

LÍVIA CAMARGO GARBIN

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA DE
DOIS PROTOCOLOS DE TERAPIA CELULAR NO REPARO
DO LIGAMENTO SUSPENSÓRIO EQUINO**

Escola de Veterinária da UFMG

Belo Horizonte

2012

LÍVIA CAMARGO GARBIN

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA
DE DOIS PROTOCOLOS DE TERAPIA CELULAR NO
REPARO DO LIGAMENTO SUSPENSÓRIO EQUINO**

Dissertação apresentada à Escola de
Veterinária da Universidade Federal
de Minas Gerais como requisito
parcial para obtenção de título de
Mestre em Medicina Veterinária.
Área: Ciência Animal
Orientador: Prof. Rafael Resende
Faleiros

Escola de Veterinária da UFMG

Belo Horizonte

2012

AGRADECIMENTOS

À Deus pela minha vida, força, saúde e pelas oportunidades de aprendizado e vivência que surgiram durante esse período de minha vida.

À minha família, em especial à minha mãe e meu irmão pelo eterno apoio à minha escolha profissional e auxílio em todas as horas.

Ao meu orientador Prof. Doutor Rafael Resende Faleiros, por ter acreditado em mim, por ter me oferecido a oportunidade do mestrado e pelos ensinamentos.

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

Ao Prof. Anilton e a equipe do Laboratório de Apoptose do ICB, principalmente a Soraia, por ter me auxiliado tanto durante o período de experimento.

Ao Professor Giovanni e à equipe do Laboratório de Patologia Comparada do ICB, pelos ensinamentos e grande apoio ao meu experimento.

Ao Dr. Frisbie e toda a equipe do Orthopaedic Research Center, pelo grande apoio ao meu experimento, ensinamentos e amizade.

Às amigadas que fiz durante minha viagem aos EUA, Kaydence, Ben, Nate, Jeremie, Dr. Lee que me auxiliaram muito em meus estudos e me receberam de braços abertos.

Aos orientados do Professor Rafael, Ingrid, Viviana, Pedro, Rodrigo, Jéssica e em especial a Heloísa, e todos os alunos de IC, pelo apoio e amizade.

Às minhas amigas Mirella e Isabel, pelo apoio, amizade e paciência nas horas mais críticas.

À todos os Professores e funcionários do Hospital Veterinário e da Escola de Veterinária da UFMG, pelos ensinamentos e apoio à mais esta etapa.

À CAPES pela concessão da bolsa.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	4
LISTA DE TABELAS.....	6
LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
1 INTRODUÇÃO.....	10
2 HIPÓTESE.....	10
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
3.1 ANATOMIA DO LIGAMENTO SUSPENSÓRIO EQUINO.....	11
3.1.1 Estrutura e composição dos ligamentos.....	11
3.1.2 Função, biomecânica e lesão ligamentar.....	13
3.1.3 Inflamação do tecido e cicatrização.....	14
3.2 TRATAMENTO DA DESMITE DO SUSPENSOR EM EQUINOS.....	16
3.2.1 Drogas utilizadas para o tratamento da desmíte do suspensório.....	16
3.2.2 Tratamentos fisioterápicos.....	17
3.3 TERAPIA CELULAR E CÉLULA-TRONCO.....	18
3.3.1 Conceito de célula-tronco.....	18
3.3.2 Tipos de célula-tronco, características e suas propriedades.....	19
3.3.3 Coleta, cultivo e caracterização das células-tronco.....	20
3.3.4 Uso da terapia celular nos tendões e ligamentos.....	22
3.4 AVALIAÇÃO DO REPARO DO LIGAMENTOS SUSPENSÓRIO.....	23
3.4.1 Avaliação Histológica e Imunoistoquímica.....	24
4 OBJETIVOS.....	25
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
5.1.1 Animais do experimento.....	25
5.1.2 Delineamento experimental.....	26
5.1.3 Indução das lesões.....	27
5.1.4 Colheita, processamento e cultivo das células oriundas do tecido adiposo.....	27
5.1.5 Colheita e processamento das células da medula óssea.....	28
5.1.6 Administração dos tratamentos	28
5.1.7 Coleta das amostras e processamento.....	28
5.2 Análise Histopatológico e Imunoistoquímica.....	28
5.2.1 Histologia.....	28
5.2.2 Imunoistoquímica.....	30
5.3 Análise Estatística.....	31
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
6.1 Análise do reparo ligamentar.....	31
6.1.1 Análise Histológica.....	31
6.1.1.1 Hematoxilina e Eosina e Tricômio de Massom.....	31
6.1.1.2 Pricosírius Red.....	36
6.1.2 Análise Imunoistoquímica para colágeno Tipo III.....	38
6.2 Outras considerações.....	41
7 CONCLUSÕES.....	44
8 REFERÊNCIAS.....	44

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Esquema do delineamento experimental. TA = tecido adiposo, MO = medula óssea..... 27
- Figura 2: Gráficos apresentando as variáveis estudadas na coloração H&E. Não houve diferença significativa para a contagem de fibroblastos, vasos e células inflamatórias entre os grupos. Porém houve maior escore para organização de fibras apresentado pelas amostras dos grupos MO e TA em relação aos demais grupos, apesar desta diferença não ser significativa ($P < 0,05$)..... 33
- Figura 3: Fotomicrografias de ligamentos suspensórios equinos lesionados, controles negativo (CN) e positivo (CP) e submetidos a terapia celular à base de medula óssea (MO) ou tecido adiposo (TA). Hematoxilina e Eosina (microscopia óptica, aumento de 400X). Em CN e CP, observa-se alta vascularização e desorganização de fibras. MO, observar maior paralelismo de fibras, neoformação vascular e hiper celularidade, TA, maior organização tecidual, fibroblastos com núcleo predominantemente ovalado indicando maior atividade..... 34
- Figura 4: Fotomicrografias de ligamentos suspensórios equinos lesionados controles negativo (CN) e positivo (CP) e submetidos a terapia celular à base de medula óssea (MO) ou tecido adiposo (TA), corados por tricômio de Masson (microscopia óptica, aumento 400X). MO e TA, apresentam maior paralelismo de fibras quando comparados aos grupos controle, CN e CP. Alta vascularização dos grupos controles. Observar fibras musculares coradas em vermelho em meio às fibras colágenas coradas em azul. As hemácias também coraram-se fortemente em vermelho, o que facilita a observação dos vasos e presença de hemorragia..... 34
- Figura 5: Fotomicrografias de ligamentos suspensórios equinos lesionados controles negativo (CN) e positivo (CP) e submetidos a terapia celular à base de medula óssea (MO) ou tecido adiposo (TA). Pricosírius Red (microscopia óptica sob luz polarizada, aumento 100X). MO e TA apresentam maior concentração de colágeno Tipo I, caracterizado pela maior birrefringência e coloração amarela. CN e CP apresentam maior concentração de colágeno Tipo III, caracterizado pela reduzida birrefringência e coloração verde. Observar alto nível de desorganização de fibras coradas em verde..... 36
- Figura 6: Médias e erros padrões dos graus de intensidade da presença de colágeno tipo I apresenta nos grupos tratados (MO e TA) e controles (CP e CN) obtidos por meio da coloração de pricosírius red. MO e TA apresentam diferença estatística ($P < 0,05$) com relação aos grupos controles. Barras seguidas de letras iguais não diferem entre si..... 37
- Figura 7: Correlação entre o alinhamento das fibras colágenas observado na coloração HE e a intensidade de colágeno tipo I obtida pela coloração pricosírius..... 38
- Figura 8: Fotomicrografia de ligamento sadio submetido à imunistoquímica para colágeno Tipo III. Observar marcação fraca e difusa na

amostra..... 39

Figura 9: Fotomicrografias de ligamentos suspensórios equinos lesionados controles negativo (CN) e positivo (CP) e submetidos a terapia celular à base de medula óssea (MO) ou tecido adiposo (TA). Marcação imunoistoquímica marrom (DAB, hematoxilina na contra-coloração) forte e difusa para colágeno Tipo III nas amostras dos diferentes grupos (microscopia óptica, aumento 400X). Observar ausência de marcação em regiões com alta celularidade em CN..... 40

Figura 10: Médias e erros padrões para porcentagem de área marcada por imunoistoquímica para colágeno Tipo III nos grupos tratados (MO,TA) e controles (CN e CP). Não há diferença estatística entre grupos ($P < 0,05$)..... 41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Distribuição dos diferentes tratamentos nos quatro membros de cada um dos seis animais do experimento (adaptado de Soares, 2008).....	26
Tabela 2: Escores para avaliação de paralelismo de fibras na coloração HE e concentração de colágeno Tipo I na coloração pricosírius red.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC (sistema): método avidina-biotina peroxidase
AINE: antiinflamatório não esteroidal
°C: graus celcius
CETEA: comitê de ética em experimentação animal
cm: centímetros
CN: controle negativo
CP: controle positivo
CO₂: gás carbônico
COMP: proteína oligomérica da matriz de cartilagem
DAB: diaminobenzina
DMSO: dimetilsulfóxido
DNA: ácido desoxirribo nucleico
HE: hematoxilina/ eosina
IGF: fator de crescimento similar à insulina
IL-1: interleucina 1
IL-6: interleucina 6
IV: intravenoso
kg: quilograma
mg: miligramas
mL: mililitros
MG: Minas Gerais
MO: medula óssea
PBS: solução tampão salina
PCR: reação de polimerase em cadeia
PGE₂: prostaglandina
SP: São Paulo
TA: tecido adiposo
TGF – β_1 : fator de crescimento transformador beta 1
VEGF: fator de crescimento vascular endotelial
VO: via oral
UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

RESUMO

O objetivo foi avaliar histologicamente a qualidade do reparo tecidual em amostras de ligamento suspensório equino tratadas com dois protocolos de terapia celular. Os quatro membros de seis animais foram operados simultaneamente para remoção de um fragmento com *punch* de biópsia. Dois dias após, cada um dos ligamentos recebeu aplicação local de fração mononuclear de medula óssea (MO), células mononucleares cultivadas derivadas de tecido adiposo (TA), soro fisiológico (CP) ou nenhum tratamento (CN) como controles. Dois meses após, foram realizadas biópsias dos ligamentos para análise histológica (HE, tricômio de Massom e pricosírius red) e imunoistoquímica (colágeno tipo III). Verificaram-se alinhamento de fibras, presença de células inflamatórias, presença de vasos e deposição de colágeno tipo I (pricosírius) e tipo III (imunoistoquímica). Os dados foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis. Apesar de não ter alcançado significância estatística ($P = 0,08$), verificou-se melhor alinhamento nos grupos tratados. Na deposição de colágeno tipo I, verificado pela coloração Pricosírius, não houve diferença com relação aos grupos tratados (MO e TA), sendo os valores superiores aos grupos controles. A presença de células inflamatórias e a intensa marcação para colágeno tipo III demonstram processo cicatricial em evolução em todos os grupos. Concluiu-se que os protocolos utilizados demonstraram potencial para o tratamento de lesões do ligamento suspensório equino, produzindo melhor deposição de colágeno tipo I no tempo estudado.

Palavras-chave: terapia celular, medula óssea, tecido adiposo, célula mononuclear, célula-tronco, equino, desmíte, ligamento suspensório.

ABSTRACT

The study aimed to histologically evaluate the quality of the repair tissue in equine suspensory ligament samples treated with two different protocols of cell therapy. The four members of six animals were operated simultaneously to remove a fragment with punch biopsy. Two days after, each ligament received local application of the mononuclear fraction of bone marrow (BM) derived mononuclear cells cultivated from adipose tissue (AT), saline (CP) or no treatment (CN) as controls. Two months later, biopsies were performed for histological analysis of the ligaments (HE, Masson trichrome and pricosirius red) and immunohistochemistry (collagen type III). It was observed for the study the fiber alignment, presence of inflammatory cells, presence of vessels and deposition of collagen type I (pricosirius) and type III (immunohistochemistry). Data were compared using Kruskal-Wallis test. Although no statistical significance ($P = 0.08$) was observed for fiber alignment, there was better alignment on the treated groups. For the deposition of collagen type I, verified by pricosirius staining, there was no difference between the treated groups (MO and TA) although the values were higher than control groups. The presence of inflammatory cells and intense staining for collagen type III demonstrate the healing process in all groups. In conclusion, the used protocols demonstrated potential for the treatment of equine suspensory ligament injuries, producing better deposition of collagen type I in the studied time.

Keywords: cell therapy, bone marrow, adipose tissue, mononuclear cell, stem cell, equine, desmitis, suspensory ligament.

1 INTRODUÇÃO

Durante milhares de anos a espécie *Equus caballus* sofreu uma série de adaptações ao ambiente, havendo uma modificação no apoio dos membros, passando de cinco para apenas um dedo. Consequentemente, a musculatura da porção distal dos membros também sofreu grandes modificações. Acredita-se que com a evolução, o antigo músculo interósseo médio dos equinos tenha perdido tecido muscular e adquirido características de ligamento, passando a ser denominado de ligamento interósseo, ligamento suspensor ou ligamento sesamoideo superior (Schwarzbach et al, 2008).

Como os ligamentos são submetidos a altas cargas, tanto fisiologicamente quanto em atividades de alto impacto, as lesões tendíneas e ligamentares são muito frequentes em animais atletas e acarretam grandes prejuízos econômicos. Aparentemente, este tecido tem limitada capacidade de adaptação ao estresse após a maturação, contribuindo para o surgimento de lesões e degeneração progressiva. Dentre as lesões ligamentares, a de maior frequência é a desmíte do ligamento suspensório. Esta é importante causa de claudicação em equinos, seja ela primária ou compensatória, reduzindo o desempenho do animal (Dowling et al, 2000; McClure et al, 2004). As lesões que afetam tendões e ligamentos podem chegar a um terço em equinos de esporte. Especificamente em animais de corrida, esta porcentagem pode chegar a 43%, sendo considerada a principal causa do afastamento de animais Puro-Sangue Inglês (Goh et al, 2003; Halper et al, 2006; Nixon et al, 2008; Soares, 2008).

A desmíte afeta equinos de diferentes raças, idades e modalidades equestres (Dyson, 1994). Esta afecção é prolongada, reduzindo o desempenho dos animais atletas (McClure et al, 2004). O tratamento para esta afecção tem como objetivo a redução da inflamação, o estímulo ao reparo tecidual e a prevenção de recidivas após a retomada às atividades físicas (Nixon et al, 2008). São diversas as terapias empregadas na desmíte e abrangem desde o uso de antiinflamatórios até o uso de ondas de choque extra-corpóreo e fisioterapia. Apesar das novas técnicas de diagnóstico precoce e tratamento, o risco de recidivas pode atingir até 93% dos casos de desmíte do suspensor, principalmente nas modalidades de salto, adestramento e pólo (Dahlgren, 2007).

O interesse nesta afecção tem se tornado crescente havendo muitos investimentos em pesquisas direcionadas à fisiologia, etiologia e tratamento ligamentar, visando a obtenção de um tecido de qualidade funcional (Dahlgren, 2007). Novos métodos de tratamento vem sendo desenvolvidos no sentido de modular o processo de cicatrização, promovendo melhor tecido de reparo, mais semelhante à arquitetura original do tecido (Nixon et al, 2008).

A terapia celular tem como objetivo a reposição, reparo e o aumento das funções biológicas dos tecidos lesionados por meio de células autólogas ou alogênicas, uma vez que estas se diferenciariam nas células específicas do tecido lesado, produzindo matriz saudável. A disponibilidade desta terapia tem permitido a aplicação a campo com relativo sucesso. Esta terapia visa a granulação precoce da ferida, a maximização da produção de colágeno Tipo I, otimizar a organização das fibrilas e a elasticidade, além de reduzir a permanência do tecido cicatricial, para auxiliar desta maneira na retomada da atividade do animal com eficácia (Sutter, 2007).

2 HIPÓTESE

O emprego da terapia celular por meio de dois protocolos de tratamento (uso de células frescas obtidas da medula óssea e células-tronco mesenquimais obtidas do cultivo de células do tecido adiposo) melhora, experimentalmente, a qualidade tecidual no reparo do ligamento suspensório quando comparado a lesões não tratadas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ANATOMIA DO LIGAMENTO SUSPENSÓRIO EQUINO

3.1.1 Estrutura e composição dos ligamentos

O ligamento suspensório, também denominado músculo interósseo ou ligamento sesamóide superior contém pouco tecido muscular sendo transformado em uma faixa tendínea bifurcada distalmente. A principal função do ligamento suspensório é evitar a superextensão da articulação metacarpo/metatarsofalangeana durante o apoio do membro, assim como limitar a flexão das articulações interfalangeanas através dos ramos extensores e restaurar a energia de impacto e apoio do membro durante o movimento (Soares, 2008).

Os ligamentos e tendões são compostos por tecido conjuntivo denso, formado por bandas de colágeno paralelas dispostas longitudinalmente que promovem ou induzem os movimentos articulares (Woo et al, 2000). Os ligamentos, na maior parte das vezes, ligam os ossos e dão estabilidade para a movimentação dos mesmos. Com relação à composição, os ligamentos são muito semelhantes aos tendões. Os filamentos de colágeno constituem os fascículos que são a unidade formadora do tendão (Kobayashi et al, 1999). Segundo estudos, os tendões não são homogêneos ao longo de sua estrutura, pois a produção de matriz pelas células pode variar conforme a região, comprometendo as propriedades mecânicas do tendão, inclusive após a maturidade de acordo com o estímulo de tensão e compressão o qual são submetidos (Dowling et al, 2000; Goh et al, 2003; Dowling e Dart 2005; Doroski, Brink e Temenoff, 2007).

A quantidade de tecido muscular estriado no interior do ligamento suspensório é variável e parece ser mais frequente em animais jovens. Esta diferença na quantidade muscular presente nas diferentes raças pode estar relacionada a diferenças biomecânicas entre os andamentos ou a fatores genéticos. O desuso, a idade e predisposição genética podem reduzir o conteúdo muscular do ligamento suspensório (McIlwraith, 2006; Halper et al, 2006; Soares, 2008).

Os tendões e ligamentos são compostos por componente celular e uma matriz extracelular. O componente celular é formado predominantemente por fibroblastos, além de outros tipos celulares (células de fibrocartilagem e células de gordura em alguns casos). Os fibroblastos são células fusiformes, com núcleos alongados, esparsamente localizados entre as fibras de colágeno da matriz extracelular e são responsáveis pela manutenção da matriz. Estas células respondem às mudanças biomecânicas de carga que estes tecidos são submetidos (Goh et al, 2003; Doroski, Brink e Temenoff, 2007).

De acordo com o trabalho realizado por Scutt, Rolf e Scutt (2008), as células dos tendões e ligamentos são muito semelhantes biologicamente e metabolicamente. Contudo, devido às diferentes vascularizações, aos diferentes estresses mecânicos que estes tecidos são submetidos, os tendões e ligamentos irão possuir características únicas, que devem ser consideradas antes de submeter o animal a qualquer terapia.

A matriz extracelular dos ligamentos é composta por água (60%), proteoglicanos, elastina, colágeno e glicoproteínas que são responsáveis por 40% da matriz. Os tipos de colágeno predominante no ligamento são o colágeno Tipo I (aproximadamente 90%) e Tipo III (aproximadamente 10%). Apesar dos tendões e ligamentos serem muito semelhantes, existem diferenças bioquímicas entre estes dois tecidos. Os ligamentos são mais ativos metabolicamente. Estes possuem maior conteúdo celular, maior concentração de DNA e maior número de ligações cruzadas entre as fibras de colágeno (Goh et al, 2003).

O colágeno é o principal componente da matriz extra-celular responsável por conferir grande força mecânica ao tecido, já a elastina e os proteoglicanos são responsáveis pela resiliência da matriz. A elastina parece também apresentar função estrutural (Montes, 1996; Kew et al, 2011). A fibra de colágeno por sua vez é composta por uma super-hélice formada por três hélices menores, promovendo a formação de uma estrutura de alta força de tensão e baixa elasticidade. A sequência básica de peptídeos que forma as hélices menores consiste em repetições de glicina-prolina-hidroxiprolina (Doroski, Brink e Temenoff, 2007).

O colágeno apresenta grande capacidade de formar ligações cruzadas entre as moléculas que o compõe, estando relacionadas às propriedades físicas do tecido (Kobayashi et al, 1999). Essas ligações cruzadas estabilizam as fibras de colágeno, aumentando sua força de tensão. O número de ligações cruzadas entre as fibrilas de colágeno e as ligações eletrostáticas provenientes de proteínas não-colagenosas, parecem contribuir significativamente para as propriedades biomecânicas de ligamentos e tendões (Dowling et al, 2000).

Os fascículos de colágeno dispostos em forma de onda, são denominados de *crimp*, e são responsáveis por promover a capacidade de absorção do impacto que o tecido sofre. O *crimp* exerce importante papel na elasticidade do tendão nos estágios iniciais de sua extensão quando o mesmo é submetido à atividade. Os diferentes tipos de colágeno apresentam diferentes funções no tecido tendíneo e ligamentar. As fibras de colágeno tipo I, II e III são responsáveis pela manutenção da arquitetura e rigidez tecidual. O colágeno tipo I é responsável por produzir fibras espessas dando resistência ao tecido. O colágeno tipo III forma fibras de calibre menor que interagem com a fibras de colágeno tipo I e são responsáveis pela elasticidade dos tendões (Montes, 1996; Satomi et al, 2008).

A largura das bandas de colágeno, a amplitude do *crimp* e a razão colágeno Tipo I: III podem variar de acordo com o ligamento e idade do animal. A proporção destes tipos de colágeno determina as propriedades mecânicas do tecido (Dowling et al, 2000; Dahlgren, 2007; Doroski, Brink e Temenoff, 2007; Soares, 2008; Kew et al, 2011).

No colágeno imaturo, há a formação de ligações cruzadas de diidroxilisinoleucina e hidroxilisinoleucina. O ligamento imaturo apresenta apenas cadeias de colágeno $\alpha 1$ e as ligações cruzadas se apresentam em menor quantidade. Este tipo de cadeia de colágeno é mais sensível à ação das proteases, fato essencial para o remodelamento no processo de reparo. O grau de hidroxilação do resíduo de lisina está relacionado à estabilidade da ligação cruzada (Provenzano et al, 2002a; Doroski, Brink e Temenoff, 2007).

Proteoglicanos altamente hidratados promovem um melhor amortecimento e lubrificação tecidual, permitindo o deslizamento entre os fascículos que o compõe. Os proteoglicanos contribuem para capacidade visco-elástica do ligamento. Estes são formados por cadeias compostas por glicosaminoglicanos ligados a um núcleo protéico. Os glicosaminoglicanos

possuem carga negativa, se repelindo e formando uma estrutura em forma de “escova” que atrai água, hidratando a estrutura. O proteoglicano mais abundante no tecido tendíneo é o decorin. Esse é um proteoglicano que permite a adaptação do tecido às forças de tensão, não permitindo a formação de fibras muito grandes (Goh et al, 2003; Doroski, Brink e Temenoff, 2007).

O agrecan é outro proteoglicano que se encontra em maior concentração onde o tecido é submetido a forças compressivas. Este potencial do agrecan se deve ao fato de que esta estrutura apresenta alta carga negativa, criando um expressivo gradiente osmótico e atraindo água, resultando em grande resistência às forças compressivas. Há ainda outros proteoglicanos como o biglican, a fibromodulina, lumican e versican que influenciam no diâmetro da fibra de colágeno, fibriologênese, na proliferação celular e sua migração e no potencial visco-elástico da substância amorfa adjacente às células (Dowling et al, 2000; Doroski, Brink e Temenoff, 2007).

Os tendões e ligamentos possuem ainda outras proteínas em sua matriz como a tenascina-C, que se associa à fibronectina, sendo regulada pelo aumento de carga que o tecido é submetido. Esta proteína apresenta capacidade de regular fatores de crescimento e inibir a adesão celular dependente da proteína β_1 integrina. Esta proteína é encontrada em maior concentração em ligamentos e tendões, quando comparada a outros tecidos do aparato locomotor, sendo utilizadas como marcadores destes tecidos (Doroski, Brink e Temenoff, 2007).

3.1.2 Função, biomecânica e lesão ligamentar

A principal função dos tendões e ligamentos é a transmissão de força (Woo et al, 2000). Suas propriedades mecânicas estão relacionadas à elasticidade, viscosidade, plasticidade, fricção e tensão. A espessura tendínea está relacionada à tensão a qual o mesmo é submetido (Dowling e Dart, 2005).

Os tendões e ligamentos transmitem carga com mínima deformação e perda de energia. Apesar disso, para cada ciclo de movimento, parte da energia é dissipada, por exemplo na forma de calor. A princípio estes tecidos são perfeitamente elásticos quando submetidos a uma força de até 4%, ocorrendo o desenrolamento do *crimp*. Contudo, quando a força excede 4%, os tendões e ligamentos passam a apresentar propriedades visco-elásticas, resultante da interação complexa de diversos constituintes da matriz. O tecido tende a apresentar uma resposta linear à força a qual é submetido, sendo caracterizada pela perda do “crimp”. Se a tensão continua, ocorre a formação de micro-lesões das fibras, evoluindo para lesões macroscópicas (Woo et al, 2000; Goh et al, 2003; Dowling e Dart, 2005).

As fibrilas localizadas ao centro do tendão podem atingir o desenrolamento do *crimp* antes que as fibrilas da periferia do tendão, resultando na sobrecarga seletiva de algumas fibras que podem vir a romper antes que outras. Isto resulta na distribuição desuniforme da carga facilitando a ocorrência de lesões (Dowling et al, 2000; Rees, Maffulli e Cook, 2009). Estas rupturas ocorrem devido à sobrecarga prolongada e/ou repetitiva. Esse estresse resulta em mudanças das propriedades mecânicas da matriz (Rees, Maffulli e Cook, 2009).

Durante o galope, o tendão flexor superficial sofre um alongamento de 11 a 16%, que é muito próximo ao ponto de ruptura (até 21%). Portanto, principalmente em animais atletas, o tendão é submetido a um esforço muito próximo ao seu limite fisiológico. Consequentemente qualquer alteração na composição e/ou manutenção da matriz tecidual pode comprometer o tecido drasticamente (Dowling et al, 2000; Richardson et al, 2007).

O ligamento suspensório pode ser dividido em três regiões que podem ser lesionadas; a porção proximal, o corpo do ligamento e os ramos (Dyson, 2000). A lesão ligamentar envolve fatores internos e externos, sendo portanto multifatorial. Fatores como a hipertermia, resultante da dispersão de parte da energia do movimento em calor, pode elevar a temperatura do tendão em até 45°C, podendo causar danos na matriz. Apesar de alguns autores acreditarem que a isquemia e reperfusão, com consequente produção de radicais livres, podem ter um papel importante na lesão tendínea e ligamentar, outros autores acreditam que isso seja pouco provável pela boa rede vascular que alguns destes tendões (tendão flexor superficial) apresentam. Em trabalho realizado por Dowling et al, 2000 foi verificado que este tendão apresenta fluxo sanguíneo semelhante ao músculo e que este fluxo se torna mais intenso à medida que o animal é exercitado. Os autores também acreditam que não há verificação da hipóxia celular, *in vivo* (Dowling et al, 2000; Dahlgren, 2007).

O sistema nervoso também parece exercer um papel importante no processo da tendinite. A degranulação de mastócitos mediados pelo sistema nervoso promove a liberação de substância P e calcitonina. Essas atuam como agentes pró-inflamatórios e foram encontradas em elevada concentração, assim como o neurotransmissor glutamato, em tendões lesionados em humanos. Contudo, a participação destes fatores não é muito bem elucidada e não explica o porquê certas patologias tendíneas não são sempre dolorosas (Rees, Maffulli e Cook, 2009).

Fatores como idade do animal, genética, peso, sexo, respostas do organismo à imobilização ou mobilização (no caso de articulações), tensão, grau de hidratação tecidual e exercício podem alterar propriedades mecânicas do tecido. Após atingir a maturidade, os tecidos tendíneo e ligamentar possuem pouca capacidade de desenvolvimento e adaptação, aumentando a probabilidade de lesões e fadiga (Dowling et al, 2000). Os tendões atingem a maturidade no equino com aproximadamente dois anos de idade, a partir de então, os tendões passam a se tornar mais rígidos o que pode estar associada redução do *crimp*, aumento do número de ligações cruzadas e redução do tamanho do fascículo, que por sua vez pode estar associado a maior susceptibilidade à lesão, e não a um processo degenerativo em si (Rees, Maffulli e Cook, 2009). Inclusive em uma mesma articulação, os ligamentos podem ter propriedades mecânicas diferentes. De acordo com McClure et al (2004), muitos autores relatam que há diferenças entre os processos de cicatrização de acordo com a região afetada do ligamento suspensório (Woo, Chan e Yamaji, 1997; Woo et al, 2000).

3.1.3 Inflamação do tecido ligamentar e cicatrização

De modo geral, o processo de cicatrização da lesão envolve três fases; a inflamação, a regeneração ou reparo e o remodelamento. A resposta inflamatória aguda ocorre logo após a lesão, podendo perdurar por até 72 horas. Nesta fase há o influxo de neutrófilos, monócitos, macrófagos e linfócitos T (Chamberlain et al, 2011b), sendo caracterizada pelo debridamento tecidual e liberação de citocinas, realizados por essas células. A fase proliferativa têm início 48/72 horas após a lesão podendo persistir por até seis meses. Nesta fase ocorre hemorragia e influxo de fibroblastos, macrófagos, células endoteliais e células mesenquimais tendíneas que migram ao local da lesão e levam à produção de tecido de granulação e de fibras de colágeno de menor diâmetro, dispostas de modo aleatório.

Neste caso, os neutrófilos podem persistir se houver alguma infecção ou dependendo da gravidade da lesão. Os macrófagos que migram para o local de lesão, são os macrófagos da

circulação (tipo 1), que somente serão encontrados nestes tecidos em caso de lesão. Já os macrófagos residentes (tipo 2) do tecido possuem funções diferentes, estimulando a proliferação e diferenciação celular, angiogênese e regulando a resposta inflamatória no processo de reparo, pela liberação de citocinas anti-inflamatórias e inibindo a liberação de óxido nítrico. Assim, os macrófagos formam uma rede balanceada regulatória para a resposta imune no processo de reparo (Chamberlain et al, 2011b). A maior concentração de macrófagos tipo 1 com relação ao tipo 2, resulta na formação de tecido de granulação exacerbado. A fibrose crônica é resultado da resposta demasiada dos macrófagos na ausência do debridamento (Kobayashi et al, 1999; Woo et al, 2000; Richardson et al, 2007; Chamberlain, Crowley e Vanderby, 2009; Chamberlain et al, 2011a).

A interleucina 4 (IL-4) auxilia, entre outras funções na proliferação de macrófagos do tipo 2. O aumento da sua concentração resulta em uma produção elevada de colágeno (Tipo I) e outros componentes da matriz pelos fibroblastos, além de reduzir a liberação de citocinas pró-inflamatórias. Contudo, segundo estudos a IL-4 parece ter efeito dependente de tempo, sobre os fibroblastos. Esta interleucina, em estudo, permitiu o aumento na cicatrização ligamentar de ratos na fase inflamatória, mas não além desta, na dose utilizada (Chamberlain et al, 2011a).

O tecido neoformado funciona como uma matriz provisória durante o processo de reparo, sendo composto predominantemente por colágeno Tipo III, conferindo elasticidade mas não resistência do tecido de reparo (Richardson et al, 2007; Chamberlain et al, 2011b). Finalmente, na fase de remodelamento, ocorre a liberação de metaloproteinases pelos macrófagos degradando a matriz (Chamberlain et al, 2011a), reorganizando as fibrilas de colágeno e ocorrendo a apoptose de muitos tipos celulares (fibroblastos, células inflamatórias e endoteliais). O colágeno Tipo III aos poucos é substituído pelo colágeno Tipo I, indicando remodelamento progressivo do tecido. (Dowling et al, 2000). Porém, esta fase pode perdurar por até dois anos e a recuperação completa do tecido pode nunca ocorrer, podendo levar o tecido a um posterior processo de degeneração (Kobayashi et al, 1999; Woo et al, 2000; Chamberlain, Crowley e Vanderby, 2009).

O fatores de crescimento são pequenos polipeptídeos sintetizados por diversos tipos celulares no sistema músculo-esquelético que participam deste processo de reparo ligamentar. Estes fatores se ligam à superfície celular, estimulando a transdução de uma série de sinais intra-celulares, resultando na formação e liberação de uma série de proteínas relacionadas ao reparo. Alguns fatores de crescimento regulam a expressão e a concentração de outros fatores. Essa regulação ocorre através da modulação dos receptores da superfície da membrana celular. Em animais mais velhos, a maturidade esquelética reduz a estimulação dos fatores de crescimento sobre os fibroblastos (Woo, Chan e Yamaji, 1997). Este provavelmente é um dos fatores responsáveis pelo fato de ligamentos de animais mais jovens se recuperarem mais rapidamente de lesões que animais mais velhos (Provenzano et al, 2002a).

Entre os fatores de crescimento que participam deste processo podem ser citados o fator de crescimento similar à insulina (IGF-1) e o fator de crescimento transformador β -1 (TGF β -1). A ação desses fatores tem sido estudada em tendões, o TGF β -1 demonstrou estimular *in vitro* a produção de COMP e a replicação de tenócitos. Já o IGF-1 apresentou propriedades anti-inflamatórias em tendões de ratos além de aumentar a concentração de colágeno e conteúdo celular em estudos. O fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) apresenta a concentração aumentada durante o reparo regulando a angiogênese, permeabilidade vascular, síntese de colágeno, proliferação e migração celular e inibe a apoptose (Woo et al, 2000; Dowling e Dart, 2005; Chamberlain, Crowley e Vanderby, 2009).

Existe certa controvérsia sobre o processo inflamatório nas lesões ligamentares e tendíneas. A inflamação parece ter participação apenas no início da lesão e não na sua propagação e progressão. Aparentemente, modificações na síntese de matriz extracelular resultantes deste processo inicial seriam as principais responsáveis por interferir em nas propriedades físicas e estruturais de ligamentos e tendões (Satome et al, 2008).

Sobre condições fisiológicas, há um equilíbrio entre as atividades anabólicas e catabólicas no tecido, havendo a degradação de componentes da matriz pelas metaloproteinases e a produção de proteínas de reposição. As principais proteínas que controlam este processo são as metaloproteinases (responsáveis pela degradação e remodelamento) e as proteínas inibidoras das metaloproteinases (inibem a atividade desta enzima) (Dahlgren, 2007)

As lesões ou microlesões ocorrem devido à sobrecarga, ou sobreuso do tecido (Woo et al, 2000). O acúmulo de microlesões, a idade, a conformação desfavorável e o exercício, juntamente com uma habilidade limitada de adaptação e uma margem muito estreita de atuação, acarretam fadiga tecidual. A lesão leva à liberação de mediadores inflamatórios como prostaglandina E₂ (PGE₂), interleucina-1 (IL-1), e interleucina-6 (IL-6) que são envolvidas na resposta inflamatória e portanto na sintomatologia da afecção (Woo et al, 2000; Dowling e Dart, 2005).

O ligamento apresenta, baixa capacidade de reparo após lesão. Inclusive alguns ligamentos, dependendo da sua localização apresentam pior capacidade de reparo que outros (Woo et al, 2000; Goh et al, 2003). Sabe-se que tendões e ligamentos necessitam de mais de 12 meses para cicatrizar completamente, formando um tecido inferior mecanicamente e bioquimicamente anormal na sua composição e arquitetura. Esta situação é ainda mais relevante no ligamento suspensório, onde a presença de células musculares é prejudicial para o processo de reparo, tornando o processo ainda mais lento (Kobayashi et al, 1999; Provenzano et al, 2002b; McClure et al, 2004; Chamberlain, Crowley e Vanderby, 2009).

3.2 TRATAMENTO DA DESMITE DO SUSPENSÓRIO EM EQUINOS

Os tratamentos de lesões ligamentares e tendíneas tradicionalmente envolvem a redução da inflamação, retomada da flexibilidade tecidual e reparo cirúrgico (Melvin et al, 2006).

O tratamento da desmíte do suspensório consiste basicamente uso de antiinflamatórios sistêmicos (não-esteroidais) e repouso na fase inflamatória, seguida de exercícios controlados na fase de maturação. O repouso varia muito conforme as anormalidades encontradas nos exames (físico e complementares) e a evolução do quadro. Geralmente, o repouso recomendado é de aproximadamente 60 dias, sendo submetido a exercícios controlados (ao passo, puxado no cabresto) posteriormente (Soares, 2008).

Vários outros tratamentos têm sido utilizados como, injeções intra-lesionais, terapia com corticóides, injeções peri-ligamentares de contra-irritantes e agentes esclerosantes, aplicação de terapia celular e casqueamento corretivo, que serão mencionados em seguida. Alguns autores ainda citam a ponta de fogo, mas seu uso é contraditório (McClure et al, 2004; McIlwraith, 2006).

3.2.1 Fármacos utilizados para o tratamento da desmíte do suspensório

Os antiinflamatórios, de modo geral, inibem alguma via do sistema enzimático que converte o ácido aracdônico em prostaglandina e tromboxana. Contudo, tais fármacos em doses mais altas inibem a atividade de uma série de enzimas, síntese de proteoglicanos e fluxo iônico transmembranoso (McIlwraith, 2006).

A fenilbutazona é o AINE (antiinflamatório não esteroideal) mais utilizado, possui potente efeito analgésico pela inibição de PGI – E₂ e parece exercer alguma influência espinhal no mecanismo da dor. As doses recomendadas são 2,2 mg/kg uma ou duas vezes ao dia ou 4,4 mg/kg (IV ou VO), podendo ser aplicada uma (mais recomendado) ou duas vezes ao dia. Pode ser utilizada ainda na dose de 8,8 mg/kg porém por poucos dias, pois é altamente tóxica. Doses elevadas de fenilbutazona podem levar às úlceras gastrointestinais (inclusive na cavidade oral quando dado por essa via), necrose de papila renal e trombose vascular. A fenilbutazona deve ser aplicada cautelosamente em pacientes idosos ou debilitados, pela reduzida capacidade de metabolismo (McIlwraith, 2006).

O flunixin meglumine pode ser utilizada na dose de 1,1 mg/kg uma vez ao dia (IV ou VO), atingindo seu pico máximo de duas a 16 horas após a aplicação. O flunixin mostrou evidência de um efeito acumulatório no foco de lesão. A toxicidade desta droga é muito menor que a fenilbutazona, contudo muitas vezes a fenilbutazona é utilizada pelo melhor custo benefício. O carprofeno pode ser utilizado na dose de 0,7 mg/kg uma vez ao dia. Este fármaco reduz a produção de eicosanóides, porém não tão eficazmente quanto a fenilbutazona. O cetoprofeno (2,2 mg/kg a cada 24 horas) parece ter ação *in vitro* sob a cicloxigenase e 5-lipoxigenase, mas a fenilbutazona se mostrou mais efetiva também (McIlwraith, 2006).

No entanto, em estudos relatados por Rees, Maffulli e Cook (2009), foi demonstrado que a maior parte dos antiinflamatórios utilizados nas afecções tendíneas em humanos, com exceção do ibuprofeno, exerceram atividade deletéria no processo de cicatrização tecidual. Os autores acreditam que inibidores seletivos e não seletivos de cicloxigenase devem ser utilizados criteriosamente na inflamação aguda e no pós-operatório de cirurgias ortopédicas.

Um fármaco de ação anti-inflamatória muito utilizado em aplicação local ou sistêmica é o DMSO (dimetilsulfóxido), que promove redução do edema nos tecidos moles, possui função de inativar radicais de superóxido e aumentar a penetração de vários agentes através da pele. Também há relatos que este agente promove vasodilatação (McIlwraith, 2006).

O emprego de glicosaminoglicanos polissulfatados no local da lesão, pode ser benéfico pelo seu efeito inibidor das metaloproteinases e serinoproteinases. Mais além essa classe de fármacos inibe PGI-E₂, demonstrou reduzir a degradação de proteoglicanos em tenócitos e aumenta a síntese de glicosaminoglicanos (McIlwraith, 2006).

A aplicação local de blíster (iodo/óleo de amendoim) também é uma alternativa utilizada para a desmiste do suspensório (Soares, 2008).

3.2.2 Tratamentos fisioterápicos

O emprego de gelo e água ou botas com turbilhonamento tem sido muito utilizado na atualidade, podendo auxiliar na redução da inflamação e promover conforto ao animal (McIlwraith, 2006). O emprego em conjunto da crioterapia e compressão exercem efeitos sobre

a microcirculação, reduzindo o fluxo sanguíneo, preservando a saturação de oxigênio tecidual e facilitando o retorno venoso (Rees, Maffulli e Cook, 2009).

O uso de ondas de choque extra-corpóreo para o tratamento da desmiste do suspensório tem sido muito utilizado na Europa e nos Estados Unidos. Estas ondas são ondas de pressão geradas fora do corpo e que são focalizadas em uma região específica a ser tratada. Elas são caracterizadas por altas pressões positivas (acima de 100 MPa) e pressões negativas menores de 5 a 10 MPa. Estas ondas atravessam os fluidos e tecidos e seu efeito ocorre quando há uma mudança na impedância que ocorre, por exemplo, nas interfaces osso/tecido mole. Quando estas ondas encontram a mudança da impedância, esta gera um efeito compressivo e de cisalhamento sobre o tecido. A interação destes dois efeitos resulta na formação de bolhas de gás, que ao se colapsarem geram um fluxo rápido dos fluidos teciduais, auxiliando nos seus efeitos sobre o tecido. As ondas de choque também possuem efeitos sobre as células, estimulando o aumento da permeabilidade de membrana, a divisão celular e a produção de citocinas pelas células de medula (McClure et al, 2004).

Nos casos da desmiste degenerativa do suspensório, o exercício controlado é importante para o condicionamento físico dos animais e pode ter um efeito positivo sobre a marcha anormal associada à desmiste degenerativa (Xie et al, 2010).

O exercício estimula a mudança da carga a qual os ligamentos são submetidos, estimulando a atividade fibroblástica, tendo um efeito positivo sobre o reparo ligamentar, quando comparado a imobilização. Caminhadas com os animais sendo puxados pelo cabresto por um período maior que 12 meses após injúria foram descritas apresentando bons resultados, sendo o período de duração da fisioterapia extremamente crítico para a retomada do animal às atividades. Estes exercícios controlados parecem ter maior vantagem quando comparados a animais que permanecem soltos no pasto (Dowling et al, 2000; Xie et al, 2010).

3.3 TERAPIA CELULAR E CÉLULAS-TRONCO

Apesar da variedade de tratamentos convencionais, a taxa de recidivas para as lesões de tendões e ligamentos ainda é alta (Oliveira et al, 2011). Logo, novas abordagens da lesão como na terapia celular tem sido foco de grande interesse por parte de clínicos e pesquisadores. Um dos principais objetivos da terapia para a lesão destes tecidos é a redução da inflamação, a promoção da formação mínima de tecido cicatricial e promover a restauração da função normal do tecido (Kobayashi et al, 1999; Chamberlain et al, 2011a).

Estes objetivos são foco constante na engenharia de tecidos. Contudo, é importante saber qual o foco principal do tratamento, pois a abordagem terapêutica irá variar dependendo do objetivo deste. O clínico deve ter em mente se o foco do tratamento é a promoção do reparo, ou da regeneração tecidual. O reparo é a formação de um novo tecido, que apresenta características físicas e propriedades mecânicas semelhantes ao tecido original. Já a regeneração implica na formação de um novo tecido, com idêntica estrutura e função do tecido anterior (Doroski, Brink e Temenoff, 2007).

3.3.1 Conceito de célula-tronco

As células-tronco são células não especializadas, que podem dar origem a diversos outros tipos celulares. Estas células se replicam, dando origem a outras células idênticas e somente se diferenciam quando são estimuladas e recrutadas por tecidos lesionados. O microambiente em que a célula se encontra é de suma importância para a determinação do destino da célula em questão (Tuan, Boland e Tuli, 2002).

As células participam tanto de modo direto na reposição tecidual, participando ativamente do processo de regeneração, como podem servir de maneira indireta liberando sinais moleculares no processo de reposição tecidual (Chen et al, 2011).

A atual terapia celular visa a utilização de uma ou repetidas aplicações de células-tronco exógenas ou outras células progenitoras que poderiam repor ou manter os nichos de células-tronco nos tecidos ampliando sua capacidade regenerativa (Chen et al, 2011). Em animais adultos, estas células se originam de diversos tecidos como medula óssea, sangue, tendão, músculo, tecido adiposo entre outros. Estes tecidos podem ser utilizados para a obtenção das células para terapia autóloga (Nixon et al, 2008).

A aplicação das células-tronco têm despertado grande interesse por parte de pesquisadores pela sua capacidade regenerativa e de auto-renovação (Bue et al, 2008). Estas células podem ser aplicadas isoladamente ou com alguma substância “suporte”, que possa auxiliar na criação de um micro-ambiente adequado para esta célula atuar. Antes da aplicação, as células podem ser expostas a algum estímulo, seja físico, químico ou biológico (Chen et al, 2011).

Pelo fato de tendões e ligamentos apresentarem grande dificuldade no reparo, estes tecidos são ideais para o emprego da terapia celular. (Scutt, Rolf e Scutt, 2008). Na medicina equina, a terapia celular tem sido empregada principalmente na área ortopédica, onde as pesquisas se encontram mais avançadas (Richardson et al, 2007).

3.3.2 Tipos de célula-tronco, características e suas propriedades

Existem diversos tipos de células progenitoras no organismo. Exemplo destas são as células totipotentes do zigoto, as células-tronco embrionárias, as células-tronco hematopoiéticas e as células-tronco mesenquimais (Pountos et al, 2007).

As células tronco embrionárias são células derivadas do blastocisto. Elas podem se manter indiferenciadas indefinidamente *in vitro* e quando implantadas em um embrião, dão origem aos mais diversos tipos teciduais. Porém o descobrimento e uso em pesquisas das células-tronco embrionárias têm se tornado muito complicado devido a diversos fatores morais e éticos, o que tornou o uso clínico das mesmas muito limitado. Ademais, a possibilidade de formação de teratomas *in vivo* com o uso destas células também é um fator preocupante. Para tentar contornar este problema, têm se estudado a reprogramação de células somáticas adultas, para entrarem em estado pluripotente, mimetizando o comportamento das células-tronco embrionárias. No entanto o células-tronco mesenquimais adultas, que demonstraram oferecer o mesmo potencial terapêutico das células embrionárias sem apresentar problemas éticos e morais, demonstraram ser uma interessante alternativa para a terapia utilizando células-tronco (Tuan, Boland e Tuli, 2002; Chen et al, 2011; Steward, 2011).

As células-tronco mesenquimais são células de linhagem não hematopoiética, multipotentes, ou seja, têm o potencial de se diferenciar em diversos tipos de células mesenquimais, como

condrócitos, osteoblastos, adipócitos, fibroblastos e possivelmente células neuronais. Atualmente, a medula óssea têm se mostrado a fonte mais acessível e rica de células-tronco, (apesar da frequência de células-tronco obtidas ser baixa, 0.01%). As células da medula ganham acesso fácil a diversos tecidos através da circulação. Por outro lado, as células presentes nas reservas teciduais parecem possuir a capacidade de diferenciação limitada com relação às células da medula (Tuan, Boland e Tuli, 2002; Pountos et al 2007).

Muitos tecidos do animal adulto contém essas reservas ou nichos de células-tronco mesenquimais que podem auxiliar na reposição tecidual (Tuan, Boland e Tuli, 2002), e que podem ter aplicações na engenharia de tecidos, uma vez que as mesmas não precisariam ser transplantadas (Chen et al, 2011). Muitos foram os tecidos os quais esses nichos de células podem ser encontrados como tecido adiposo, cordão umbilical, sinóvia, polpa dentária, ligamentos periodontais e tendões. (Zhang et al, 2011).

Contudo no tecido tendíneo, apesar da presença de células-tronco mesenquimais residentes, não se sabe se as mesmas se encontram em número suficiente para o processo de reparo, podendo ser um dos fatores responsáveis pela redução na capacidade da cicatrização neste tecido (Richardson et al, 2007). Neste casos os estímulos externos podem auxiliar no rejuvenescimento ou reposição tecidual (Pountos et al, 2007; Chen et al, 2011).

Logo, as células-tronco podem possuir características diferentes, não somente de acordo com o tipo de tecido que residem, mas também de acordo com o tecido propriamente dito (Colleoni et al, 2009; Steward, 2011). No trabalho realizado por Zhang et al (2011), foi observado que as células-tronco mesenquimais do ligamento anterior cruzado do joelho e do ligamento colateral medial do joelho eram diferentes. As células do ligamento anterior cruzado demonstraram menor capacidade de formação de colônia, menor proliferação celular, menor capacidade de auto-renovação e potencial de multidiferenciação quando comparados às células do ligamento colateral medial. O autor sugeriu que este fato pode contribuir para a menor capacidade de reparo deste ligamento.

Em um estado de equilíbrio, a medula óssea desempenha um papel muito importante na manutenção dos nichos de células-tronco nos diversos tecidos, mantendo o equilíbrio. Constantemente, células-tronco deixam a medula óssea, e através do sangue ou linfa se dirigem para os tecidos afetados, migrando de volta para a medula ou para os nichos nos outros tecidos. Esta capacidade de migração da célula-tronco para o tecido afetado é denominado de *homing* que ocorre tanto com as células exógenas quanto endógenas. Macromoléculas bioativas medeiam este processo atraindo as células para o tecido lesionado. Contudo, este processo não é ainda plenamente compreendido. (Chen et al, 2011).

3.3.3 Coleta, cultivo e caracterização das células-tronco

Na engenharia de tecidos, quatro formas de coleta e aplicação têm sido empregadas: células de medula óssea fresca não fracionada, células-tronco expandidas e cultivadas (de tecido adiposo e medula óssea), células derivadas do cordão umbilical, células-tronco embrionárias, células diferenciadas e células geneticamente modificadas para a produção de fatores de crescimento. Com exceção da primeira técnica, todas as outras exigem isolamento celular e cultura até um número suficiente para a implantação no local da ferida. A implatação destas células pode se dar isoladamente ou em conjunto com materiais biocompatíveis de suporte para o crescimento

celular. Estes produtos que podem ser aplicados em conjunto com as células e devem mimetizar as características do tecido, promovendo suporte para a regeneração celular, assim como uma matriz biodegradável que fornece suporte para a vasculogênese e migração celular (Pountos et al, 2007; Richardson et al, 2007; Nibeyro, 2011).

Dentre estas formas citadas, as de uso mais comum para auxiliar na recuperação das afecções músculoesqueléticas em equinos são as células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea ou do tecido adiposo. A facilidade maior da coleta do tecido adiposo é uma grande vantagem para a maior parte dos clínicos. As células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo podem ser coletadas na região pericoccígea, na região do externo ou na região inguinal (Nibeyro, 2011). A escolha do local para a coleta das células está relacionado ao número de células que se deseja obter para a terapia, a facilidade da coleta e o tempo disponível para a aplicação (Steward, 2011).

A gordura da porção coccígea do animal é a região mais acessível para a obtenção destas células. Estas são coletadas com o animal em estação, com administração de sedativos e anestésico local. O isolamento das células mononucleares da gordura promove um *pool* de células para imediato uso ou para posterior cultivo e isolamento em laboratório. As células provenientes do tecido adiposo podem ser uma fonte interessante para obtenção de células para cultura e expansão fornecendo um concentrado de células mononucleares clinicamente relevantes quando comparada as células provenientes da medula óssea (Nixon et al, 2008). Em trabalho realizado por Colleoni et al (2009) as células derivadas de tecido adiposo cultivadas em laboratório apresentaram maior proliferação celular quando comparadas à células oriundas de medula óssea também cultivadas em laboratório.

Outros trabalhos no entanto utilizando aplicação do aspirado de medula têm demonstrado muitas vantagens em diversos tecidos como osso, em células da retina em casos de glaucoma, em infartos do miocárdio entre outros. Neste caso, o aspirado pode ser aplicado diretamente no local da lesão, como mencionado anteriormente, ou pode ser centrifugado com o objetivo de promover maior concentração, antes da aplicação (Pountos et al, 2007).

Contudo, o aspirado de medula contém um pequeno número de células que se encontram diluídas em grande volume de sangue e outros componentes da medula. A cultura e expansão destas células é uma alternativa, apesar de demandar muitas semanas. Ademais, dor associada à coleta e laceração do pericárdio foram relatados durante a coleta de medula pelo externo (Nixon et al, 2008). Porém não há evidências de que células mesenquimais purificadas sejam superiores à concentrados heterogêneos de célula em aplicações ortopédicas (Steward, 2011).

Existem muitas dúvidas com relação à caracterização das células-tronco mesenquimais. Não se sabe se estas células presentes nos tecidos são realmente células-tronco, ou se são algum outro tipo de célula progenitora. Não há nenhum tipo específico de caracterização fenotípica destas células descrito. A tentativa desta caracterização têm sido realizada pela identificação do perfil de citocinas liberadas pelas células indiferenciadas. Alguns marcadores são muito utilizados, expressos por estas células são CD9, CD10, CD13, CD54, CD55, CD90, CD105, CD166 e D7FIB, que são comuns a outros tipos celulares. Contudo, de modo geral elas são classificadas como células-tronco por possuírem habilidade de se replicar e permanecer indiferenciadas e de se diferenciar quando estimuladas em mais ciclos do que uma célula normal do tecido (Tuan, Boland e Tuli, 2002; Pountos et al, 2007). Outra maneira de se caracterizar estas células seria através da detecção das proteínas sintetizadas por estas células (como colágeno Tipo I e COMP)

porém a produção destas proteínas não é exclusiva dos tenócitos não sendo uma forma eficaz para identificação (Richardson et al, 2007).

Apesar das células-tronco mesenquimais estarem presentes em toda a vida, seu número total obtido na coleta e a capacidade de expansão dependem de fatores relacionado não somente a técnica de cultivo, mas também ao animal. Entre estes fatores podem ser citados a idade do animal, doença sistêmica e do próprio local da coleta (Tuan, Boland e Tuli, 2002; Pountos et al, 2007; Colleoni et al, 2009). Ademais, foi observado em trabalho realizado por Colleoni et al (2009) que células isoladas de pacientes equinos provenientes de medula óssea e tecido adiposo apresentaram progressiva redução na capacidade de diferenciação nos últimos estágios de replicação em laboratório. Os autores explicam que possivelmente esta redução na habilidade de diferenciação celular se deve a um processo de senescência da célula.

3.3.4 Uso da terapia celular nos tendões e ligamentos

A grande vantagem no emprego do uso das células-tronco está na alta qualidade do reparo tecidual, resultando na recuperação da arquitetura natural sem a permanência de tecido cicatricial. As células-tronco mesenquimais podem ser manipuladas com certa facilidade permitindo a diferenciação antes da aplicação (Pountos et al, 2007). Outra grande vantagem fornecida nesta terapia é que não há rejeição das células, por geralmente serem coletadas do próprio animal que será tratado (Richardson et al, 2007).

Contudo, o fato que as células-tronco não apresentam grande imunogenicidade permite a aplicação alogênica das mesmas. Isto permitiria a coleta e expansão destas células (mesenquimais ou embrionárias) que seriam armazenadas, sendo disponíveis para uso imediato (Steward, 2011).

A capacidade das novas terapias da engenharia de tecidos de restaurarem (teoricamente) a estrutura e funcionalidade tecidual ainda são muito discutidas. Entretanto, segundo alguns trabalhos o emprego das terapias celulares para auxiliar no tratamento de lesões musculoesqueléticas nos equinos é benéfico. Aparentemente a aplicação dessas células têm demonstrado redução da inflamação, auxílio no processo de reparo tecidual, e redução da taxa de recidivas das lesões. A combinação das propriedades anti-inflamatória e anti-apoptóticas das células mesenquimais podem reduzir a propagação da lesão tendínea. Outra grande vantagem deste tipo de terapia está no emprego da melhora do animal e de não haver restrições quanto ao seu uso antes de competições (Nixon et al, 2008; Nibeyro, 2011).

A aplicação do produto é intra-lesional, e o ultrassom deve ser utilizado para guiar a aplicação. Nos casos agudos, a aplicação deve visar preencher o defeito tecidual sem promover a separação das fibras, resultando em dano tecidual (Sutter, 2007).

Apesar das discussões éticas, o uso de células-tronco embrionárias, têm se mostrado interessante na terapia para tendinite aguda do flexor profundo de equinos (Nibeyro, 2011). Alguns trabalhos sugerem que o uso de células-tronco alogênicas poderia ser interessante para a terapia de doenças musculoesqueléticas em equinos. Há trabalhos que demonstram não haver nenhum tipo de efeito colateral, podendo ser uma alternativa para este tipo de terapia no futuro (Nibeyro, 2011).

Em trabalho realizado por Bue et al (2008) os autores realizaram a implantação de células-tronco alogênicas, derivadas da gordura visceral em tendões lesionados em equinos. As células foram isoladas da gordura e expandidas em laboratório. Os autores observaram uma série de vantagens como a imediata disponibilidade das células prontas para terapia sem a necessidade de isolamento e amplificação, a inexistência de procedimentos cirúrgicos para a retirada da gordura do animal afetado e a possibilidade da aplicação de um número conhecido de células no local da lesão. Contudo os autores deste trabalho ressaltam a necessidade do cuidado sanitário da amostra, para se evitar a transmissão de doenças.

A suspensão das células provindas do tecido adiposo podem ser aplicadas imediatamente após o diagnóstico, sendo utilizada para tratar lesões intra-articulares, ou lesões tendíneas e ligamentares, ou podem ser expandidas em laboratório para uso posterior. As células derivadas de tecido adiposo têm sido muito populares na América do Norte pelo alto número de células nucleadas com potencial anti-inflamatório e efeitos regenerativos obtidos das amostras em apenas 24-48 horas de coleta (Nibeyro, 2011).

Os resultados da terapia celular dependem diretamente da duração da lesão, localização, tamanho, e se esta está no membro posterior ou anterior. Ademais, frequentemente células de gordura ou espículas ósseas são inoculadas juntamente com as células mesenquimais, podendo causar danos ao tecido (Sutter, 2007).

No entanto, em estudo citado por Nibeyro (2011) foi demonstrado que em tendinites induzidas com colagenase em equinos, os tratamentos empregando aspirado de medula óssea não expandido e a aplicação de células-tronco mesenquimais de medula óssea expandidas não diferiram na melhora do reparo e organização da matriz extra-celular. Ambas terapias demonstraram a melhor expressão de COMP, uma maior razão colágeno Tipo I: Tipo III e fibras de colágeno mais alinhadas em relação aos grupos controle.

Para estas terapias, não se sabe ainda exatamente o número de células necessário para o reparo completo de tendões e ligamentos em equinos (Nibeyro, 2011). Em estudos realizados em cães, este número pôde ser obtido utilizando-se modelos matemáticos para auxiliar na determinação do número necessário. Em equinos, mais estudos são necessários para tornar o uso destas células uma prática na clínica (Vidal et al, 2006).

Contudo, seja em qualquer forma de utilização das células-tronco, seu uso clínico necessita de muitos estudos, visando o entendimento das propriedades biológicas dessas células, bem como a interação das mesmas com outras células e com o microambiente alterado em que serão transplantadas (Chen et al, 2011). O estudo destas terapias deve ser baseado em ensaios controlados e cegos, embora isso seja muito difícil de realizar em animais atletas (Fortier e Smith, 2008).

Ao contrário do que muitos esperam, a terapia celular, deve visar principalmente o retorno estrutural e funcional do tecido e não a recuperação mais rápida do paciente. Para tal, o emprego da fisioterapia é mais importante, especialmente para afecções dos locomotores em equinos (Bue et al, 2008; Steward, 2011).

3.4 AVALIAÇÃO DO REPARO DO LIGAMENTO SUSPENSÓRIO

O processo de reparo ligamentar pode ser monitorado através da utilização de métodos invasivos e não-invasivos. Dentre os métodos não-invasivos podem ser mencionados o ultrassom, o doppler e o próprio exame físico. Como método invasivo pode ser citado a biópsia para realização de exames histopatológicos e imunoistoquímicos (Carvalho, 2009).

3.4.1 Avaliação Histopatológica e Imunoistoquímica

A biópsia de tecidos tendíneos e ligamentares e avaliação histológica é uma das formas mais comuns para análise da qualidade do reparo nestes tecidos (Oliveira, 2008).

Neste exame é possível qualificar a reparação tecidual através da avaliação da organização das fibras colágenas, vascularização e da celularidade tecidual e bem como a caracterização morfológica destas células (Caminoto, 2003). Uma das colorações mais utilizadas na histologia para se estudar morfologia tecidual é a hematoxilina-eosina.

Muitas foram as colorações desenvolvidas para o estudo das fibras colágenas. A maior parte destas são as colorações tricômias. Entre as principais colorações tricômias se encontram a de Van Gieson, Mallory e Massom. Apesar das fibras colágenas serem intensivamente coradas na maior parte destes métodos, demais estruturas como fibras reticulares e membranas basais também são coradas. Ademais, os diferentes tipos de colágeno não são diferenciados nestas colorações (Montes, 1996).

A coloração histoquímica pricosírius-red no entanto contribui para pesquisas que envolvem o estudo de estruturas colágenas. Pelo fato das moléculas de colágeno serem ricas em aminoácidos básicos, estes reagem fortemente com colorações ácidas como o pricosírius. Esta coloração apresenta uma molécula altamente ácida que possui seis grupos sulfônicos. Os grupos cromógenos desta molécula apresentam alta seletividade para o colágeno, sendo capazes de detectar pequenas quantidades do mesmo (Montes, 1996).

Esta coloração realça a birefringência já existente no colágeno, devido ao paralelismo e organização tecidual. As moléculas do pricosírius-red agregam às moléculas de colágeno formando estruturas visíveis sob luz polarizada (Montes, 1996; Ortega et al, 2003).

Os vários tipos de colágeno apresentam diferentes padrões de agregação com as moléculas do pricosírius, desta forma as fibras apresentam diferentes colorações, sendo possível identificá-las. O colágeno Tipo I é caracterizado por fibras grossas, altamente birefringentes e de coloração amarela ou vermelha. Já o colágeno Tipo III apresenta fibras mais finas de baixa birefringência e coloração verde (Montes, 1996; Ortega et al, 2003).

Contudo apesar da maior especificidade, o pricosírius não pode ser utilizado isoladamente para o estudo e caracterização das moléculas de colágeno. Para esta avaliação é necessária a análise imunoistoquímica para diferenciar os tipos de colágeno entre si e com relação aos outros componentes que também contém colágeno (Barreira, 2005).

A imunoistoquímica é baseada na relação antígeno-anticorpo, onde o antígeno de interesse pode ser demonstrado em várias seções teciduais, pela ligação de um marcador ao antígeno, permitindo a visualização e caracterização da expressão de determinada proteína em um fragmento tecidual, preservando sua arquitetura original. Existem diversos protocolos para o

emprego da imunistoquímica e estes variam de acordo com o tipo de tecido, antígeno estudado e sensibilidade necessária (Caminoto, 2003).

No entanto, os anticorpos específicos para equinos dos colágeno Tipo I e III ainda não estão disponíveis. Como alternativa a ausência de anticorpos específicos, pode se utilizar anticorpos policlonais produzidos em outra espécie, contanto que haja reação cruzada com a espécie equina. A marcação destes anticorpos permite a diferenciação e avaliação da qualidade do tecido de reparo de modo mais confiável (Oliveira, 2008).

O emprego da imunistoquímica em tendões e ligamentos também apresenta outra dificuldade que é a própria conformação destes tecidos. Os ligamentos e tendões são tecidos extremamente densos, a conformação da molécula de colágeno e as ligações cruzadas existentes nestas moléculas dificultam a ligação antígeno-anticorpo e portanto a identificação da proteína em estudo (Oliveira, 2008).

Para a análise do reparo ligamentar, a análise quantitativa oferece parâmetros mais acurados dos constituintes no processo de reparo. Porém, as análises quantitativas não podem ser empregadas na mensuração da organização do tecido cicatricial, sendo necessário para tal o emprego da análise semi-quantitativa em escala (Schnabel et al, 2009).

4 OBJETIVOS

Comparar, por meio de análise histológica e imunistoquímica a qualidade do tecido de reparo de lesões induzidas em ligamentos suspensórios equinos tratados e não tratados com dois diferentes protocolos de terapia celular intralesional: injeção da porção celular do aspirado de medula óssea ou injeção de resultante do cultivo laboratorial de células de tecido adiposo autólogo.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo utilizou amostras de arquivo, obtidas de experimento realizado por Soares (2008) no Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) no período de 15 de junho a 23 de dezembro de 2007. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG (19/07)

5.1.1 Animais do experimento

No experimento de Soares (2008) foram utilizados seis equinos, sendo um macho e cinco fêmeas (duas não gestantes). Os animais apresentaram idade entre 4,5 e 16 anos, pesando 375 ± 75 kg, com escore corporal entre 2,5 e 3 (Speirs, 1999). Para o experimento foram selecionados equinos hígidos com base em exames clínicos, laboratoriais e ultrassonográficos. Os animais selecionados ficaram alojados na Escola de Veterinária da UFMG, e passaram por um período de adaptação de 15 dias com dieta padronizada. Os mesmos foram submetidos a

vacinação contra tétano¹ e desverminação no período mencionado, utilizando-se moxidectina 0,4 mg/kg².

5.1.2 Delineamento experimental

Foram estabelecidos quatro grupos experimentais constituídos de seis membros cada um, de modo que todos os animais fossem submetidos a todos os tratamentos. Os grupos determinados foram os seguintes: um grupo controle sem qualquer tratamento ou grupo controle negativo (CN), um grupo controle tratado com solução fisiológica 0,9% ou controle positivo (CP), um grupo tratado com células coletadas de medula óssea (MO) e um grupo tratado com células cultivadas provenientes de tecido adiposo (TA).

Os tratamentos foram distribuídos de forma que o controle negativo estivesse sempre em membro pélvico (esquerdo) e que os outros tratamentos fossem distribuídos igualmente entre os outros membros. Esta distribuição está representada na Tabela 1.

Tabela 1: Distribuição dos diferentes tratamentos nos quatro membros de cada um dos seis animais do experimento (adaptado de Soares, 2008).

Animal	Membro Torácico Direito	Membro Torácico Esquerdo	Membro Pélvico Direito	Membro Pélvico Esquerdo
Pítica	GCP	GTA	GMO	GCN
Alfa	GTA	GMO	GCN	GCP
Troncha	GMO	GCP	GTA	GCN
Branca	GCP	GMO	GTA	GCN
Bedito	GTA	GCP	GMO	GCN
Sogra	GMO	GTA	GCP	GCN

Os tratamentos foram realizados dois dias após a indução cirúrgica da lesão. Dois meses após o tratamento, os animais foram submetidos a novo procedimento cirúrgico para a realização das biópsias dos ligamentos suspensórios, com finalidade da realização de testes histológicos e imunoistoquímicos.

A figura abaixo ilustra o esquema do delineamento experimental (Figura 1).

¹ Vacina Anti-tetânica Hertape, Hertape Calier Saúde Animal S/A, Juatuba, SP

² Equest, Fort Dogde Saúde Animal, Campinas, SP

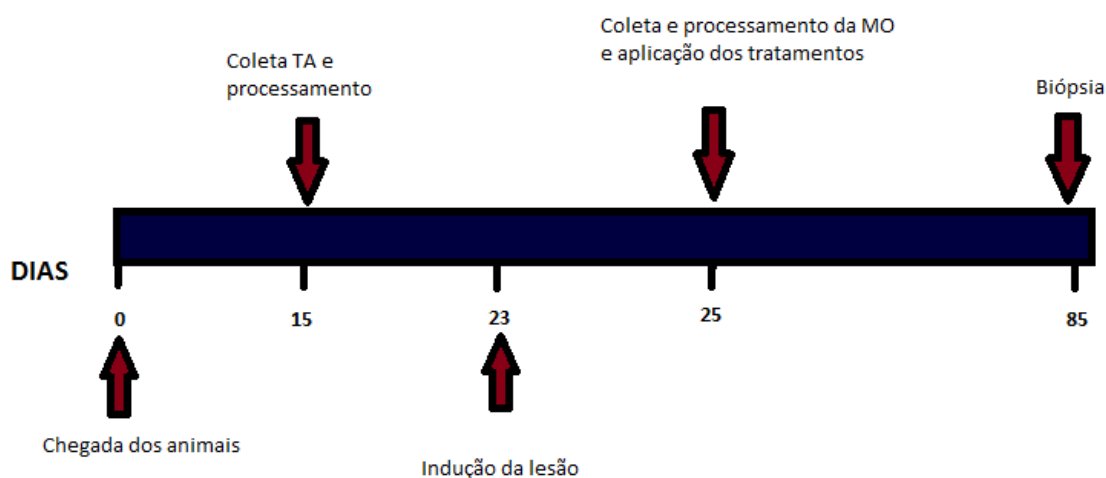


Figura 1: Esquema do delineamento experimental. TA = tecido adiposo, MO = medula óssea.

5.1.3 Indução das lesões

Sob anestesia geral, os ligamentos suspensórios dos quatro membros foram expostos por meio de incisão de pele de aproximadamente três centímetros na porção lateral dos membros e três centímetros proximal à bifurcação.

Através da utilização de um “punch” para biópsia³, uma lesão circular (0,6 cm de diâmetro) foi feita na região central do ligamento suspensório. Após a indução da lesão, a pele foi suturada com pontos simples separados. A ferida foi tratada com rifamicina⁴ tópica e feita bandagem com algodão e atadura de crepom em todos os membros.

5.1.4 Colheita, processamento e cultivo de células oriundas do tecido adiposo

Oito dias antes da indução das lesões, o tecido adiposo foi coletado da região proximal abaxial da cauda de cada um dos animais. Após contenção e sedação, o local foi depilado e realizada a antissepsia da região. Foi removido um fragmento de 3cm de comprimento por 0,5 cm de largura e 0,2 cm de espessura do tecido subcutâneo. Os fragmentos coletados foram acondicionados em frascos e encaminhados ao Laboratório Hermes Pardini para a cultura das células. Foi realizada sutura de pele com ponto simples separado e feito o curativo com pomada a base de alantoína⁵.

³ Punch trépano, Richter LTDA, São Paulo, SP.

⁴ Rifocina Spray, Hoechst Marion Roussel, São Paulo, SP.

⁵ Alantol, Vetnil Ind. Com. Produtos Veterinários Ltda, Louvera, SP.

No Laboratório Hermes Pardini, os fragmentos foram recortados em capela de fluxo laminar, dissociados com colagenase e incubados em meio de cultura a 37° C e 5% de CO₂. Após atingir 80% de confluência, foi preparada cultura secundária a qual foi acompanhada diariamente até a administração. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os protocolos estabelecidos pelo Laboratório Hermes Pardini.

5.1.5 Colheita e processamento das células da medula óssea

Dois dias após a indução da lesão, os animais foram contidos em brete e sedados para a coleta da medula óssea. A região do osso externo de cada equino foi depilada e submetida a antissepsia da região e, após realizado bloqueio local, foi coletada a medula óssea utilizando uma cânula própria tipo *Jamshidi*⁶. Após a coleta da medula, parte do conteúdo foi colocado em placa de Petri para a observação e glóbulos de gordura e espículas ósseas, sugerindo a origem medular da amostra. Essas amostras foram processadas em capela de fluxo laminar e centrifugadas a 1500 rpm durante 10 minutos para a separação da fração mononuclear. Após a centrifugação formou-se um anel esbranquiçado (rico em células mononucleares) que foi retirado e em seguida implantado no local de lesão.

5.1.6 Administração dos tratamentos

Dois dias após a indução da lesão, foi realizada a aplicação intralesional de soro fisiológico ou dos tratamentos citados. Este procedimento foi feito com o animal em estação e sob sedação e bloqueio anestésico dos nervos palmares medial e lateral como descrito por Stashak (1987). Foram administrados 0,8 mL de suspensão celular de medula óssea no grupo MO, 0,8 mL de solução contendo 1×10^6 células cultivadas oriundas de tecido adiposo no grupo TA e 0,8 mL de solução fisiológica 0,9% no grupo CP. Este procedimento foi monitorado por exame ultrassonográfico simultâneo à aplicação dos tratamentos.

5.1.7 Coleta das amostras e processamento

Sessenta dias após a aplicação dos tratamentos, os animais foram submetidos a novo procedimento cirúrgico para a realização da biópsia. Um fragmento de aproximadamente 2 cm, envolvendo o tecido cicatricial, foi retirado de cada membro dos seis animais. Após a coleta o material foi colocado em recipiente com formol tamponado e processado de modo habitual para a histologia e incluídos em parafina no Laboratório de Apoptose do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

5.2 Análise histopatológica e imunoistoquímica

5.2.1 Histologia

⁶ Cânula para a aspiração de medula óssea, Euromed Catéteres, Lagoa Santa, MG

Para a avaliação das alterações na arquitetura do tecido, as amostras foram submetidas às colorações de hematoxilina-eosina (HE), tricômio de Massom e pricosírius red. Paratanto, as amostras foram cortadas em seções com 5 micrômetros de espessura e colocadas em lâminas próprias para histologia. Nessas técnicas as lâminas contendo o material foram colocadas em xilol e posteriormente hidratadas em álcool em concentrações decrescentes, lavadas em água corrente e posteriormente coradas com corantes específicos de cada técnica. Todas as lâminas coradas por estas técnicas foram observadas sob microscopia óptica sem o conhecimento prévio dos grupos ao qual pertenciam as lâminas.

Quatro amostras (grupos MO,CP e CN) tiveram que ser descartadas do experimento, por não ser possível a análise histológica das mesmas.

Nos cortes corados com HE foram avaliados: o número de fibroblastos por campo e a morfologia dos núcleos, a presença e o tipo de infiltrado inflamatório, a vascularização e a presença e organização das fibras de colágeno. Para a última variável, foi realizada uma análise descritiva semi-quantitativa, se estabelecendo uma escala de 0 a 5, onde em 0 o tecido se apresenta com nenhum paralelismo e 5 com intenso paralelismo (Tabela 2). As demais características foram avaliadas em um programa analisador de imagens Image-Pro Plus®. Foram avaliados 20 campos de cada lâmina e as imagens foram capturadas com auxílio de uma câmera QColor5 (Cooled Colour RTC 10 BIT) Olympus, nas objetivas de 100X e 400X em microscópio Olympus BX43. As imagens foram salvas em formato bitmap com resolução de 720X480 pixels. Nesta análise foi realizada a contagem de fibroblastos, vasos e células inflamatórias.

As amostras coradas pelo Tricômio de Massom foram submetidas à análise descritiva, onde foram observados presença e organização das fibras de colágeno, presença de hemorragia e neovascularização.

Na coloração pricosírius-red, foram observados a proporção da concentração de colágeno Tipo I e III, sob luz polarizada. Nesta coloração as amostras foram também submetidas à análise descritiva semi-quantitativa, se estabelecendo uma escala de 0 a 3 para a concentração de colágeno Tipo I, onde 0 o tecido não apresentava nenhuma concentração de colágeno Tipo I e 3 máxima concentração (Tabela 2).

Tabela 2: Escores para avaliação de paralelismo de fibras na coloração HE e concentração de colágeno Tipo I na coloração pricosírius red

Variável	Escore e critério
HE	
Alinhamento de fibras	0 = paralelismo ausente
	1 = paralelismo muito leve
	2 = paralelismo leve
	3 = paralelismo moderado
	4 = paralelismo acentuado
	5 = intenso paralelismo(tecido normal)
Pricosírius Red	0 = ausência de colágeno Tipo I
	1 = presença leve de colágeno Tipo I
	2 = presença moderada de colágeno Tipo I
	3 = intensa concentração de colágeno Tipo I

5.2.2 Imunoistoquímica

Para a análise imunoistoquímica das amostras, as mesmas foram cortadas em secções de 5 micrômetros de espessura e posteriormente montadas em lâminas previamente banhadas em gelatina, que possui a função de aderir os cortes à lâmina. Para a incubação com o anticorpo anti-colágeno Tipo III, as lâminas foram submetidas a banhos de xilol, álcool absoluto em concentração decrescentes e água corrente. Após a hidratação, as lâminas foram submetidas à recuperação antigênica enzimática, sendo incubadas à 37° C utilizando solução de pepsina⁷ 0,1% pH 1.7, por 30 minutos.

Após a recuperação antigênica, as amostras foram submetidas ao bloqueio da peroxidase endógena com utilização de solução de metanol⁸ e peróxido⁹ (9:1), e ao bloqueio da biotina endógena com solução de soro normal equino¹⁰ e PBS (1 gota:3mL).

Em seguida, as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário monoclonal de camundongo anti- humano para colágeno Tipo III¹¹ (concentração 1:50) em câmara úmida, à temperatura ambiente por 1 hora. Logo após este procedimento, as amostras foram incubadas com o anticorpo secundário de cavalo biotilado anti-camundongo¹² (concentração 1:100) em temperatura ambiente por 1 hora.

Os anticorpos foram diluídos em diluente específico¹³ para a redução das reações de fundo. Como controle negativo das lâminas, as amostras foram incubadas com diluente de anticorpo em substituição do anticorpo primário. Posteriormente, as lâminas foram incubadas com o sistema ABC¹⁴ para revelação, utilizando diaminobenzina (DAB)¹⁵ como cromógeno.

Para a análise das imagens, foram utilizados 5 campos de cada lâmina sendo dois em cada extremidade da amostra e um ao centro. Os campos foram fotografados com auxílio de uma câmera QColor5 (Cooled Colour RTC 10 BIT) Olympus, nas objetivas de 100X e 400X em microscópio Olympus BX43. O programa utilizado para a captura das imagens foi o Image Pro-Plus[®] 7.0. Para a correção da iluminação para a captura das imagens, uma área de fundo branco da lâmina foi utilizada como referência antes da captura das imagens. As imagens foram capturadas com formato bitmap com resolução de 720X480 pixels.

Posteriormente as imagens foram analisadas em programa analisador de imagens Image-Pro Plus[®]. Todos os cinco campos de cada lâmina foram analisados, com detecção das áreas marcadas realizando sua mensuração e apresentando em percentual de regiões marcadas por campo.

⁷ Pepsin (from porcine gastric mucosa) 0,7 FIP – U/mg for biochemistry, 1071850100, Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha.

⁸ Álcool Metílico P.A. 1000mL, Cromoline Química Fina, lote:31976/11.

⁹ Peróxido de Hidrogênio P.A. 1000MI, Synth, lote: 153810.

¹⁰ Normal Horse Serum, Vectastain[®] Elite[®] ABC Kit - VECTOR Laboratories, code:PK 6102, Burlingame, Canada.

¹¹ Mouse Anti-Human Collagen Type III (HWD1.1) IgG, Bio-Genex, Fremont, Canada.

¹² Horse biotinylated Anti-Mouse IgG, Vectastain[®] – Elite[®] ABC Kit -VECTOR Laboratories, code:PK 6102, Burlingame, Canada.

¹³ Antibody Diluent with backgroun reducing component – DAKO do Brasil Ltda., São Paulo, Brasil.

¹⁴ Vectastain[®] Elite[®] ABC – VECTOR Laboratories, code: PK-6102, Burlingame, Canada.

¹⁵ Liquid –DAB + Substrate Chromogen System, code: K3468, DAKO do Brasil Ltda., São Paulo, Brasil.

5.3 Análise Estatística

Os dados foram tabulados e as médias e desvios padrões calculados. As análises semi-quantitativas foram realizadas por meio do teste de Kruskal-Wallis e as quantitativas pela análise de variância inteiramente casualizada, seguida do teste de Student-Newman-Keuls, para comparação das médias. O teste de Spearman foi utilizado para se verificar a correlação entre os escores para colágeno Tipo I e alinhamento de fibras. Para todos os testes considerou-se nível de significância de $P < 0,05$.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Análise do reparo ligamentar

6.1.1 Análise Histológica

6.1.1.1 Hematoxilina e Eosina e Tricômio de Massom

Em todas as amostras, a área de lesão foi identificada pela observação de hiper celularidade com presença de fibroblastos com núcleos de variados formatos predominantemente ovóides e fusiformes na área de lesão (caracterizando maior atividade dos mesmos), pouco ou nenhum paralelismo de fibras (nível 0 a 2 da escala), infiltrado inflamatório e presença de neovascularização, na maior parte das amostras (Dyson, 2000). A área de lesão se encontrava relativamente centralizada nas lâminas.

Essas características também foram observadas em lesão tendínea aguda estudada pelo trabalho de Kobayashi et al (1999).

Algumas características de fase aguda da inflamação foram encontradas nos diferentes grupos. Hemorragia e congestão vascular foram encontradas em amostras em todos os grupos e a presença de necrose foi observada em dois animais do grupo MO e um do grupo CN. Contudo, apesar desses fatores, todas as amostras demonstraram predominantemente características de um processo inflamatório crônico, em fase de remodelamento.

Achados inflamatórios semelhantes ao presente estudo foram verificados em modelo de tendinite por collagenase 48 dias após indução (Barreira, 2005). Entretanto sinais de inflamação aguda não foram reportados em equinos com tendinite induzida por collagenase que foram tratados com células mononucleares derivadas de medula em biópsias colhidas aos 60 dias (Schnabel et al, 2009), e 120 dias (Oliveira, 2008) pós indução. No presente experimento, as amostras foram obtidas aos 62 dias de indução da lesão, este reduzido período de experimento poderia justificar a presença de alguns achados de fase aguda (hemorragia, necrose) em algumas das amostras estudadas.

O infiltrado inflamatório predominante encontrado nas amostras foi linfo-histiocitário, com presença de neutrófilos em oito delas, em todos os grupos. A presença de monócitos foi observada no interior dos vasos de duas das amostras, assim como eosinófilos foram observados em uma amostra. Na contagem geral de células inflamatórias não houve diferença entre grupos. Infiltrado inflamatório perivascular predominantemente mononuclear também foi observado no

experimento de Carvalho (2009) e Barreira (2005), sendo menos intenso porém nos tendões tratados por células mononucleares derivadas de medula.

Em contraste com o presente estudo, outros trabalhos na literatura apresentaram indícios do potencial antiinflamatório usando a terapia celular (Puissant et al, 2005; Nixon et al, 2007; Carvalho, 2009). O pouco tempo entre o período de indução e da coleta das amostras neste experimento possivelmente dificultou a observação de um possível potencial antiinflamatório destas células. Isso também foi observado em estudo realizado em amostras de tendão lesionado tratados com células cultivadas derivadas de medula analisadas também oito semanas após o tratamento (Schnabel et al, 2009). Apesar do infiltrado inflamatório encontrado no presente estudo, as amostras apresentaram características predominantes da fase proliferativa da inflamação e da fase de remodelamento, com presença reduzida de células inflamatórias (sendo estas predominantemente mononucleares), grande número de fibroblastos e células endoteliais.

As células inflamatórias exercem importante papel nas alterações da matriz extra-celular através da ação de metaloproteinases colagenolíticas liberadas por estas células. Foi observado a secreção de enzimas com potencial para degradação de colágeno tipo I e III por eosinófilos (Hibbs, Mainard e Kang, 1982). Durante o processo inflamatório, colagenases (MMP-1 e MMP-13) são liberadas por macrófagos em algumas situações, podendo inclusive induzir miofibroblastos a liberarem estas enzimas. Neutrófilos também apresentam este potencial (Luque et al., 1996; Rodríguez et al., 2003). Apesar da concentração destas células ser maior na fase aguda do processo inflamatório (Chamberlain, Crowley e Vanderby, 2009).

Com relação ao número de vasos neoformados na área de lesão, não houve diferença estatística entre os diferentes grupos estudados. Assim como no trabalho realizado por Oliveira (2008) e Oliveira et al (2011) foi observado intensa fibroplasia e neovascularização em todos os grupos, apesar de ser esta última menos intensa no grupo tratado. A redução na vascularização, segundo o autor, deve-se à formação e maturação do tecido de granulação que exercendo pressão mecânica sob as paredes dos vasos neoformados, levando à redução dos mesmos.

A fibroplasia pode ser caracterizada pelo maior número de fibroblastos, organização e alinhamento de fibras, porém ainda com muita irregularidade quanto à organização tecidual quando comparado ao tecido normal (Oliveira, 2008). Fibroplasia e intensa vascularização também foram observados nas amostras de tendão lesionadas e tratadas por células derivadas de tecido adiposo no experimento de Carvalho (2009). Essas amostras também foram coletadas aos 60 dias, como as realizadas neste experimento. Porém nas amostras tratadas coletadas aos 150 dias de indução de lesão no experimento de Carvalho (2009), foi observado melhor organização tecidual, sendo mais semelhante ao tecido sadio.

Nas regiões onde o colágeno apresentava-se mais organizado, os vasos se encontravam distribuídos no sentido das fibras. Isto condiz com os achados de Oliveira (2008), onde os vasos também apresentaram-se dispostos no sentido da fibra. Esta característica provavelmente seria observada mais intensamente nas amostras deste estudo, assim como um maior paralelismo de fibras nos grupos se os animais tivessem sido submetidos à fisioterapia. O estresse longitudinal exercido de forma moderada poderia contribuir para a melhor organização tecidual (Oliveira et al, 2011). Isto foi observado no experimento realizado por Alves et al (2011), onde os grupos de animais com tendinite induzida tratados ou não com fumarato beta-aminopropionitril e que foram submetidos à fisioterapia apresentaram melhor organização tecidual e formação de *crimp*

quando comparados aos grupos tratado e controle que não foram submetidos ao exercício controlado.

Foi observada intensa deposição de colágeno em todas as amostras de todos os grupos, sendo caracterizado pela coloração azul no Tricômio de Masson. Fibras imaturas e tecido conjuntivo frouxo (endotendão) também se coraram em azul. Nesta coloração, pode-se observar facilmente a presença de tecido muscular (corado em vermelho) nas amostras, facilitando a interpretação do paralelismo de fibras, uma vez que a identificação das fibras musculares é mais difícil na coloração H&E. A dificuldade na interpretação do reparo de amostras de ligamento suspensório pela presença de tecido muscular também é relatada no trabalho de McClure et al (2004). A coloração de fibras musculares também facilitou a identificação de pequenas arteríolas, uma vez que as fibras musculares em sua parede coraram-se em vermelho.

Quanto à avaliação semi-quantitativa dos cortes corados por H&E e Tricômio de Masson, não foram observadas diferenças estatísticas na maior parte das variáveis estudadas. Apesar de não significativo ($P = 0,08$), observou-se melhor paralelismo de fibras nos grupos tratados em relação ao grupo controle negativo (Figura 2). Um estudo com maior número de repetições talvez seja suficiente para detectar diferenças estatísticas nesta variável.

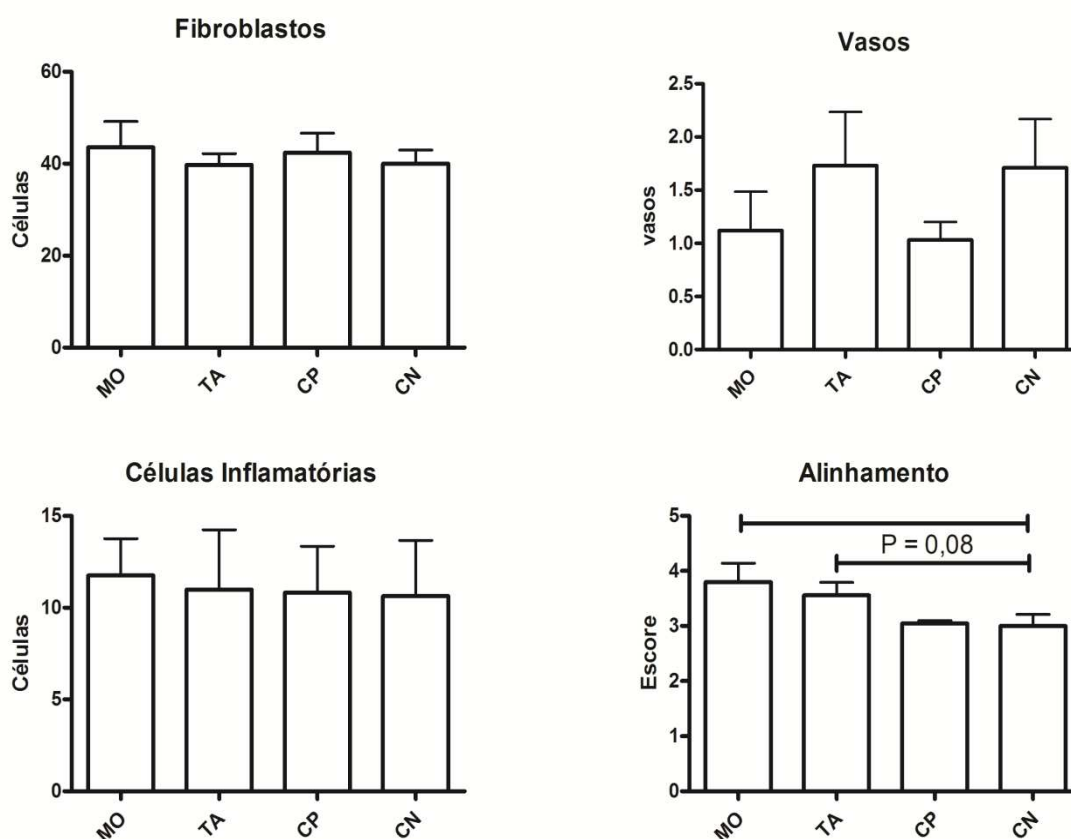


Figura 2: Gráficos apresentando as variáveis estudadas na coloração HE. Não houve diferença significativa para a contagem de fibroblastos, vasos e células inflamatórias entre os grupos. Porém houve maior escore para organização de fibras apresentado pelas amostras dos grupos MO e TA em relação aos demais grupos, apesar desta diferença não ser significativa ($P < 0,05$).

O MO foi o grupo que apresentou maiores escores para o alinhamento das fibras, demonstrando maior organização tecidual neste grupo. Resultados semelhantes também foram verificados em outros trabalhos na literatura utilizando tendões equinos lesionados e tratados com células mononucleares derivadas de medula (Oliveira, 2008; Schnabel et al, 2009; Crovace et al, 2010; Oliveira et al, 2011). Foi observado o maior paralelismo e formação de feixes de fibra colágena, porém não foram observadas ainda ondulações representativas (*crimp*), características dessas fibras.

O grupo TA também apresentou melhores escores que o grupo CN na organização das fibras colágenas, apesar de não ter alcançado significância estatística ($P = 0,08$). Melhor organização tecidual em lesões agudas utilizando células mononucleares oriundas de tecido adiposo também foi observada em experimento semelhante realizado por Nixon et al (2007) (Figura 3).

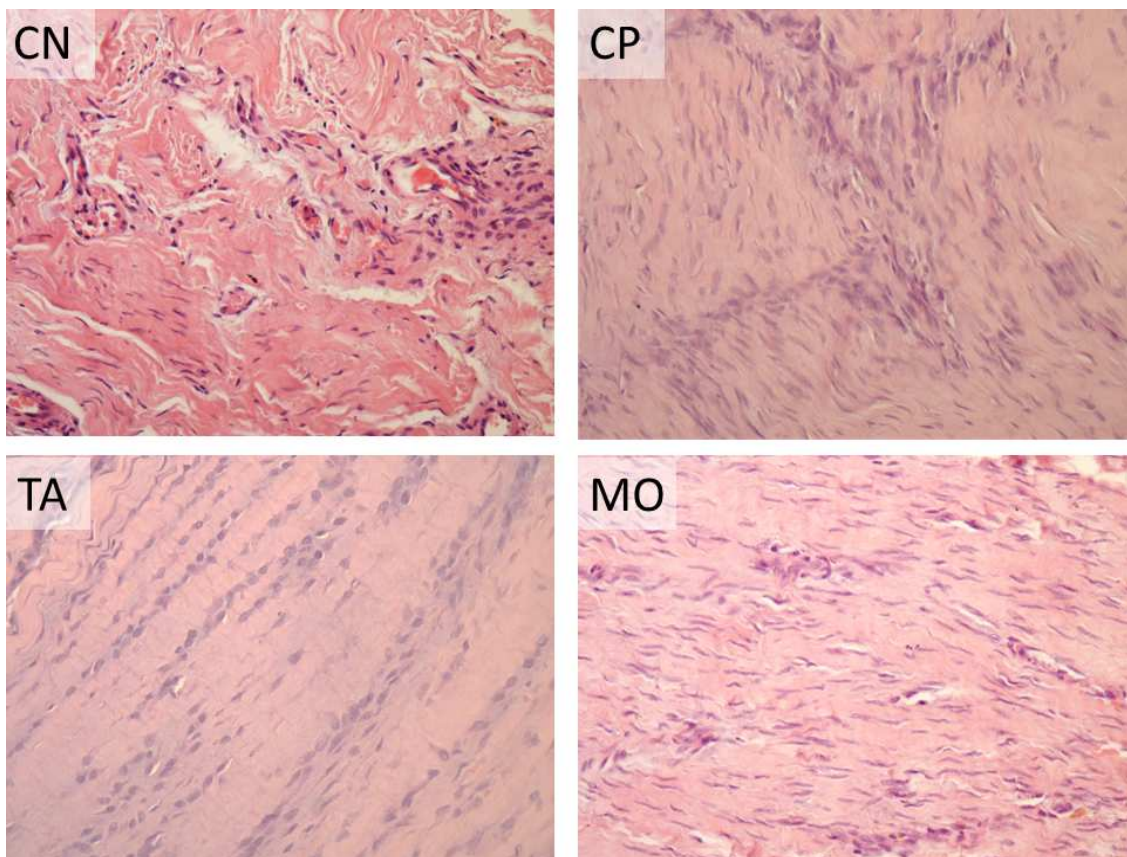


Figura 3: Fotomicrografias de ligamentos suspensórios equinos lesionados, controles negativo (CN) e positivo (CP) e submetidos a terapia celular à base de medula óssea (MO) ou tecido adiposo (TA). Hematoxilina e Eosina (microscopia óptica, aumento de 400X). Em CN e CP, observa-se alta vascularização e desorganização de fibras. MO, observar maior paralelismo de fibras, neoformação vascular e hiper celularidade, TA, maior organização tecidual, fibroblastos com núcleo predominantemente ovalado indicando maior atividade.

Por meio do tricômio de Massom observou-se uma proporção variável de tecido muscular nas amostras dos diferentes grupos (Figura 4). Isso condiz com a literatura, pois a quantidade de tecido muscular no ligamento suspensório é variável de acordo com idade, raça, genética e

atividade física do animal (McIlwraith, 2006; Halper et al, 2006; Soares, 2008). Também foi observado tecido adiposo em algumas amostras, tecido que também faz parte da constituição do ligamento suspensório.

Com relação ao número de fibroblastos, não houve diferença significativa entre os grupos tratados e controles na contagem total. O aumento na celularidade tecidual foi relatado nos trabalhos realizados por Oliveira et al (2011) e Barreira (2005), este último principalmente no grupo tratado, sendo observado o predomínio da fase de reparo no grupo tratado e de inflamação no grupo controle. Esta característica também foi observada nas lesões tendíneas tratadas com células cultivadas derivadas de tecido adiposo em estudo realizado por Carvalho (2009), nas amostras coletadas 60 dias após a indução da lesão. No entanto neste último, foi observado fibroblastos com núcleo mais alongados nos animais tratados quando comparados ao grupo controle, fato não observado no presente experimento.

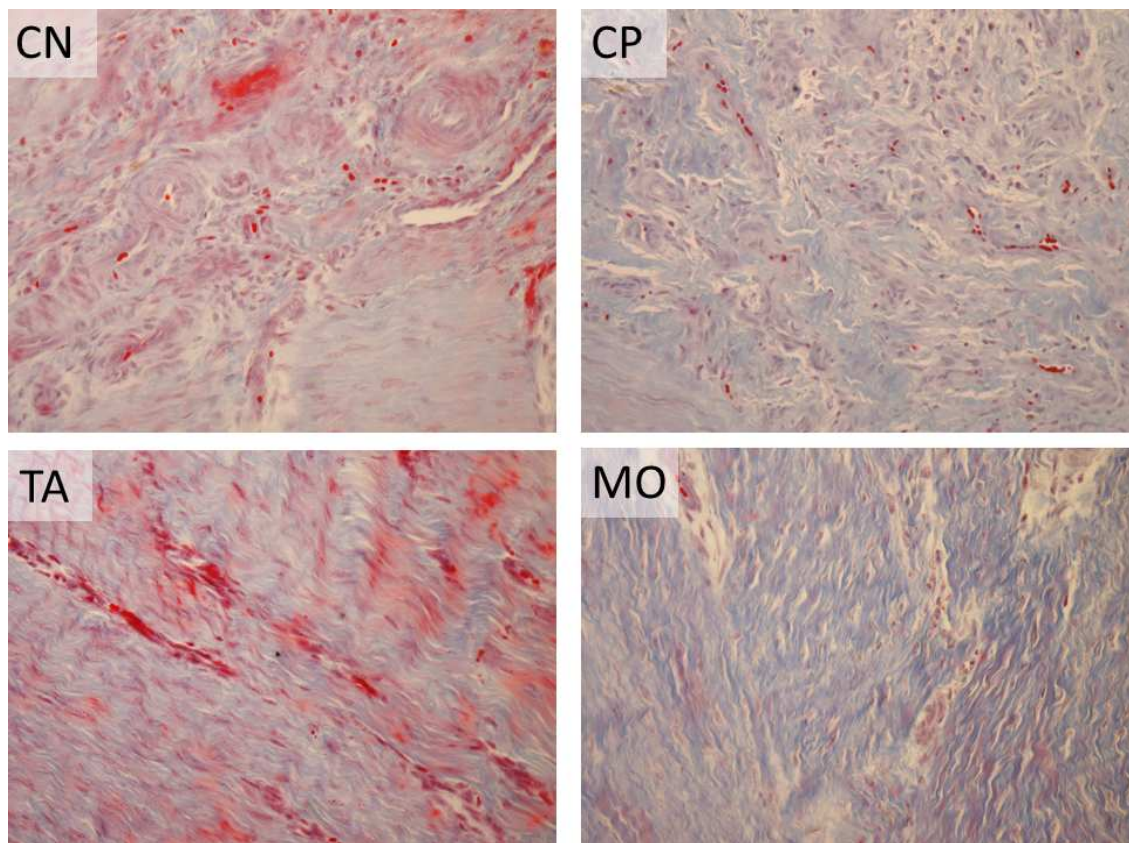


Figura 4: Fotomicrografias de ligamentos suspensórios equinos lesionados controles negativo (CN) e positivo (CP) e submetidos a terapia celular à base de medula óssea (MO) ou tecido adiposo (TA), corados por Tricômio de Massom (microscopia óptica, aumento 400X). MO e TA, apresentam maior paralelismo de fibras quando comparados aos grupos controle, CN e CP. Alta vascularização dos grupos controles. Observar fibras musculares coradas em vermelho em meio às fibras colágenas coradas em azul. As hemácias também coraram-se fortemente em vermelho, o que facilita a observação dos vasos e presença de hemorragia.

A morfologia dos fibroblastos também pode estar relacionada não somente com seu estado de ativação, mas também de acordo com a deformação sofrida pelas fibras uma vez que os fibroblastos se aderem à elas (Provenzano et al, 2002b). Células com morfologia condróide

encontradas em algumas amostras neste experimento também foram observados nas amostras de tendão no experimento de Barreira (2005). O autor observou certa dificuldade na diferenciação destas células com característica condróide, dificuldade também observada neste estudo. Segundo autor, estas células indiferenciadas sugerem grau de maturação inicial do tecido.

6.1.1.2 Pricosírius Red

Nas lâminas coradas por pricosírius red, a área de lesão pôde ser identificada claramente na maior parte das lâminas, sendo caracterizada pela coloração verde e baixa birrefringência sobre a luz polarizada. A coloração verde é expressada pelas fibras de colágeno Tipo III (predominante na área de lesão), enquanto que a coloração vermelha/rosada ou amarela de alta birrefringência é observada nas regiões compostas predominantemente por colágeno Tipo I (Montes, 1996; Ortega et al, 2003). As áreas onde a coloração verde era observada se encontravam predominantemente na região central do corte, em regiões onde as fibras se apresentavam desorganizadas (Figura 5).

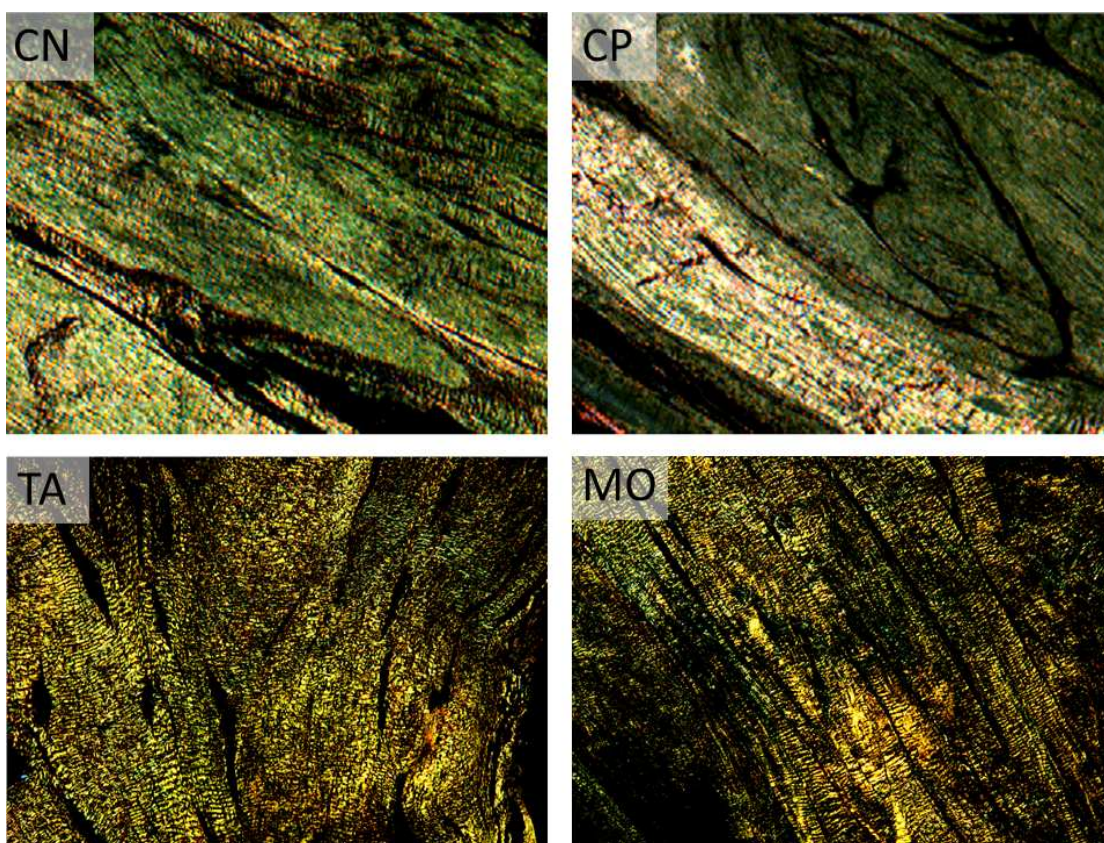


Figura 5: Fotomicrografias de ligamentos suspensórios equinos lesionados controles negativo (CN) e positivo (CP) e submetidos a terapia celular à base de medula óssea (MO) ou tecido adiposo (TA). pricosírius red (microscopia óptica sob luz polarizada, aumento 100X). MO e TA apresentam maior concentração de colágeno Tipo I, caracterizado pela maior birrefringência e coloração amarela. CN e CP apresentam maior concentração de colágeno Tipo III, caracterizado pela reduzida birrefringência e coloração verde. Observar alto nível de desorganização de fibras coradas em verde.

As regiões com presença de tecido de reparo também apresentaram menor birrefringência pela presença de muitos fibroblastos e células inflamatórias. Esta alteração na birrefringência de

regiões com alta celularidade e presença de infiltrado inflamatório pode ser devido à alteração do pH desencadeado pelas células inflamatórias (Alves et al, 2001). O restante das amostras se coraram predominantemente em amarelo, demonstrando a possível presença predominante do colágeno Tipo I no material coletado. Nas regiões das amostras onde observava-se a presença de músculo, o material não birrefringia sob a luz polarizada.

É importante ressaltar que alguns artefatos e a própria característica da amostra (espessura) pode alterar a birrefringência apresentada pela mesma. Isso foi observado no trabalho de Alves et al (2001) no estudo do processo de reparo de tendões submetidos ao tratamento com fumarato beta-aminopropionitril. Foi observado, assim como neste trabalho, que a espessura das amostras e a presença de “dobras” afetavam a cor e a intensidade da birrefringência apresentada pelas fibras nesta coloração.

Foi encontrada diferença estatística em relação à concentração de colágeno Tipo I entre os resultados obtidos pelos grupos MO e TA em relação aos grupos controle (CP e CN), mas não houve diferença estatística entre os grupos tratados (Figura 6).

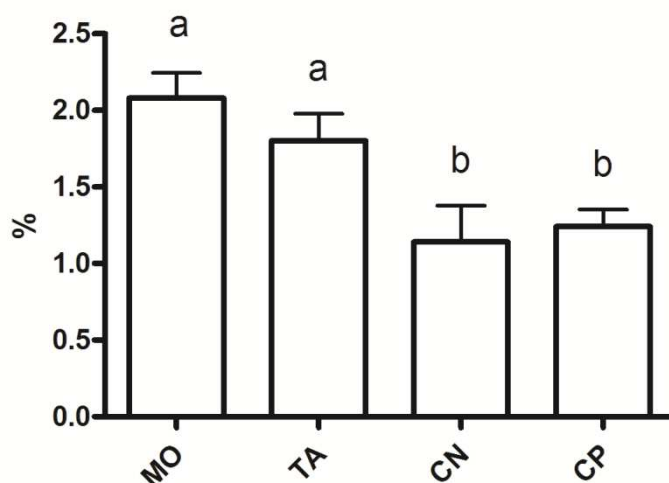


Figura 6: Médias e erros padrões dos graus de intensidade da presença de colágeno tipo I apresenta nos grupos tratados (MO e TA) e controles (CP e CN) obtidos por meio da coloração de Pricosírius red. MO e TA apresentam diferença estatística ($P < 0,05$) com relação aos grupos controles. Barras seguidas de letras iguais não diferem entre si.

De forma coerente, verificou-se que a quantidade de colágeno tipo I estava diretamente correlacionada ($r=0,66$, $P = 0,0017$) com o alinhamento das fibras colágenas observado na coloração HE (Figura 7), sendo ambas características associadas à melhor organização e evolução no processo de reparo ligamentar. Esses achados condizem com a literatura, que explica que a intensidade da birrefringência observada pela microscopia polarizada é inversamente relacionada ao remodelamento das fibras, uma vez que somente moléculas orientadas apresentam alta birrefringência. As fibras colágenas geralmente formam feixes espessos e organizados que apresentam alta birrefringência (Rodríguez et al, 2003).

Os resultados do grupo TA foram similares ao MO. Nixon et al (2008), verificaram que, tendões tratados por células derivadas de tecido adiposo apresentaram birrefringência significativa sob a luz polarizada nesta coloração. De modo geral a maior organização e uniformidade tecidual apresentada pelos animais tratados foi observada através da maior intensidade na birrefringência apresentada nas amostras. Talvez o reparo observado nessas amostras fosse mais significativo se os animais tivessem sido submetidos à fisioterapia, uma vez que sabe-se que o exercício controlado auxilia no processo de remodelamento das fibras colágenas (Alves et al, 2001). No presente trabalho, optou-se por deixar os animais de repouso, visto que a lesão induzida foi em todos os membros.

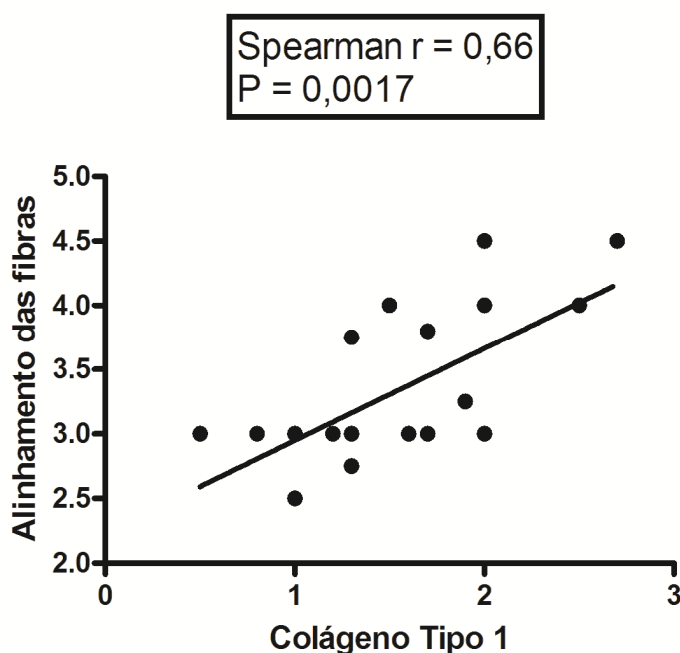


Figura 7: Correlação entre o alinhamento das fibras colágenas observado na coloração HE e a intensidade de colágeno tipo I obtida pela coloração pricosírius.

6.1.2 Análise Imunoistoquímica para colágeno Tipo III

Na amostra de ligamento sadio utilizada para testar o protocolo, observou-se marcação muito fraca e difusa para colágeno Tipo III, sendo observada mais intensa na região do endotendão (rica em colágeno Tipo III) e nas bordas da amostra (reação de fundo). Tal resultado, condiz com o estudo realizado por Satomi et al (2008) em tendões. Ao estudar a constituição do tendão tibial posterior de humanos, tais autores demonstraram através de imunofluorescência, que as fibras de colágeno Tipo III interagem com as fibras de colágeno Tipo I e os vasos correspondentes no tendão sadio, em um padrão homogêneo (Figura 8).



Figura 8: Fotomicrografia de ligamento sadio submetido à imunohistoquímica para colágeno Tipo III. Observar marcação fraca e difusa na amostra

Nas amostras dos animais estudados neste experimento (ligamentos lesionados), observou-se marcação forte e difusa na maior parte das amostras, com algumas regiões mais escuras (Figura 9). Este achado também condiz com os estudos de Oliveira et al (2011) e Satomi et al (2008). Este último, ao estudar tendões tibiais com tendinopatias, observou a distribuição difusa e proeminente das fibras de colágeno Tipo III na matriz tendínea.

Nas regiões que apresentaram alta celularidade não foi observado marcação, somente na região ao redor das células (Figura 9). Este fato também foi verificado em Carvalho (2009) e Nixon et al (2008).

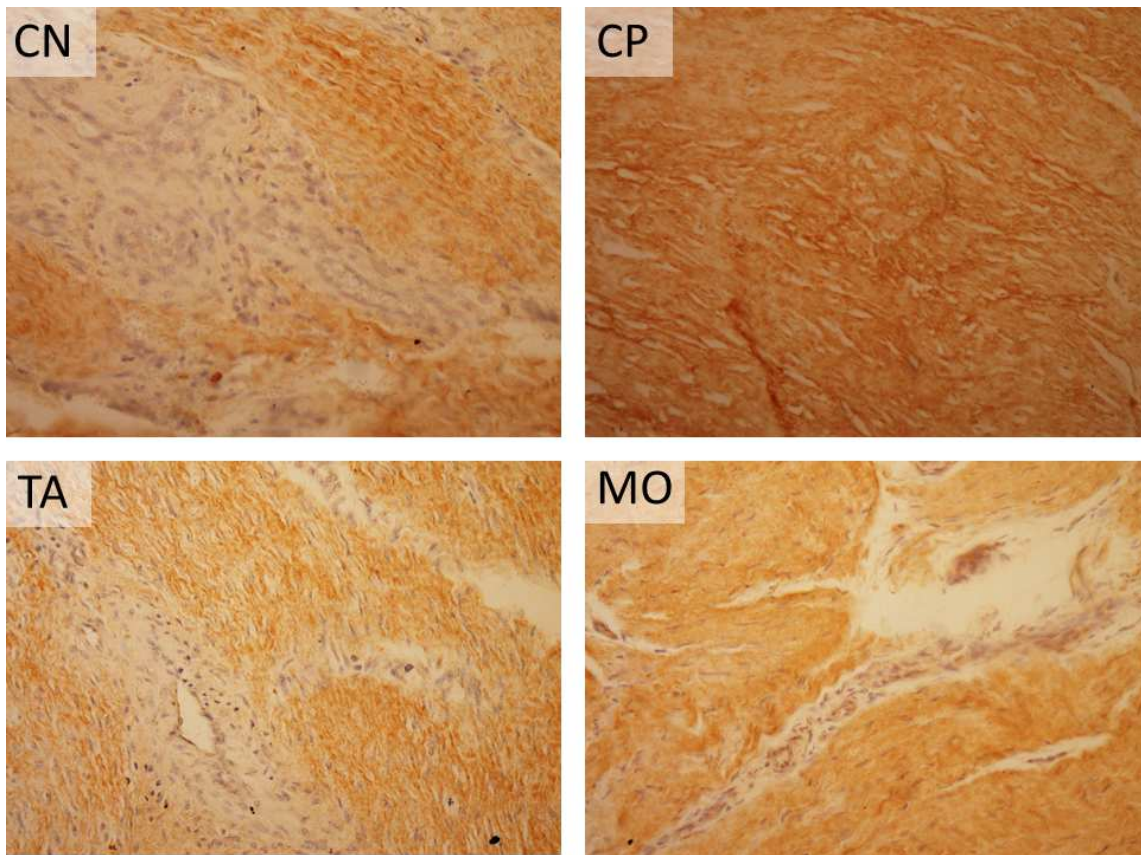


Figura 9: Fotomicrografias de ligamentos suspensórios equinos lesionados controles negativo (CN) e positivo (CP) e submetidos a terapia celular à base de medula óssea (MO) ou tecido adiposo (TA). Marcação imunohistoquímica marrom (DAB, hematoxilina na contra-coloração) forte e difusa para colágeno Tipo III nas amostras dos diferentes grupos (microscopia óptica, aumento 400X). Observar ausência de marcação em regiões com alta celularidade em CN.

As amostras estudadas dos diferentes grupos não apresentaram diferença significativa na marcação para colágeno Tipo III na imunohistoquímica (Figura 10). Resultados semelhantes foram observados no experimento de Oliveira (2008) e Oliveira et al (2011). No teste imunohistoquímico diferenças estatísticas foram encontradas em relação à marcação para colágeno Tipo I, sendo mais intensa no grupo tratado com células derivadas de medula, mas não houve diferença em relação à marcação para colágeno Tipo III entre os grupos tratado e controle, apesar do período de experimento ter sido maior (120 dias) que neste estudo.

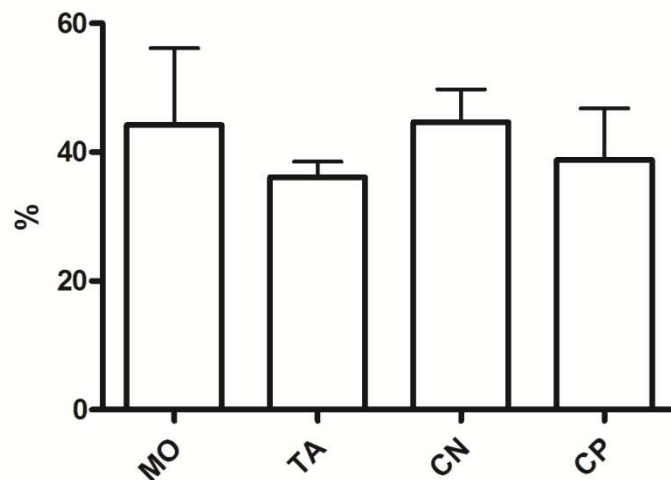


Figura 10: Médias e erros padrões para porcentagem de área marcada por imunohistoquímica para colágeno Tipo III nos grupos tratados (MO,TA) e controles (CN e CP). Não há diferença estatística entre grupos ($P < 0,05$).

Assim como no experimento de Oliveira (2008), foi observada certa formação de fundo, e pela marcação dispersa do anticorpo na amostra, houve um pouco de dificuldade na contagem de áreas marcadas, mesmo com a utilização do programa Image Pro-Plus.

Ausência de diferenças na marcação por colágeno tipo III, entre grupos tratados e controles após 60 dias de tratamento também foi verificada em outros estudos que utilizaram terapia de choque extra-corpórea para o tratamento de lesões ligamentares em equinos (McClure et al, 2004) ou células derivadas de tecido adiposo no tratamento de tendinite induzida (Carvalho et al, 2011).

Contudo, menor expressão de colágeno tipo III foi encontrada aos 150 dias por Carvalho et al (2011) e Nixon et al (2008). A grande quantidade de colágeno tipo III observada no presente estudo, indica continuidade do processo de remodelação cicatricial, mesmo nas amostras submetidas à terapia celular.

6.2 Outras considerações

O modelo utilizado para indução da lesão (*punch*) se mostrou eficaz, promovendo uma lesão homogênea, de tamanho controlado, não alterando sua extensão com tempo, como verificado em alguns trabalhos (Caminoto, 2003; Oliveira et al, 2011). Este método também apresentou a vantagem da indução desta lesão em apenas um procedimento.

Apesar do período de estudo (60 dias) ter sido considerado curto para avaliação da cicatrização, foi possível observar a melhora na organização tecidual nas amostras tratadas com as células derivadas de medula óssea e tecido adiposo sendo semelhante ao demonstrado por outros estudos (Carvalho, 2009; Colleoni et al, 2009; Schebel et al, 2009). A otimização da

organização tecidual melhora as características biomecânicas do tecido de reparo em período relativamente curto após a injúria.

Trabalhos como o de Herthel (2001) e Smith et al (2003) já tem demonstrado os efeitos benéficos da terapia com células mononucleares derivadas de medula no tratamento da tendinite equina. Estes pesquisadores também ressaltam em seu trabalho a importância da separação destas células da medula óssea, como a realizada no presente trabalho, para excluir fatores como espículas ósseas e células de gordura, que podem ser deletérios para o tecido, além de concentrar as células para terapia.

Crovace et al (2010) demonstraram diferença significativa entre os grupos tratado e controle de tendões equinos lesionados e tratados com fração mononuclear derivada de medula, cultivada e não cultivada. Nesse experimento não houve diferença entre os tratamentos (fração mononuclear de medula e células cultivadas derivadas de medula), demonstrando o potencial da fração mononuclear de células mesmo sem apresentar a homogenicidade e número de células apresentada pela técnica de cultura. Esta técnica também tem a grande vantagem do tempo reduzido para o preparo e aplicação e menor custo (Oliveira et al, 2011).

Acredita-se que a expansão *in vitro* possa afetar a capacidade de replicação e diferenciação das células. Conseqüentemente, o potencial terapêutico dessas pode ser comprometido quando utilizado *in vivo* (Cancedda et al, 2003; Colleoni et al, 2009; Crovace et al, 2010) . Talvez este tenha sido um dos motivos pelos quais os resultados das células cultivadas derivadas de tecido adiposo neste experimento não tenham apresentado resultados tão significativos quando comparados aos animais tratados com células da fração mononuclear de medula óssea.

No entanto, em estudo realizado por Colleoni et al, (2009) demonstrou-se que células derivadas do tecido adiposo se mostraram superiores quando comparadas à células de medula com relação à capacidade de proliferação. Ademais, existem certos fatores importantes para a determinação do potencial dessas células como o tipo de doador, o meio de cultura em que as células são cultivadas, tensão de oxigênio que as células são submetidas, densidade celular da cultura entre outros.

Outro fator que talvez tenha sido limitante neste estudo foi o período entre a indução da lesão e a aplicação das células (2 dias) que pode ter sido considerado reduzido segundo autores (Smith e Webbon, 2005). Este tempo deve ser o suficiente para permitir adequada angiogênese (para nutrição celular), formação de tecido de granulação (que serviria como suporte para estas células), mas antes da formação de fibrose (Smith et al, 2003; Richardson et al, 2007; Oliveira et al, 2011).

Contudo, em dois dias de lesão aparente, Kobayashi et al (1999) já observaram formação de tecido de granulação em lesão tendínea induzida por esforço. No presente trabalho, em dois dias de lesão pôde ser observado um coágulo formado na área de lesão em um animal que veio à óbito (Soares, 2008). A análise histológica da lesão neste animal não foi realizada, mas com as observações do experimento de Kobayashi et al (1999), podemos inferir que talvez já houvesse início de formação de tecido de granulação na lesão, que apesar de não ser visível ainda na necrópsia, poderia auxiliar no suporte das células implantadas.

A lesão ligamentar estimula a liberação de uma série de células provindas dos vasos do epiligamento. Uma vez dentro do corpo ligamentar, estas células se proliferam e migram, sendo

responsáveis pela formação do tecido de granulação. Conforme o tecido de granulação é formado, as células se afastam do centro da lesão para a periferia da mesma. Também deve-se considerar que no presente estudo o potencial antiinflamatório e angiogênico das células mesenquimais poderia influenciar positivamente nas fases iniciais do processo inflamatório (Alves et al, 2011).

A capacidade de *homing* das células tronco também pode ter afetado a qualidade do reparo ligamentar (Cancedda et al, 2003). O fato de haver quatro focos de inflamação no mesmo animal e da capacidade dessas células de migrarem através da ação de fatores quimiotáticos para os diferentes locais de lesão podem ter reduzido o número de células que permaneceram no local da aplicação. Porém a maior parte dos estudos que envolve terapia celular geralmente induzem lesão em pelo menos dois membros de um mesmo animal, visto a dificuldade em se utilizar um número grande de animais nesse tipo de experimento. Ademais, no trabalho de McClure et al (2003) o autor cita que a análise do ligamento suspensório é particularmente difícil pela presença de tecido muscular neste e ressalta que a comparação direta entre membros contralaterais de um mesmo cavalo, como a realizada no presente experimento, poderia facilitar a interpretação do resultado.

Os resultados deste estudo foram semelhantes aos citados pelos trabalhos de Nixon et al (2007) e Alves et al (2011), onde acredita-se que o efeito benéfico da terapia celular pode estar mais relacionado em manter e /ou estimular a organização tecidual, retomando a funcionalidade do que a regeneração do tecido.

Apesar dos resultados positivos obtidos na coloração pricosírius red, sabe-se que esta coloração não deve ser utilizada isoladamente para a interpretação da distribuição de diferentes tipos de colágeno intersticial, especialmente em situações de rápida produção e degradação de colágeno, como nas lesões (Montes, 1996). No entanto no trabalho realizado por Alves et al (2001), o reparo tendíneo foi observado apenas utilizando técnicas histológicas como as utilizadas neste experimento, e a coloração Pricosírius sob a microscopia de luz polarizada se mostrou eficiente para a quantificação das fibras de colágeno durante o processo de remodelamento.

Apesar da diferença para a expressão de colágeno Tipo III não ter sido significativa na imunoistoquímica, e somente os resultados na histologia não poderem ser considerados para afirmarmos a eficácia da terapia utilizando-se células derivadas de medula e de tecido adiposo, outros estudos tem considerado essas variáveis histológicas como importantes para análise dessas terapias. No trabalho de Alves et al (2011), foram apresentados resultados parciais de um estudo onde tendões equinos foram tratados com células derivadas de tendões. O grupo tratado não apresentou aparentemente diferenças estatísticas significativas em comparação ao grupo controle com relação às concentrações de colágeno e proteoglicanos. Contudo, neste estudo especificamente, foi observado diferença significativa na intensidade da coloração Pricosírius Red nos animais tratados em relação aos controles.

Muito embora o número limitado de animais utilizado neste experimento ser considerado pequeno de acordo com a literatura (Alves et al, 2011) e as condições experimentais em que o uso dessas terapias foi realizado limitarem as implicações clínicas para o uso de células tronco, com estes resultados podemos inferir uma possível melhora no reparo tecidual nos animais submetidos à terapia com células derivadas de medula e de tecido adiposo quando comparados aos animais controle. Mais pesquisas utilizando um número maior de animais, diferentes tempos

de estudo e de aplicação da terapia, assim como testes imunoistoquímicos, de PCR e marcação celular são necessários para definir os reais benefícios e aplicações desta terapia.

7 CONCLUSÕES

Apesar das limitações do experimento, observou-se que ambas as terapias celulares testadas possuem potencial para melhorar a qualidade do reparo do ligamento suspensório equino, promovendo maior deposição de colágeno do tipo I que os tratamentos controle, 60 dias após sua aplicação no local da lesão.

A presença de células inflamatórias e a intensa marcação imunoistoquímica para colágeno tipo III em todos os grupos demonstra que o processo de reparo ainda está bastante ativo nesta fase. Somado-se aos vários outros estudos que vem utilizando a terapia celular no tratamento de lesões tendíneas e ligamentares em equinos, o presente estudo traz novos indícios dos efeitos benéficos deste tipo de tratamento para a melhoria da qualidade do tecido cicatricial.

8 REFERÊNCIAS

ALVES, A.L.G.; RODRIGUES, M.A.M.; AGUIAR, A.J.A.; THOMASSIAN, A.; NICOLETTI, J.L.M.; HUSSNI, C.A. BORGES, A.S. Effects of beta-aminopropionitrile fumarate and exercise on equine tendon healing: gross and histological aspects. *Journal of Equine Veterinary Science*. V. 21, n. 7, 335-340 p., 2001.

ALVES, A.G.L.; DUDHIA, J.; GOODSHIP, A.E.; SMITH, R.K.W. Cell-based therapies for tendon and ligament injuries. *Vet Clin Equine*. V. 27, 315-333 p., 2011.

BARREIRA, A.P.B. *Implante autólogo de células mesenquimais no tratamento de tendinites induzida em equinos: avaliação clínica, ultra-sonográfica e imunoistoquímica*. 2005. 86 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, Botucatu.

BUE, M. D.; RICCO, S.; RAMONI, R.; CONTI, V.; GNUDI, G.; GROLLI, S. Equine adipose-tissue derived mesenchymal stem cells and platelet concentrates: their association *in vitro* and *in vivo*. *Vet. Res. Commu.* v. 32, s. 1, S51-S55 p., 2008.

CAMINOTO, E.H. *Efeito das ondas de choque extracorpóreas na desmíte experimentalmente induzida em equinos*. 2003. 97 p. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) – Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, Botucatu.

CANCEDDA, R.; BIANCHI, G.; DERUBEIS, A.; QUARTO, R. Cell therapy for bone disease: a review of current status. *Stem Cells*. V. 21, 610-619 p., 2003.

CARVALHO, A.M. *Implante autólogo de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo no tratamento de tendinites experimentais em equinos: avaliação clínica, ultrassonográfica, histopatológica e imunoistoquímica*. 2009. 133 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, Botucatu.

CARVALHO, A.M.; ALVES, A.L.; OLIVEIRA, P.G.G.; ÁLVAREZ, L.E.C.; AMORIM, R.L.; HUSSNI, C.A.; DEFFUNE, E. Use of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for experimental tendinitis therapy in equines. *Journal of Equine Veterinary Science*. v. 31, 26-34 p., 2011.

CHAMBERLAIN, C. S.; CROWLEY, E.; VANDERBY, R. The spatio-temporal dynamics of ligament healing. *Wound Rep. Reg.* v. 17, 206-215 p., 2009.

CHAMBERLAIN, C. S.; LEIFERMAN, E. M. ; FRISCH, K. E. ; WANG, S. ; YANG, X. ; BRICKSON, S. L.; VANDERBY, R. The influence of interleuin-4 on ligament healing. *Wound Rep. Reg.*, v. 19,426-435 p., 2011a.

CHAMBERLAIN, C.S.; LEIFERMAN, E.M.; FRISCH, K. E. ; WANG, S. ; YANG, X.; ROOIJEN, N.; BRICKSON, S.L.; VANDERBY, R. The influence of macrophage depletion on ligament healing. *Connect. Tissue Res.* v. 52, n.3,203-211 p., 2011b.

CHEN, F., -M.; WU, L.; -A.; ZHANG, R.; SUN, H., -H. Homing of endogenous stem/progenitor cells for *in situ* tissue regeneration: promises, strategies, and translational perpectives. *Biomaterials*. v. 32, 3289-3209 p., 2011.

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

CROVACE, A.; LACITIGNOLA, L.; ROSSI, G.; FRANCIOSO, E.; Histological and immunohistochemical evaluation of autologous cultured bone maroos mesenchymal stem cells and bone marrow mononucleated cells in collagenase-induced tendinitis of equine superficial digital flrxor tendon. *Veterinary Medicine International*. v. 2010, 1-10 p., 2010.

DAHLGREN, L. A. Pathobiology of tendon and ligament injuries. *Clin Tech Equine Pract.* n. 6, 168-173 p., 2007.

DOROSKI, D.M.; BRINK, K. S.; TEMENOFF, J. S. Techniques for biological characterization of tissue-engineered tendon and ligament. *Biomaterials*. v. 28, 187-202 p., 2007.

DOWLING, B.A.; DART, A.J.; HODGSON, D.R.; SMITH, R.K.W. Review article -Superficial digital flexor tendonitis in the horse. *Equine vet. J.* v. 32, n. 5, 369-378 p., 2000.

DOWLING, B.A.; DART, A.J. Mechanical and functional properties of the equine superficial digital flexor tendon. *The Veterinary Journal*. v. 170,184-192 p., 2005.

DYSON, S. Proximal suspensory desmitis in the hindlimb: 42 cases. *Br. Vet. J.* v. 150, n. 3, 279-291 p., 1994.

DYSON, S. Proximal suspensory desmitis in the forelimb and the hindlimb. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AAEP, 2000, San Antonio. *Proceedings*.. 137 -142 p.

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

GOH, J. C. -H.; OUYANG, H.-W.; TEOH, S.-H.; CHAN, C. K. C.; LEE, E. -H. Tissue-engineering approach to the repair and regeneration of tendons and ligaments. *Tissue Engineerin.*, v. 1, s. 1,31-44 p., 2003.

HALPER, J.; KIM, B.; KHAN, A.; YOON, J.H.; MUELLER, P.E. Degenerative suspensory ligament desmitis as a systemic disorder characterized by proteoglycan accumulation. *BMC Veterinary Research*. v. 2, n.12, 1-14 p., 2006.

HERTHEL, D.J. Enhanced suspensory ligament healing in 100 horses by stem cells and other bone marrow components. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AAEP, 47, 2001, San Diego. *Proceedings...* 2001. 319 – 321 p.,

HIBBS, M.S.; MAINARDI, C.L.; KANG, A.H. Type-specific collagen degradation by eosinophils. *Biochem*. V. 207, 621-624 p., 1982.

KEW, S.J.; GWYNNE, J. H.; ENEA, D.; ABU-RUB, M.; PANDIT, A.; ZEUGOLIS, D.; BROOKS, R.A.; RUSHTON, N.; BEST, S.M.; CAMERON, R. E. Regeneration and repair of tendon and ligament tissue using collagen fibre biomaterials. *Acta Biomaterialia*. 2011.

KOBAYASHI, A.; SUISAKA, M.; TAKEHANA, K.; YAMAGUCHI, M.; EERDUNCHAOLU, IWASA, K.; ABE, M. Morphological and histochemical analysis of a case of superficial digital flexor tendon injury in the horse. *J. Comp. Path*. v. 120,403-414 p., 1999.

LUQUE, E.H.; RAMOS, J.G.; RODRIGUEZ, H.A.; TORO, M.M.M. Dissociation in the control of cervical eosinophilic infiltration and collagenolysis at the end of pregnancy or after pseudopregnancy in ovariectomized steroid-treated rats. *Biology of Reproduction*. v. 55, 1206-1212 p., 1996.

McILWRAITH, C.W. Doenças das articulações, tendões, ligamentos e estruturas relacionadas. In: STASHAK, T.S. *Claudicação em equinos segundo Adams*. Tradução de: Clarisse Simões Coelho, Melanie Scholzil. 5ª ed. São Paulo: Roca, 2006, cap. 7, 417 – 597 p., Título Original: Adam's lameness in horses – fifth edition.

McCLURE, S.R.; VANSICKLE, D.; EVANS, R.; REINERTSON, E. L.; MORAN, L. The effects of extracorporeal shock-wave therapy on the ultrasonographic and histologic appearance of collagenase-induced equine forelimb suspensory ligament desmitis. *Ultrasound in Med. & Biol.*, v. 30, n. 4, 461-467 p., 2004.

MELVIN, N.J.; BOIVIN,G.P.; GOOCH, C.; GALLOWAY, M.T.; WEST, J.R.; DUNN, M.G.; BUTTLER, D.L. The effect of autologous mesenchymal stem cells on the biomechanics and histology of gel-collagen sponge constructs used for rabbit patellar tendon repair. *Tissue Engineering*, v.12, n.2, 369-379 p., 2006.

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

NIBEYRO, S. D. G. Commercial cell-based therapies for musculoskeletal injuries in horses. *Vet Clin Equine*. 1-9 p., 2011.

NIXON, A.J.; DAHLGREN, L.A.; HAUPT, J.L.; YEAGER, A.E.; WARD, D.L. Effect of adipose-derived nucleated cell fractions on tendon repair in horses with collagenase-induced tendinitis. *AJVR*. V. 69, n.7, 928-937 p., jul. 2008.

OLIVEIRA, P.G.G. *Implante autólogo de células mononucleares provenientes de medula óssea no tratamento de tendinites induzidas experimentalmente em equinos: avaliação a longo prazo – 120 dias*. 2008. 148 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, Botucatu.

OLIVEIRA, P.G.G.; ALVES, A.L.G.; CARVALHO, A.M.; HUSSI, C.A.; WATANABE, M.J.; AMOREIM, R.L.; RODRIGUEZ, M.M.P.; MOTA, L.S. Uso de células mononucleares da medula óssea no tratamento de tendinites induzidas experimentalmente em equinos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. v. 63, n. 6, 1391-1398 p., 2011.

ORTEGA, H.H.; MUÑOZ-DE-TORO, M.M.; LUQUE, E.H.; MONTES, G.S. Morphological characteristics of the interpubic joint (*Symphysis pubica*) of rats, guinea pigs and mice in different physiological situations – a comparative study. *Cells Tissues Organs*. v. 173, 105-144 p., 2003.

POUNTOS, I.; CORSCADDEN, D.; EMERY, P.; GIANNOUDIS, P. V. Mesenchymal stem cell tissue engineering: techniques for isolation, expansion and application. *Injury: Int. J. Care Injured*. v. 38S4,S23-S33 p., 2007.

PROVENZANO, P.P.; HAYASHI, K.; KUNZ, D. N.; MARKEL, M. D.; VANDERBY Jr., R. Healing of subfailure ligament injury: comparison between immature and mature ligaments in a rat model. *Journal of Orthopaedic Research*. v. 20, 975-983 p., 2002a.

PROVENZANO, P.P.; HEIZED, D.; HAYASHI, K.; LAKES, R.; VANDERBY Jr., R. Subfailure damage in ligament: a structural and cellular evaluation. *J Appl Physiol*. v. 92, 362-371 p., 2002b.

PUISSANT, B.; BARREAU, C.; BOURIN, P.; CLAVEL, C.; CORRE, J.; BOSQUET, C.; TAUREAU, C.; COUSIN, B.; ABBAL, M.; LAHARRAUGUE, P.; PENICAUD, L.; CASTEILLA L.; BLANCHER, A. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *British Journal of Haematology*. v. 129, 118-129p., 2005.

REES, J.D.; MAFFULLI, N.; COOK, J. Management of tendinopathy. *Am. J. Sports Med*. v. 37, n.9,1855-1867 p., 2009.

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

RODRÍGUEZ, H.A.; ORTEGA, H.H.; RAMOS, J.G.; TORO, M.M.; LUQUE, E.H. Guinea-pig interpubic joint (symphysis pubica) relaxation at parturition: underlying cellular processes that

resemble an inflammatory response. *Reproductive Biology and Endocrinology*. v. 1, n. 113, 1-9 p., 2003. Disponível em: < <http://www.rbej.com/content/1/1/113>>. Acesso em: 27 ago. 2012.

SATOMI, E.; TEODORO, W.R.; PARRA, E.R.; FERNANDEZ, T.D.; VELOSA, A.P.; CAPELOZZI, V.L.; YOSHINARI, N. H. Changes in histoanatomical distribution of types I, III and V collagen promote adaptative remodeling in posterior tibial tendon rupture. *Clinical Science*. V.63, n.1, 9-14 p., 2008.

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

SCHWARZBACH, S. V.; PAGLIOSA, G. M.; ROSCOE, M. P.; ALVES, G. E. S. Ligamento suspensório da articulação metacarpo/metatarso falangianas nos equinos: aspectos evolutivos, anatômicos, histofisiológicos e das afecções. *Ciência Rural*. v. 38, n. 4, 1193-1198 p., jul, 2008.

SCUTT, N.; ROLF, C.G.; SCUTT, A. Tissue specific characteristics of cells isolated from human and rat tendon and ligament. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*. v. 3, n. 32, 1-11 p., 2008.

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

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

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.

STEWART, M.C. Cell-based therapies: current issues and future directions. *Vet Clin Equine*. v. 27, 393-399 p., 2011.

SOARES, A.S. *Avaliação ultrassonográfica de dois protocolos de terapia celular no reparo do ligamento suspensório em equinos*. 2008.70 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

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

TUAN, R.S.; BOLAND, G.; TULI, R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Research and Therapy*. v. 5, n. 1, 32-45 p., 2002.

VIDAL, M.A.; KILROY, G.E.; JOHNSON, J.R.; LOPEZ, M.J.; MOORE, R.M.; GIMBLE, J.M. Cell growth characteristics and differentiation frequency of adherent equine bone marrow-

derived mesenchymal stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity. *Veterinary Surgery*. v. 35, 601-610 p., 2006.

XIE, L.; SPENCER, N. D.; BEADLE, R. E.; GASCHEN, L.; BUCHERT, M.R.; LOPEZ, M. J. Effects of athletic conditioning on horses with degenerative suspensory ligament desmitis: a preliminary report. *The Veterinary Journal*, 2010.

WOO, S. L.-Y.; DEBSKI, R. E.; ZEMINSKI, J.; ABRAMOWITCH, S. D.; SAW, S.S.C.; FENWICK, J.A. Injury and repair of ligaments and tendons. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* v. 2, 83-108 p., 2000.

WOO, S. L.-Y.; CHAN, S. S.; YAMAJI, T. Biomechanics of Knee ligament healing, repair and reconstruction. *J. Biomechanics*. v. 30, n.5,431-439 p., 1997.

ZHANG, J.; PAN, T.; IM, H. -J.; FU, F. H. ; WANG, J. W.C. Differential properties of human ACL and MCL stem cells may be responsible for their differential healing capacity. *BMC Medicine*. v. 9, n. 68, 1-14 p., 2011.