vet. Educ.*, v.23, n.1, p. 25-31, 1991.
- DYSON, S.J.; ARTHUR, R.M.; PALMER, S.E.; et al. Suspensory ligament desmitis. *Vet. Clin. North Am.*, v. 11, n. 2, p. 177-215, 1995.
- FUCHS, E.; SEGRE, J.A. Stem cells: a new lease on life. *Cell*, v. 100, p.143-155, 2000.
- GETTY, R. *Anatomia dos animais domésticos*. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1986, p. 402.
- GOODSHIP, A.E. The pathophysiology of flexor tendon injury in the horse. *Equine Vet. Educ.*, v. 5, n. 1, p. 23-29, 1993.
- GOODSHIP, A.E.; BIRCH, H.L.; WILSON, A.M. The pathobiology and repair of tendon and ligament injury. *Vet. Clin. North Am.*, v. 10, n. 2, p. 323-349, 1994.
- GROVE, J.E.; BRUSCIA, E.; KRAUSE, D.S. Plasticity of bone marrow-derived stem cells. *Stem Cells*, v. 22, p. 487-500, 2004. Disponível em: <http://www.stemcells.com>. Acesso em: 20 ago. 2006.
- HERTHEL, D.J. Enhanced suspensory ligament healing in 100 horses by stem cells and other bone marrow components. *Am. Assoc. Equine Pract* v. 47, p. 319 – 321 , 2001. Disponível em: [www.ivis.org/proceedings/aaep/2001/91010100319.pdf](http://www.ivis.org/proceedings/aaep/2001/91010100319.pdf). Acesso em: 20 ago. 2006.
- HOFFMANN, A.; GROSS, G. Tendon and ligament engineering in the adult organism: mesenchymal stem cells and gene-therapeutic approaches. *International Orthop.* v. 31, p. 791-797.
- IGLÉZIAS, J.C.R. Célula-tronco. *Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba*. v. 6, p. 3-9, 2004.
- JACKMANN, B.R. Common lameness in the cutting and reining horse. *Proc. Am. Assoc. Equine Pract.* v. 47, p. 6-11, 2001
- KEG, P.R. et al. The effect of the high palmar nerve block and the ulnar nerve block on lameness provoked by a collagenase-induced tendonitis of the lateral branch of the suspensory ligament. *Vet. Quart.*, v.18, p.103-105, 1996.
- KERN, S., EICHLER, H., STOEVE, J. et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*, v. 24, p. 1294-1301, 2006. Disponível em: [www.stemcells.com](http://www.stemcells.com). Acesso em: 25 set. 2007.
- LEROU, P.H., DALEY, G.Q. Therapeutic potential of embryonic stem cells. *Blood Rev.* v. 19, n. 6, p. 321-331, 2005.
- MADISON, J.B. Acute and chronic tendonitis in horses. *The Comp.* v. 6, p. 853-856, 1995.
- MAYHALL, E.A.; PAFFETT-LUGASSY, N.; ZON, L.I. The clinical potential of stem cells. *Cur. Opinion Cell Biol.*, v. 16, n. 6, p. 713-720, 2004.
- McCLURE, S., EVANS, R.B. In vivo evaluation of extracorporeal shock wave therapy for collagenase induced suspensory ligament desmitis. *Am. Assoc. Equine Pract.* v. 48, p. 378-380, 2002.
- McCLURE, S., VANSICKLE, D., EVANS, R., et al. The effects of extracorporeal shock-wave therapy on the ultrasonographic and histologic

appearance of collagenase-induced equine forelimb suspensory ligament desmitis. *Ultrasound Med. Biol.*, v. 30, n.4, p. 461-467, 2004.

McDIARMID, A. Ultrasonography of the palmar metacarpus and pastern in the horse. *In Practice*, p. 368-376, 1995.

MONTES, G. S. Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. *Cell Bio. Internat.*, v.20, n.1, p.15-27, 1996.

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

PRESNELL, S.C.; PETERSEN, B.; HEIDARAN, M. Stem cells in adult tissues. *Cell Developmental Biol.* v. 13, n. 5, p. 369-376, 2002. Disponível em: <http://www.idealibrary.com>. Acesso em: 18 ago. 2006.

RAIMONDO, S.; PENNA, C.; PAGLIARO, P.; et al. Morphological characterization of GFP stably transfected adult mesenchymal bone marrow stem cells. *J. Anat.*, v. 208, p. 3-12, 2006.

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

RIEMERSMA, D.J.; BRUYN, P. DE. Variations in cross-sectional area and composition of equine tendons with regard to their mechanical function. *Res. Vet. Sci.* v. 41, p. 7-13, 1986.

ROSENBROCK, A., JACOBI, R., JAUGSTETTER H. et al. Autologous bone-marrow transplantation to stimulate suspensory ligament regeneration in 24 horses – a clinical case control study. In: ANNUAL EUROPEAN SOCIETY OF VETERINARY ORTHOPAEDICS AND TRAUMATOLOGY CONGRESS, 12, 2004, Munich, *Proceedings...* Munich: ESVOT , 2004. Disponível em:

[www.ivis.org/proceedings/esvot/2004/FreeCom/rosembrock1.pdf](http://www.ivis.org/proceedings/esvot/2004/FreeCom/rosembrock1.pdf). Acesso em: 23 jul. 2007.

SHARMA, P.; MAFFULLI, N. Biology of tendon injury: healing, modeling and remodeling. *J. Musculoskelet Ineract.* v.6, n. 2, p. 181-190, 2006. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com>. Acesso em: 18 mar. 2007.

SHENFIELD, F.; PENNING, G.; SUREAU, C. Stem cells. *Hum. Reprod.* v. 17, n. 5, p. 1409-1410, 2002.

SMITH, R.K.W. Stem cells therapy for tendon and ligament injuries-clinical results. In: ANNUAL EUROPEAN SOCIETY OF VETERINARY ORTHOPAEDICS AND TRAUMATOLOGY CONGRESS, 12, 2004, Munich, *Proceedings...* Munich: ESVOT , 2004. Disponível em: [www.ivis.org/proceedings/esvot/2004/LA/smith1.pdf](http://www.ivis.org/proceedings/esvot/2004/LA/smith1.pdf). Acesso em: 23 jul. 2007.

SMITH, R.K.W.; WEBBON, P.M. Harnessing the stem cell for the treatment of tendon injuries: heralding a new dawn? *British J. Sports Med.* v. 39, p. 582-584, 2005. Disponível em: <http://www.bjsportmedicine>. Acesso em: 20 mar. 2007.

SOARES, C. Manutenção interna. *Scientific Am. Brasil.*, n. 39, 70-73, 2005.

SOUZA, F.A.A. Uma visão de agrobusiness. *Rev. Ed. Cont. CRMV-SP*, v.2, n.3, p.38-45, 1999.

SPEIRS, V.C. *Exame clínico de equinos*. Porto Alegre: Artmed, 1999.p.366.

STASHAK, T.S. *Adam's Lameness in horses*. 4.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1987. p. 139-141.

STEPHENS, P.R.; NUNAMAKER, D.M.; BUTTERWECK, D.M. Application of a hall-effect transducer for measurement of tendon strains in horses. *Am. J. Vet. Res.* v. 50, p. 1089-1095, 1989.

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

Disponível em: <http://www.elsevier.com.br>  
Acesso em: 03 jan. 2008.

VAN SCHIE, H.T.M., BAKKER, E.M., VAN WEEREN, P.R. Ultrasonographic evaluation of equine tendons: a quantitative in vitro study of the effects of amplifier gain level, transducer-tilt, and transducer-displacement. *Vet. Radiol. Ultrasound*, v.39, n.5, p. 151-160, 1998.

VAN SCHIE, H.T.M., BAKKER, E.M., JONKER, A.M., et al. Ultrasonographic tissue characterization of equine superficial digital flexor tendons by means of gray level statistics. *Am. J. Vet. Res.*, v.61, n.2, p.210-219, 2000.

VET STEM. *Suspensory ligament desmitis*. Disponível em: [www.vetstem.com](http://www.vetstem.com) Acesso em: 10 fev. 2007.

VIDAL, M.A.; KILROY, G.E., LOPEZ M.J. et al. Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Vet. Surg.*, v.36, n.7, p.613-622, 2007.

WAGERS, A.J.; WEISSMAN, I.L. Plasticity in adult stem cells. *Cell*. v. 116, n. 5, p. 639-648, 2004.

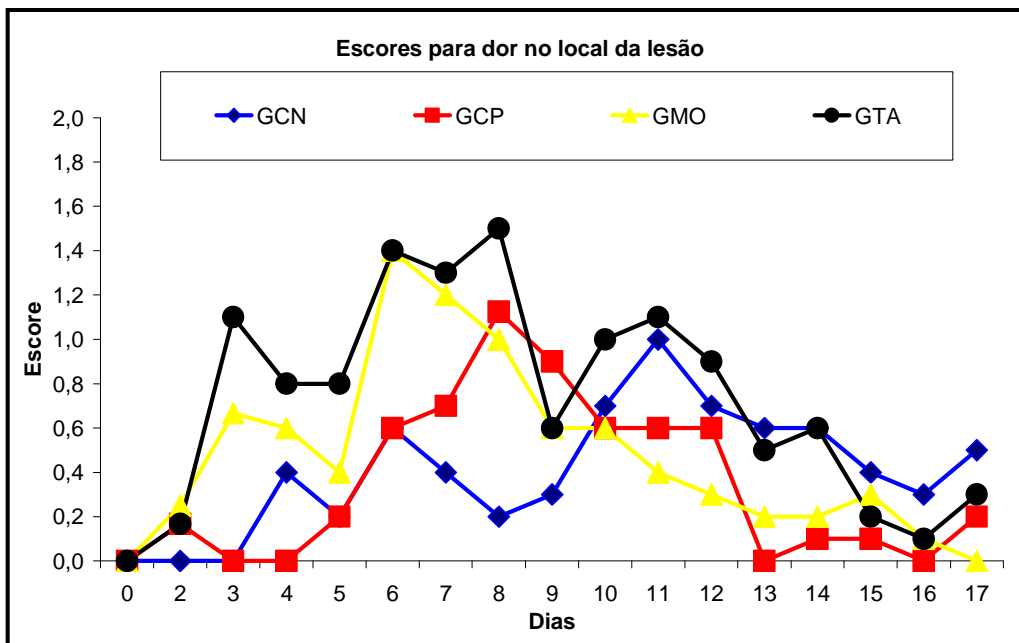
WHITCOMB, M. B. Ultrasonographic evaluation of the metacarpus, metatarsus, and pastern. *Clin. Tech. Equine Pract.* v. 3, n. 3, p. 238-255, 2004. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com>. Acesso em: 18 mar. 2007.

WILSON, D.A.; BAKER, G.J.; PIJANOWSKI, G.J.; et al. Composition and morphologic features of the interosseous muscle in standardbreds and thoroughbreds. *Arq. J. Vet. Res.*, v. 52, n. 1, p. 133-139, 1991.

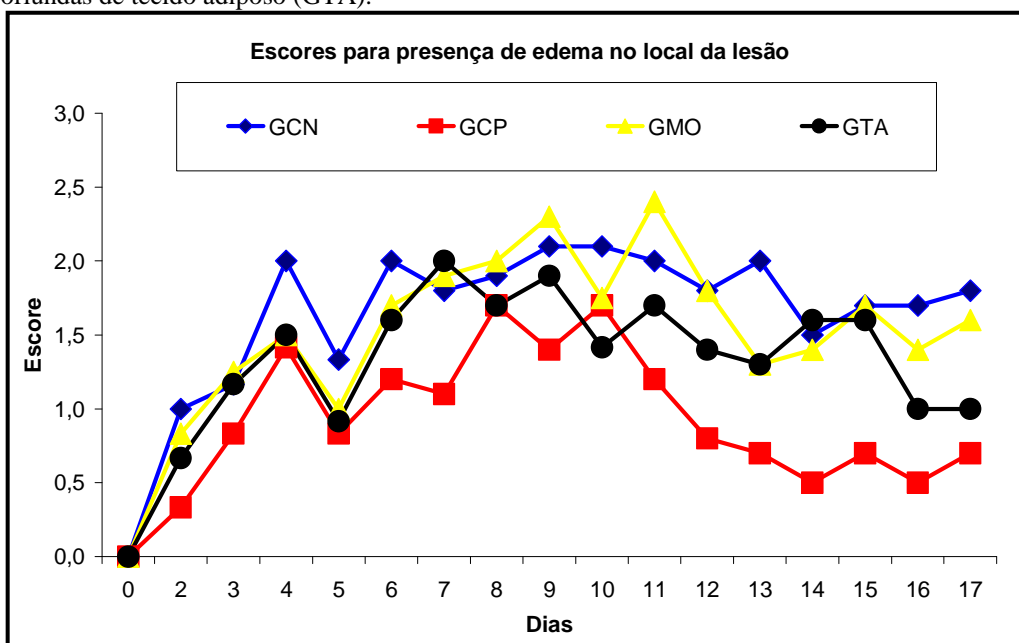
ZUK, P.A., ZHU, M., ASHIJIAN, P., et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell*, v.13, p.4279-4295, 2002. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com>. Acesso em: 18 mar. 2007.

## ANEXOS

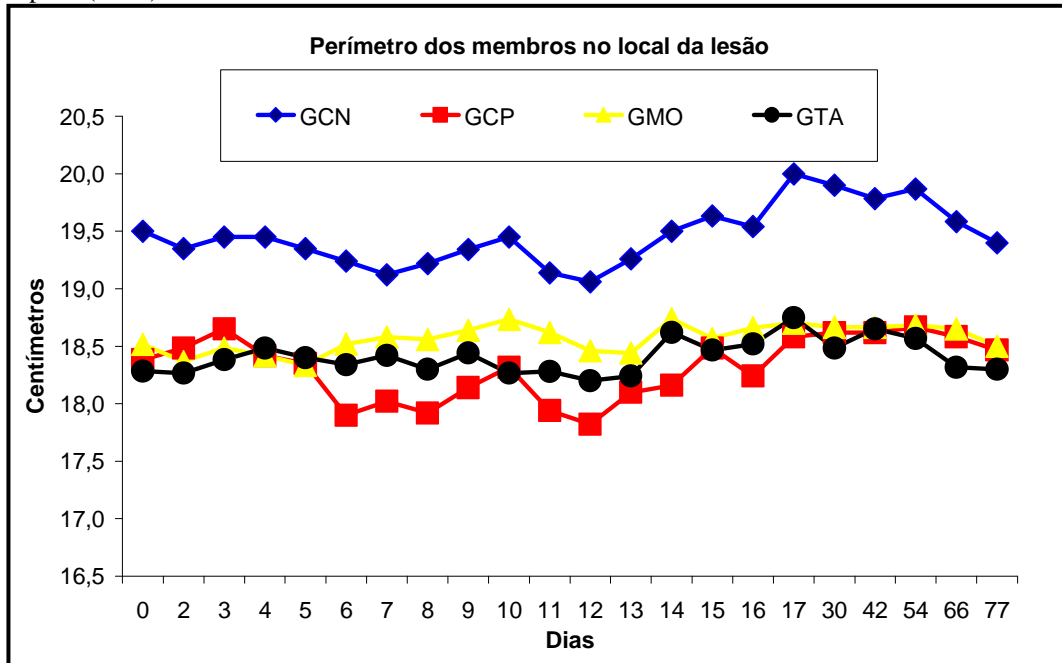
Anexo 1. Escores para presença de dor local em equinos submetidos a lesão no ligamento suspensório por meio de punch para biópsia de 0,6 mm sem tratamento (GCN) ou tratados com solução fisiológica (GCP) ou terapia celular com medula óssea (GMO) ou células oriundas de tecido adiposo (GTA)



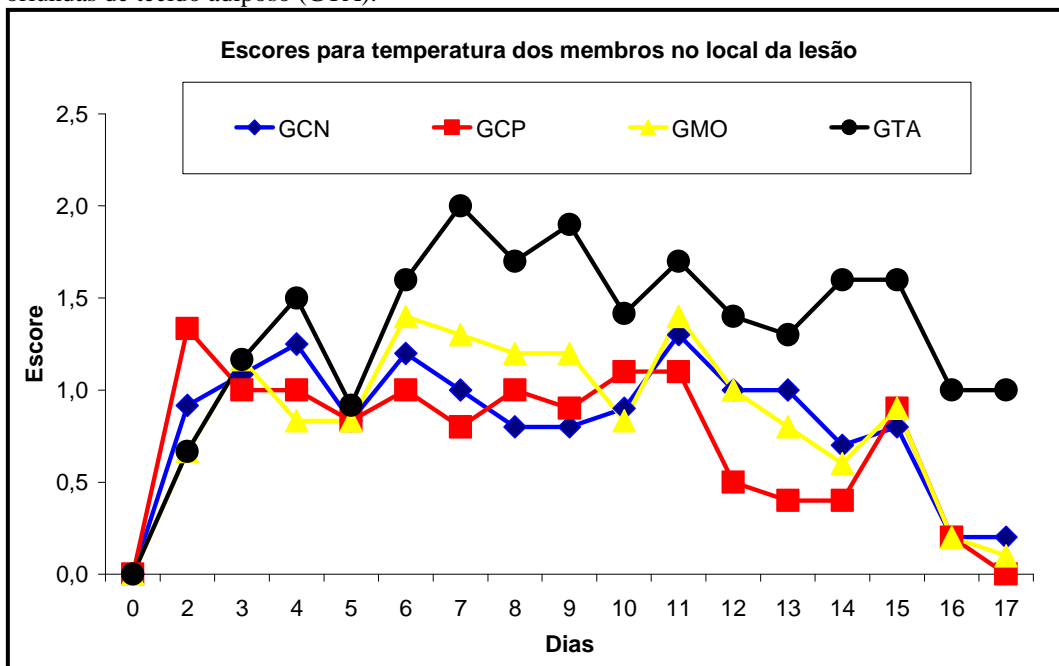
Anexo 2. Escores para presença de edema no local da lesão em equinos submetidos a lesão no ligamento suspensório por meio de punch para biópsia de 0,6 mm sem tratamento (GCN) ou tratados com solução fisiológica (GCP) ou terapia celular com medula óssea (GMO) ou células oriundas de tecido adiposo (GTA).



Anexo 3. Perímetro dos membros, no local da lesão, em equínos submetidos a lesão no ligamento suspensório por meio de punch para biópsia de 0,6 mm sem tratamento (GCN) ou tratados com solução fisiológica (GCP) ou terapia celular com medula óssea (GMO) ou células oriundas de tecido adiposo (GTA).



Anexo 4. Escores para presença de aumento de temperatura no local da lesão em equínos submetidos a lesão no ligamento suspensório por meio de punch para biópsia de 0,6 mm sem tratamento (GCN) ou tratados com solução fisiológica (GCP) ou terapia celular com medula óssea (GMO) ou células oriundas de tecido adiposo (GTA).



Anexo 5. Imagens digitalizadas de exames ultra-sonográficos do tipo palmar transversal de membro torácico direito do equino número 1. Observa-se na primeira imagem (a) o ligamento suspensório antes da indução da lesão. As imagens seguintes apresentam no centro do ligamento suspensório, lesão induzida por meio de punch para biópsia de 0,6 cm diâmetro aos 3 dias (b), 8 dias (c), 12 dias (d), 17 dias (e), 30 dias (f), 42 dias (g), 54 dias (h), 66 dias (i) e 77 dias (j) após a indução da lesão.

