

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
COMISSÃO DE ESTÁGIO CURRICULAR**

**MONOGRAFIA DE CONCLUSÃO DE CURSO**

Utilização de Terapias Celulares no Tratamento de Afecções Tendíneas, Articulares e Ligamentares em Equinos

**Autora:** Gabriela Lye Suzuki Santos

**Porto Alegre**

**2012/2**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
COMISSÃO DE ESTÁGIO CURRICULAR**

**MONOGRAFIA DE CONCLUSÃO DE CURSO**

Utilização de Terapias Celulares no Tratamento de Afecções Tendíneas, Articulares e Ligamentares em Equinos

**Autora:** Gabriela Lye Suzuki Santos

**Monografia apresetada à Faculdade de Veterinária como requisito parcial para obtenção da Graduação em Medicina Veterinária**

**Orientador:** Prof<sup>a</sup>. Dra. Petra Garbade

**Co-orientador:** M.V. Gabriela Richter

**Porto Alegre**

**2012/2**

## RESUMO

O presente trabalho, realizado a partir de revisão de literatura, tem como objetivo dissertar sobre a utilização de terapias celulares no tratamento de afecções tendíneas, articulares e ligamentares em equinos. O plasma rico em plaquetas (PRP) é uma fonte autógena que contém vários fatores de crescimento importantes na reparação tecidual devido à ação mitogênica, quimiotática e neovascular. A utilização do PRP tem sido proposta principalmente na reparação de afecções tendo-ligamentosas em equinos. A proteína antagonista do receptor de interleucina-1 (IRAP) tem como função ligar-se aos receptores de interleucina-1 (IL-1), impedindo assim a interação da IL-1 com o seu receptor. Como a IL-1 tem um papel importante na cascata inflamatória, causando sinovite e dor articular, ao bloquear essa interação, a IRAP pode diminuir a dor e a inflamação, criando-se condições para uma recuperação da funcionalidade articular de forma mais rápida e eficaz. As células-tronco tem a capacidade de auto-renovação e se diferenciam em um ou vários tipos celulares. Podem ser isoladas a partir do tecido adiposo ou da medula óssea do próprio animal, bem como serem aplicadas na recuperação de tecidos moles do aparelho locomotor de equinos. As terapias celulares auxiliam no processo de cura das lesões, promovendo regeneração e reduzindo a formação de cicatrizes, porém muitas lacunas relativas ao seu respeito ainda devem ser preenchidas.

**Palavras-chave:** equinos; PRP; IRAP; células tronco.

## **ABSTRACT**

*The current study, based in literature review, aims to discuss the employment of cellular therapies for the treatment of equine tendon, joint and ligament injuries. Platelet rich plasma (PRP) is an autologous source that contains several growth factors which are important in proper wound healing, it has mitogenic, chemotactic and neovascular actions. The PRP utilization has been mostly proposed to be used in tendon and ligamentous injuries repair. Interleukin-1 is a cytokine that plays an important role in the regulation of inflammatory responses, and it can induce synovitis and joint pain. The interleukin-1 receptor antagonist protein (IRAP) binds to the interleucine-1 (IL-1) receptor and when this interaction is created, the proinflammatory action of IL-1 is blocked. Therefore, IRAP can decrease pain and inflammation, creating conditions to the joint to functionally recover more quickly and effectively. The stem cells have the competence to auto-renovate and differentiate themselves in one or several cellular types. They can be segregated from adipose tissue or from bone marrow collected from the animal and they can be used on soft tissue lesions of the equine locomotors apparatus, helping its recovery. The cellular therapies improve wound healing, promoting successful regeneration and reducing the scar formation, but there are still many gaps regarding their effectiveness that need to be fulfilled.*

**Key-words:** horses, PRP, IRAP, stem cell.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>%</b>	Percentual
<b>°C</b>	Grau Celsius
<b>ACS</b>	Soro Autólogo Condicionado
<b>AINE</b>	Antiinflamatório Não Esteroidal
<b>CT</b>	Células Tronco
<b>CTA</b>	Células Tronco Adultas
<b>CTM</b>	Células Tronco Mesenquimais
<b>CTS</b>	Células Tronco Somáticas
<b>FC</b>	Fatores de Crescimento
<b>IL-1</b>	Interleucina-1
<b>IL-1ra</b>	Antagonista do receptor de interleucina-1
<b>IL-6</b>	Interleucina-6
<b>IRAP</b>	Proteína Antagonista de Receptor de Interleucina-1
<b>kDa</b>	Kilodaltons
<b>LS</b>	Ligamento Suspensório
<b>MO</b>	Medula Óssea
<b>PGE2</b>	Prostaglandina E2
<b>PRP</b>	Plasma Rico em Plaquetas
<b>TA</b>	Tecido Adiposo
<b>TGF-β1</b>	Fator Beta de Transformação de Crescimento

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>PLASMA RICO EM PLAQUETAS.....</b>	<b>9</b>
<b>2.1</b>	<b>História e origem da utilização.....</b>	<b>9</b>
<b>2.2</b>	<b>Composição.....</b>	<b>10</b>
<b>2.2.1</b>	Plaquetas.....	10
<b>2.2.2</b>	Ativação plaquetária e fatores de crescimento.....	10
<b>2.2.3</b>	Células sanguíneas brancas e vermelhas.....	11
<b>2.2.4</b>	Proteínas plasmáticas.....	11
<b>2.3</b>	<b>Aplicações do PRP na medicina equina.....</b>	<b>11</b>
<b>2.4</b>	<b>Métodos de obtenção do PRP.....</b>	<b>13</b>
<b>2.5</b>	<b>Protocolos de obtenção do PRP.....</b>	<b>13</b>
<b>2.6</b>	<b>Administração de PRP.....</b>	<b>14</b>
<b>2.7</b>	<b>Segurança.....</b>	<b>15</b>
<b>3</b>	<b>PROTEÍNA ANTAGONISTA DO RECEPTOR DE INTERLEUCINA-1.....</b>	<b>17</b>
<b>3.1</b>	<b>História e origem da utilização.....</b>	<b>17</b>
<b>3.2</b>	<b>Nomenclatura.....</b>	<b>17</b>
<b>3.3</b>	<b>Interleucina-1.....</b>	<b>18</b>
<b>3.4</b>	<b>Antagonista do receptor de interleucina-1 (IL-1ra).....</b>	<b>19</b>
<b>3.4.1</b>	Aplicações terapêuticas de IL-1ra.....	19
<b>3.5</b>	<b>Indicações musculoesqueléticas para a utilização de IRAP.....</b>	<b>20</b>
<b>3.6</b>	<b>Estudos em equinos.....</b>	<b>20</b>
<b>3.7</b>	<b>Preparo e administração.....</b>	<b>21</b>
<b>4</b>	<b>CÉLULAS TRONCO.....</b>	<b>22</b>
<b>4.1</b>	<b>História e origem da utilização.....</b>	<b>23</b>
<b>4.2</b>	<b>Células tronco da medula óssea e do tecido adiposo.....</b>	<b>24</b>
<b>4.3</b>	<b>Células-tronco e sua aplicabilidade no tratamento de lesões tendíneas e ligamentares nos membros dos equinos.....</b>	<b>25</b>
<b>4.4</b>	<b>Colheita de células-tronco adultas nos equinos.....</b>	<b>26</b>
<b>4.4.1</b>	Complicações da punção de medula óssea nos equinos.....	27
<b>4.5</b>	<b>Protocolo de aplicação de células-tronco em tendão e ligamentos.....</b>	<b>28</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>29</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>31</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui o terceiro maior rebanho de equinos do mundo, e o agronegócio relacionado com a espécie resulta em um faturamento da ordem de 7,3 bilhões por ano, gerando 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos (GUERRA e MEDEIROS, 2006). Com a intensificação da utilização de equinos para as mais diferentes atividades, houve um aumento nas afecções que afetam a espécie, sendo o estudo das claudicações uma das áreas de maior importância, uma vez que os problemas do sistema locomotor estão entre os mais frequentes dentro da espécie.

As lesões musculoesqueléticas em equinos tem uma relação importante no comprometimento e limitação do desempenho atlético, necessitando de um longo período de repouso durante o ano, o que significa uma grande perda econômica por queda de seu desempenho, reabilitação prolongada e eventual reincidência da lesão. Sendo assim, é importante o estudo de opções terapêuticas que venham a abreviar o curso destas enfermidades, culminando com a resolução do processo e com o menor número possível de sequelas associadas a ele.

Novos tratamentos, como o plasma rico em plaquetas (PRP), vem sendo recentemente utilizados com o intuito de reduzir o tempo de cicatrização tendínea e ligamentar, bem como a possibilidade de recidivas. O PRP é uma fonte autógena de plaquetas, sendo que elas possuem a capacidade de secretar uma substância chamada fator de crescimento, que é responsável por alterações celulares, como o recrutamento de células-tronco periféricas e indução de mitose. Quando utilizado, o PRP aumenta e acelera os efeitos dos fatores de crescimento, responsáveis pelo processo de cura. Ele é obtido pela concentração das plaquetas por um gradiente de densidade por meio da centrifugação. Este produto tem sido muito utilizado na medicina humana e veterinária por ser rico em determinados fatores de crescimento que atuam nos processos cicatriciais de diversos tecidos.

A doença articular é uma das enfermidades mais prevalentes e debilitantes que acomete os equinos. Isto acontece devido às articulações estarem repetidamente expostas a fortes impactos durante longos períodos de tempo, levando assim ao início do processo degenerativo da cartilagem articular pela produção e liberação de citocinas com consequente estimulação de componentes inflamatórios. Caso esta inflamação persista, a consequência final é o aparecimento da osteoartrite. A proteína antagonista do receptor de interleucina -1 (IRAP) tem a capacidade de bloquear os mediadores da degeneração, proporcionando a modulação ou o equilíbrio dos processos catabólicos e anabólicos do ambiente intra-articular.

Essa terapia tem sido utilizada principalmente nas fases iniciais dos processos inflamatórios com a principal finalidade de controle do processo, evitando a degeneração progressiva da cartilagem articular.

As células-tronco (CT) possuem diversas aplicabilidades terapêuticas tanto com relação à engenharia de tecidos quanto à terapia gênica. Elas tem a capacidade de gerar diferentes tipos celulares e reconstituir diversos tecidos, apresentando a propriedade de auto-renovação, ou seja, gerar uma cópia idêntica a si mesma (RAIMONDO et al., 2006). Sendo assim, as CT são uma grande promessa para o tratamento das lesões de tecido mole dos membros dos cavalos atletas, elas podem ser isoladas a partir do tecido adiposo ou da medula óssea do próprio animal e são aplicadas na recuperação de diversos tipos de lesões.

O objetivo do presente estudo, realizado a partir de revisão de literatura, é dissertar sobre as novas opções terapêuticas utilizadas no tratamento de afecções dos tecidos moles do aparelho locomotor equino, tratando sobre a sua origem, aplicação, composição, métodos de obtenção, fisiologia do tratamento e eficácia das terapias celulares: plasma rico em plaquetas, proteína antagonista do receptor de interleucina-1 e células tronco.



## 2 PLASMA RICO EM PLAQUETAS

O plasma rico em plaquetas é uma fonte autógena de fácil aquisição e de baixo custo, que contém diversos fatores de crescimento importantes na reparação tecidual, devido à ação mitogênica, quimiotática e neovascular. É derivado de sangue total e deve conter entre três a cinco vezes mais plaquetas que os níveis fisiológicos (MARX et al., 1998), que nos equinos pode variar entre 100.000 a 350.000 plaquetas. $\mu\text{L}^{-1}$  (SCHALM et al., 1975). Na opinião de Anitua et al. (2004) concentrações superiores a 300.000 plaquetas. $\mu\text{L}^{-1}$  são suficientes para o preparo do PRP. Em estudo *in vitro* com fragmentos do TFDS de equinos, Schnabel et al. (2007) demonstraram a eficiência do PRP utilizando concentração média de 395.000 plaquetas. $\mu\text{L}^{-1}$ , mas segundo Barbosa et al. (2006), a concentração de plaquetas do PRP depende da contagem inicial do sangue total, ou seja, quanto maior o número inicial de plaquetas, mais rico será o PRP. Sendo assim, a trombocitopenia é um fator limitante para a concentração adequada das plaquetas.

Segundo Dinato et al. (2001), o PRP atua na modelação e aceleração dos processos cicatriciais, sendo esses efeitos decorrentes dos fatores de crescimento contidos nos grânulos plaquetários. Embora o exato mecanismo de ação sinérgica não esteja completamente elucidado, a aplicação local de fatores de crescimento tem potencial terapêutico importante no tratamento de feridas crônicas (DEBUS et al., 2000).

Bennett e Schultz (1993) relataram que esses fatores aceleram a cicatrização de tecidos saudáveis e promovem a reparação de ferimentos. Segundo Declair (1999), os fatores de crescimento são essenciais na regulação dos eventos celulares envolvidos no processo de cicatrização por propiciarem a quimiotaxia para o local da lesão e influenciarem significativamente na deposição da matriz extracelular.

### 2.1 História e origem da utilização

O conceito de terapias derivadas de plaquetas surgiu entre os anos 70 e 80, à medida que múltiplos fatores de crescimento foram descobertos, inclusive os alfa-grânulos das plaquetas (KAPLAN et al., 1979; ASSOIAN et al., 1983). Em tentativas iniciais para aumentar a cura em estudos com animais experimentais, foram utilizados somente fatores de crescimento, porém obtiveram resultados frustrantes. Quando as plaquetas lisadas foram utilizadas no seu lugar, forneceram o total complemento dos fatores de crescimento com os alfa-grânulos e efeitos anabólicos foram observados em inúmeros modelos de reparação tecidual.

A primeira utilização clínica do PRP foi relatada por Marx et al. (1998). Este estudo utilizou PRP para suplementar enxerto em falhas de osso em grandes (maiores que cinco centímetros) defeitos mandibulares em humanos. O estudo foi controlado, randomizado, cego e prospectivo. Nesse caso, o interesse era a formação de ossos por dentro do defeito e o grupo tratado com PRP demonstrou melhora significativa na densidade do osso, tanto radiograficamente, quanto histologicamente.

Desde então, ainda que o uso de PRP para aumentar a formação de osso continue sendo um tema controverso, ele tem sido amplamente usado em cirurgias orais em humanos. Depois disso, múltiplos relatos indicam que PRP produz melhora significativa na cura de feridas complicadas em humanos (MAZZUCCO et al., 2004). Mais recentemente, o PRP está se popularizando na utilização em medicina esportiva tanto de humanos quanto de equinos, particularmente para o tratamento de danos ligamentares ou tendíneos (WASELAU et al., 2008).

## **2.2 Composição**

### **2.2.1 Plaquetas**

As plaquetas são pequenos fragmentos citoplasmáticos, anucleados, de forma discóide encontrados na corrente sanguínea que se originam a partir dos megacariócitos na medula óssea (HANDIN et al., 1995). Esses fragmentos além de participarem do processo de hemostasia também atuam na cicatrização de feridas e formação de um novo epitélio. A concentração de plaquetas no sangue total dos equinos pode variar entre 100.000 e 350.000 plaquetas. $\mu\text{L}^{-1}$  que permanecem viáveis por aproximadamente dez dias na circulação sanguínea (SCHALM et al., 1975).

### **2.2.2 Ativação plaquetária e fatores de crescimento**

As plaquetas na corrente sanguínea se encontram no estado inativo. Substâncias como: gluconato de cálcio, cloreto de cálcio, trombina bovina e trombina autóloga utilizadas para ativação de plaquetas são chamadas de agonistas. Acredita-se que esses agonistas desencadeiam seus efeitos por meio da interação com receptores localizados na membrana plasmática das plaquetas (BLOCKMANS et al., 1995). Após a ativação as plaquetas mudam sua forma e passam a apresentar projeções membranosas a partir da sua superfície conhecidas

como pseudópodos (HOFFBRAND et al., 2004). Estes por sua vez, são responsáveis pela agregação plaquetária. Após a estimulação por substâncias ativadoras, as plaquetas liberam proteínas chamadas de fatores de crescimento por exocitose dos grânulos alfa (HARRISON & CRAMER, 1993)

Os fatores de crescimento (FC) são peptídeos sinalizadores, derivados dos grânulos plaquetários alfa que produzem quimiotaxia, proliferação e diferenciação celular, neovascularização e deposição de matriz extracelular (EVERTS et al., 2006). A sinalização realizada pelos FC é mediada por receptores de tirosina-quinase localizados na superfície das membranas das células teciduais onde atuam, determinando especificidade de ação frente a cada situação e promovendo proliferação ou inibição (SCHLIEPHAKE, 2002).

Os principais FC liberados pelos grânulos plaquetários alfa são: FC de transformação beta (TGF- $\beta$ ), FC derivado de plaqueta (PDGF), FC semelhante à insulina I (IGF-I), FC fibroblástico (FGF), FC epidermal (EGF), FC vascular endotelial (VEGF), FC do tecido conjuntivo (CTGF) (CARMONA, 2006).

É recomendado que as plaquetas sejam ativadas próximo ao momento da aplicação terapêutica, de forma a assegurar uma concentração adequada de FC no local da lesão (MAIA, 2008). Marx (2001) relata que em dez minutos e na primeira hora, 70% e 100% dos FC já foram liberados, respectivamente. Saldalamacchia (2004) relata que a liberação dos FC inicia aproximadamente dez minutos após a ativação plaquetária, destes 95% já estão pré-sintetizados e em uma hora todos já foram liberados, porém as plaquetas continuam a sintetizar e a secretar proteínas adicionais até a sua morte (cinco a dez dias).

### **2.2.3 Células sanguíneas brancas e vermelhas**

O processo de concentração de plaquetas no plasma não elimina outras células sanguíneas; às vezes, leucócitos também são concentrados em sistemas de preparo automatizados. Algum número de eritrócitos sempre sobra no PRP (TEXTOR, 2011).

### **2.2.4 Proteínas plasmáticas**

Como o nome sugere, as plaquetas são concentradas na fração do plasma do sangue, incluindo todas as proteínas da sua constituição normal (TEXTOR, 2011).

## **2.3 Aplicações do PRP na medicina equina**

Carmona et al. (2007) ao utilizarem três aplicações de PRP intra-articular, com intervalo de duas semanas, no tratamento de osteoartrite em sete equinos adultos observaram uma diminuição significativa no grau de claudicação e redução no volume de líquido sinovial das articulações tratadas dois meses após a última aplicação.

Carmona e López (2011) trataram um cavalo com fratura na tuberosidade supraglenóide da escápula e no tubérculo menor do úmero com concentrado autólogo de plaquetas. Após três aplicações deste componente na articulação escápulo-umeral, os autores observaram recuperação total do membro afetado em dez meses. Este resultado sugere que a aplicação deste componente autólogo pode resultar um benefício terapêutico também no tratamento de fraturas ósseas, pois fraturas como as descritas levam no mínimo 18 a 24 meses para que ocorra a reparação.

Carter et al., (2003) avaliaram a cicatrização de feridas na parte distal de membros em um equino tratando um membro com um gel de PRP e outro com solução salina. A cicatrização no grupo tratado com o gel de PRP foi superior apresentando melhor diferenciação epitelial e organização de colágeno. Já De Rossi et al., (2009) avaliaram a cicatrização de feridas cirúrgicas experimentais no pescoço em seis cavalos de sela tratados com PRP gel. As feridas tratadas com PRP também apresentaram melhor diferenciação epitelial e aceleração na organização de colágeno da derme comparado com o grupo controle. No entanto, é importante considerar que, havendo diferença na diferenciação celular e migração de fibroblastos entre os tecidos do pescoço ou região do tronco e as células da parte distal dos membros, seria importante comparar a cicatrização destes quando tratados com PRP.

Yamada et al., (2011) avaliaram a eficácia do tratamento com células tronco mesenquimais (CTM) e PRP, em lesões condrais experimentalmente induzidas. Nos grupos tratados com PRP e CTM observaram preenchimento completo da lesão condral por uma quantidade satisfatória de tecido cicatricial de aspecto fibroso que se apresentava bem aderido às bordas da lesão. O grupo controle apresentou falhas no preenchimento, tecido cicatricial friável e pouco aderido, erosões da cartilagem articular ao redor da lesão.

Argueles et al., (2005) observaram diminuição na intensidade da claudicação e melhora na imagem ultrassonográfica após aplicação intralesional de PRP em tendinites e desmites em sete cavalos de diferentes sexos, idades e raças. Maia (2008) utilizando PRP no tratamento da tendinite induzida no tendão do músculo flexor digital superficial em seis equinos hípidos observou menor intensidade de edema e dor, além de maior redução da área da lesão e melhor organização tecidual em comparação com o grupo controle.

## **2.4 Métodos de obtenção do PRP**

São descritos três métodos para obtenção do PRP: método automático, semi-automático e manual (CARMONA, 2006).

O método automático é realizado por aferése, necessita de equipamento específico e experiência pessoal. Esta técnica não é usada em pequenas clínicas e necessita de grande volume de sangue (> 450 ml) em comparação com outras técnicas descritas. A maior vantagem desta técnica é o baixo risco de contaminação bacteriana durante a preparação. O PRP obtido pela técnica de aferése tem eficiência em concentração plaquetária e de fatores de crescimento (WEIBRICH et al., 2002). Apesar das vantagens apresentadas esta técnica não é a mais utilizada na medicina equina, sendo limitada pela tecnologia empregada ficando restrita a institutos de transfusão de sangue e ambiente hospitalar na medicina humana (SUTTER et al., 2004).

O método semi-automático é uma técnica que pode ser utilizada em clínicas pequenas. A maior vantagem em relação às outras técnicas descritas é que ela resulta em maior concentração de plaquetas e fatores de crescimento (CARMONA, 2006). O risco de contaminação bacteriana é maior que no sistema automático e menor que no método manual. As desvantagens desta técnica são: a alta concentração de leucócitos no PRP e o maior investimento necessário (WEIBRICH et al., 2003).

O método manual é a técnica mais simples e com menor custo para preparação do PRP sendo, portanto, a técnica usada preferencialmente nas clínicas de equinos. Ela exige uma rigorosa assepsia para evitar a contaminação bacteriana. A desvantagem desta técnica em relação as outras técnicas descritas é a menor concentração de plaquetas e fatores de crescimento. As vantagens são: a possibilidade de ser realizada em ambiente laboratorial e a baixa concentração de leucócitos no PRP quando comparada com os métodos automático e semi-automático (WEIBRICH et al., 2003).

## **2.5 Protocolos de obtenção do PRP**

O preparo do PRP pelo método manual exige a determinação do melhor protocolo a ser utilizado, baseado na velocidade e tempo de centrifugação, o anticoagulante e sistema de coleta de sangue, a quantidade de sangue a ser utilizado, treinamento pessoal, bem como, o método de contagem das plaquetas (JAMESON, 2007). Protocolos que incluem somente uma

centrifugação não produzem PRP, mas sim uma mistura de plasma pobre em plaquetas (PPP) e PRP o que resulta em baixa concentração total de plaquetas (MARX, 2001).

Diversos protocolos para obtenção de PRP tem sido propostos com o objetivo de concentrar um maior número de plaquetas viáveis em um volume mínimo de plasma. A possibilidade de se obter PRP com custos menores, utilizando uma centrífuga convencional, fez surgir protocolos que, embora sejam mais trabalhosos e necessitem de aprendizagem por parte de quem irá realizar o procedimento, permitem a preparação do PRP com menor custo e em ambientes mais simples (VENDRAMIN et al., 2006).

Carmona (2006) propõe um protocolo para a espécie equina que consiste em centrifugação dupla, sendo a primeira a 300 g durante 10 minutos e a segunda 5000 g durante 5 minutos, utilizando 25 ml de sangue. Maia (2008) também relatou um protocolo utilizando 81 ml de sangue equino e centrifugação dupla, onde a primeira é realizada a 120 g e a segunda a 473 g, ambas durante 5 minutos.

## **2.6 Administração de PRP**

Na maioria das vezes, a administração de PRP é efetuada por uma injeção percutânea intra-lesional, utilizando uma técnica estéril e usualmente sendo guiado por ultrassom. Muitos profissionais utilizam PRP inativado, sem a prévia ativação. (TEXTOR, 2011). Embora a distribuição dos fatores de crescimento seja significativamente menor utilizando o PRP inativado do que o ativado, Bosch et al., (2010) demonstraram efeitos positivos na utilização do mesmo.

Deve notar-se que no estudo de Bosch, as concentrações relatadas de fatores de crescimento foram medidas depois que a amostra de PRP foi congelada e descongelada (G. Bosch, comunicação pessoal, 2010) e que, portanto, não representa concentrações de fator de crescimento disponíveis no local da lesão (isto é, o PRP utilizado para o tratamento não foi congelado). Isso representa uma recomendação útil para a ativação de PRP, sendo o congelamento e descongelamento de plaquetas um método eficaz, seguro e bem conhecido de indução da liberação de fatores de crescimento (TABLIN et al., 2008).

Apesar de o processo de congelamento introduzir outro passo e atrasar o processo de preparação, ele pode ser acelerado pelo uso de nitrogênio líquido e um rápido descongelamento em um banho em água. Utilizando esse protocolo, as plaquetas são parcialmente ativadas e lisadas, provocando um escoamento passivo de fatores de crescimento a partir das células e a formulação do PRP permanece no líquido. Alíquotas congeladas

também podem ser armazenadas para futura utilização. A quantidade de PDGF (fator de crescimento derivado das plaquetas) liberada depois do congelamento tem se mostrado equivalente ao liberado após tratamento com uma baixa dose (1 u/mL) de trombina bovina. (TABLIN et al., 2008).

Trombina xenogénica foi utilizada com segurança em cavalos. Em estudo realizado por Waselau et al., (2008), foi utilizado aproximadamente 2 unidades de trombina bovina por milímetro de PRP e um estudo sobre feridas, Monteiro et al., (2009) relatou a utilização de 20 unidades de trombina por milímetro de PRP. Quando utilizada, a trombina é adicionada durante o processo de administração por uma seringa dupla ou, dependendo da concentração, pode ser diretamente misturada ao PRP e injetada imediatamente ou também pode ser empregada como um coágulo de fibrina rico em plaquetas (TEXTOR, 2011).

Até recentemente, todo o uso de PRP humano ativado empregou 10% CaCl<sub>2</sub> e trombina bovina purificada em uma concentração supra-fisiológica com pouquíssimos efeitos adversos relatados (MARX, 2004). Apesar de CaCl<sub>2</sub> ser frequentemente utilizado em combinação com a trombina, não é necessário. Plaquetas contém cálcio intracelular suficiente para proceder com a cascata de ativação, mesmo que em uma amostra em anticoagulante (HU et al., 2005). No entanto, a trombina não é uma proteína benigna. Embora ela continue causando liberação de fatores de crescimento dose dependente ainda bem acima dos níveis fisiológicos, efeitos adversos nas células e tecidos tem sido observados em associação com altas concentrações de trombina (MURRAY et al., 2006).

Até que novos estudos sejam concluídos, as recomendações para métodos de utilização de trombina não podem ser indicadas para equinos. CaCl<sub>2</sub> pode ser utilizado isoladamente como um ativador de PRP, embora seja mais lenta e menos potente que a trombina. As vantagens conceituais da ativação plaquetária durante a administração de PRP, em vez da simples lise de plaquetas, tal como a induzida por congelamento, são (1) uma maior liberação de fatores de crescimento é induzida pela ativação e (2) o coágulo restante serve como uma matriz provisória no interior leito da ferida, a qual deve melhorar a reparação dos tecidos (TEXTOR, 2011).

## **2.7 Segurança**

Como um produto biológico autólogo, o PRP é considerado um agente terapêutico extremamente seguro. No entanto, as plaquetas também são células inflamatórias, e os leucócitos estão presentes no PRP. Após a injeção, a dor aguda foi, por vezes, relatada em

seres humanos e equinos. É recomendada a observação do paciente por pelo menos 15 minutos após a administração, se for observada dor ou inchaço no local da aplicação, é recomendada a aplicação de gelo no membro (TEXTOR, 2011). Embora o uso de anti-inflamatório não-esteroidal seja evitado na medicina humana devido à inibição significativa das plaquetas, resultando na diminuição da eficácia do tratamento, essa preocupação é infundada se as plaquetas forem aplicadas no estado ativado. Plaquetas equinas demonstraram pouca inibição em resposta a fenilbutazona e a naproxen (JOHNSTONE, 1983). Portanto, a utilização dessas substâncias para benefício anti-inflamatório, não deve fornecer nenhuma interferência no tratamento com PRP.



### **3 PROTEÍNA ANTAGONISTA DO RECEPTOR DE INTERLEUCINA-1**

#### **3.1 História e origem da utilização**

Em 1986, a identificação de uma IRAP endógena foi relatada por Balavoine et al., que por acaso haviam descoberto a substância na urina de três pacientes leucêmicos febris. As propriedades da anti-interleucina-1 foram demonstradas pela capacidade de diminuir a produção de colagenase e prostaglandina (PGE<sub>2</sub>), induzida por IL-1 em cultura de fibroblatos, e determinou-se que a fonte celular desse antagonista eram monócitos ou macrófagos. Posteriormente pesquisadores determinaram que sua produção poderia ser induzida por cultura normal de monócitos em superfícies que os ativariam. Isso ocorreu simultaneamente com a produção da IL-1 propriamente dita, sugerindo uma função regulatória para este peptídeo na fisiologia normal (TEXTOR, 2011).

Hannum et al. (1990) relataram que o mecanismo específico do antagonismo de IL-1 estava no próprio receptor da IL-1, e que o peptídeo inibitório era um puro e específico antagonista sem atividade agonista. Embora também existam outros antagonistas endógenos funcionais de IL-1 (AREND et al., 1990), foi o antagonista do receptor específico de 17 kDa que ficou conhecido como “IL-1ra” ou “IRAP”. Visto que a IL-1 foi considerada a “mestre das citocinas” em muitas doenças, inclusive em artropatias inflamatórias, o potencial terapêutico dessa substância induziu um enorme anseio na medicina e em 1997, o gene equino da IRAP foi clonado na Universidade de Tóquio (KATO et al., 1997). Desde então, vários estudos experimentais estão sendo feitos sobre a utilização de IRAP em equinos pela administração intra-articular do gene (NIXON et al., 2005; FRISBIE et al., 2002; FRISBIE et al., 2007; MORISSET et al., 2007).

#### **3.2 Nomenclatura**

Apesar de comumente referido como IRAP na espécie equina, o produto é mais corretamente chamado de ACS (soro autólogo condicionado). Em 2003, o fundador de uma empresa alemã (Orthokine), relatou a variação do produto de IRAP por métodos físico-químicos. Eles desenvolveram um sistema de seringa contendo esferas de vidro, na qual praticantes poderiam efetuar uma cultura sanguínea de 24 horas e então coletar como um soro autólogo condicionado de IRAP. ACS atualmente é uma composição acelular de muitas substâncias derivadas do sangue, não uma proteína purificada como o termo IRAP sugere.

Nesse respeito, maiores atenções tem sido dadas as outras citocinas constituintes do ACS, assim como as citocinas pró-inflamatórias IL-1 propriamente ditas, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 e fatores de crescimento (TEXTOR, 2011)

### 3.3 Interleucina-1

A citocina interleucina-1 afeta basicamente todos os tecidos e sistemas orgânicos; ela é o protótipo da citocina pró-inflamatória, visto que induz a expressão de uma variedade de genes e a síntese de uma série de proteínas capazes de induzir alterações inflamatórias crônicas e agudas. Ela ainda age sobre diversas células alvo para induzir ou amplificar uma variedade de mecanismos de defesa, particularmente respostas hematológicas e imunológicas (DINARELLO, 1991).

A IL-1 possui duas propriedades fundamentais: a primeira é o fato de ser um mediador de doenças e a segunda o fato de ser um mediador das defesas orgânicas. Contudo, em qualquer uma dessas situações, a sua produção excessiva ou prolongada leva a debilitação das funções do organismo (DINARELLO, 1991).

A interleucina-1 foi originalmente descrita na década de quarenta como uma proteína termo-lábil encontrada no exsudato granulocítico e que, quando injetada em humanos ou animais, produzia febre. Atualmente é conhecido seu amplo espectro de atividades tais como a estimulação de linfócitos *in vitro*, a estimulação de condrócitos e sinoviócitos para produzir prostaglandina E2 e metaloproteinases neutras (MAY et al., 1990); inibição da síntese de colágeno tipo II, que é característico da cartilagem hialina e aumento da síntese de colágeno tipo I, que é característico das células fibroblásticas; redução da síntese de agrecan; produção de espécies reativas do oxigênio (LAURINDO et al., 2007) e diminuição da síntese de proteoglicanos (RICHARDSON e DODGE, 2000).

Muitas células nucleadas são capazes de sintetizar IL-1, tais como os monócitos, linfócitos T, neutrófilos sanguíneos, micróglia do sistema nervoso, astrócitos, células endoteliais, células da musculatura lisa, fibroblastos, células do revestimento sinovial, células dendríticas da derme, células do epitélio intestinal, gengival e cervical, células dos gânglios linfáticos, células maternas placentárias e condrócitos (DINARELLO, 1991).

As células sinoviais das articulações acometidas por osteoartrite sintetizam várias citocinas pró-inflamatórias, sendo a mais abundante a interleucina-1 (PELLETIER et al., 1997) e níveis elevados de IL-1 foram encontrados em líquido sinovial de articulações

acometidas por uma série de lesões, tais como a osteoartrite equina (MCILWRAITH e TROTTER 1996).

Os estímulos mais comuns para a transcrição de IL-1 são a endotoxina, outros produtos bacterianos como as exotoxinas de bactérias Gram positivas, vírus, outras citocinas, componentes do complemento, trombina, sais biliares e metabólitos de andrôgenos (DINARELLO, 1991).

McIlwraith e Trotter (1996) demonstraram que interleucina-1 é capaz de fomentar processos metabólicos degradativos na cartilagem e em condrócitos mantidos *in vitro*, também é capaz de induzir a produção de colagenase, radicais peróxido e interleucina-6. Todos esses fatores estão intimamente ligados à degradação da matriz extracelular da cartilagem articular.

### **3.4 Antagonista do receptor de interleucina-1 (IL-1ra)**

A existência de um antagonista natural do receptor da IL-1 sugere que o organismo construa a sua própria resposta em relação à inflamação e que a síntese do IL-1ra é uma parte natural de resolução de processos mórbidos (BROSSI, 2007).

O antagonista do receptor bloqueia virtualmente todas as respostas biológicas antecipadas com a adição de interleucina-1 a uma cultura de células; também bloqueia a capacidade da IL-1 de ativar uma proteína-quinase nos fibroblastos, que é um evento bastante precoce após a ligação do IL-1 ao seu receptor. Ele bloqueia a atividade dessa citocina tanto *in vitro* quanto *in vivo* e, por consequência, a síntese de PGE2 pela sinóvia induzida pela IL-1, além da síntese de colagenase pelos condrócitos (DINARELLO, 1991).

O IL-1ra compete especificamente com a interleucina-1 pela ocupação dos receptores de superfície, mas é incapaz de desencadear respostas típicas da IL-1 (BRESNIHAN et al., 1997).

#### **3.4.1 Aplicações terapêuticas de IL-1ra**

Especialmente na década de noventa, pesquisadores estudaram formas de dar aplicabilidade terapêutica à descrição do antagonista natural do receptor de interleucina-1. A administração de IL-1ra em artrite experimental mostrou capacidade de inibir a produção de PGE2 pelos condrócitos e células sinoviais e a produção de colagenase pelas células ativadas pela IL-1 (AREND et al., 1990). A administração intravenosa de IL-1ra mostrou efeitos

protetores nos tecidos articulares depois da administração intra-articular de IL-1 (HENDERSON et al., 1991).

### **3.5 Indicações musculoesqueléticas para a utilização de IRAP**

Em equinos, a IRAP tem sido frequentemente utilizado para o tratamento intra-articular de osteoartrite. Também é utilizada por alguns cirurgiões profilaticamente pelo seu efeito anti-inflamatório e condroprotetor imediato a artroscopia (TEXTOR, 2011). Experimentalmente, existe suporte para esta prática, em que na maioria dos estudos *in vivo*, o emprego de IRAP em modelos de osteoartrite inicial, como fratura de fragmento (FRISBIE et al., 2007) ou transecção do ligamento cruzado (CARON et al., 1996) demonstraram respostas positivas a terapia com IRAP.

Na medicina humana, IRAP é utilizado no tratamento intra-articular de artrite reumática (CHEVALIER, 2009), dor lombar de origem neurológica (por injeção perineural) e para lesões musculares (pela injeção direta intra-lesional) (WEHLING et al., 2007).

### **3.6 Estudos em equinos**

Cirurgiões-pesquisadores de equinos tem contribuído significativamente no estudo da IRAP e da sua distribuição genética em particular (NIXON et al., 2005; FRISBIE et al., 2002; MORISSET et al., 2007; BALTZER et al., 2009). De fato, a utilização de IRAP pela terapia genética atualmente é procedida pelo uso de ACS em cavalos. A transdução dos fibroblastos sinoviais por um vetor adenovírus que carregava o gene da IRAP foi a primeira efetuada *in vitro*, com consequente produção de produtos de IRAP pela transdução das células em cultura. Posteriormente, o vetor de IRAP foi introduzido em carpos normais de cavalos experimentais para determinar a dose viral correta e novas concentrações de IRAP produzidas foram detectadas no líquido sinovial por 28 dias. Finalmente, o vetor de IRAP foi liberado para cavalos com osteoartrite inicial, 14 dias após a injúria inicial. Efeitos adversos significativos não foram encontrados, porém surpreendentemente, a contagem de leucócitos foi maior em articulações tratados com o vetor viral. Melhoras na claudicação, na efusão sinovial, tamanho da lesão e preservação da cartilagem proteoglicana foram relatadas no grupo tratado (TEXTOR, 2011).

No estudo de ACS, o modelo de fragmento foi novamente empregado e injeções articulares de ACS foram realizadas semanalmente durante quatro semanas, começando dois dias após a cirurgia e comparada ao controle de injeções de solução salina. Como é típico para

esse modelo, os cavalos também foram exercitados cinco dias por semana durante o estudo; um teste mais crítico comparado a uma prática clínica comum de reduzir as atividades depois da aplicação de ACS. A claudicação melhorou significativamente no grupo tratado com ACS nos setenta dias depois da injúria (grau de claudicação um de cinco comparado a dois de cinco no grupo tratado com solução salina). Além disso, IRAP continuou sendo detectada no líquido sinovial depois de trinta e cinco dias do último tratamento com ACS. Apesar da melhora clínica, não foi observada melhora histológica ou diminuição da lesão e pesquisadores concluíram que o tratamento com a terapia gênica de IRAP produziu um melhor efeito comparado o obtido no tratamento com ACS (FRISBIE et al., 2007).

Outro estudo sobre terapia genética foi reportado por Morisset et al. (2007) em que defeitos grandes e completos foram criados no joelho e no carpo. Os cavalos foram tratados com um vetor adenoviral carreando IRAP e IGF-1 no momento da cirurgia. Nesse estudo, não foram encontradas diferenças significativas entre os animais tratados e os controles. Níveis de IRAP foram encontrados no líquido sinovial três semanas após a transferência do vetor.

### **3.7 Preparo e administração**

IRAP é produzido por uma coleta asséptica de aproximadamente 50 mL de sangue total em seringa ou recipiente próprio, o qual é preenchido com aproximadamente 200 esferas feitas de vidro de borossilicato. As esferas tem uma área de superfície áspera de  $22\text{mm}^2$  e tem 2.5 mm de diâmetro. Acredita-se que a interação dos monócitos com a superfície das bolhas leve a produção de IRAP (MEIJER, 2003). Depois de um período de incubação de vinte e quatro horas a  $37^\circ\text{C}$ , o conteúdo é centrifugado a 2500 a 3100 g por 10 minutos e o resultado é aspirado. Alíquotas filtradas de 2 mL são usualmente preparadas e as que não forem utilizadas imediatamente são congeladas a  $-20^\circ\text{C}$  para utilização futura. Para prevenir a degradação proteolítica dos peptídeos terapêuticos, ele deve ser refrigerado até o uso (TEXTOR, 2011).

A administração de IRAP é realizada utilizando uma técnica estéril e normalmente emprega uma injeção de 2 mL uma vez por semana durante 4 semanas (TEXTOR, 2011).

## 4 CÉLULAS TRONCO

A célula tronco é uma célula que tem a capacidade de auto-renovação e se diferencia em um ou vários tipos celulares (RAIMONDO et al., 2006). Elas são classificadas, de acordo com o seu potencial de se desenvolver, em totipotentes, capazes de se diferenciar em todos os tipos celulares existentes nos vários tecidos do indivíduo completamente formado ou desenvolvido; pluripotentes, capazes de se diferenciar em quase todos os tipos de tecidos embrionários, exceto placenta e anexos embrionários; multipotentes, que originam um menor número de linhagens celulares; oligopotentes, que originam um número ainda menor de células quando comparadas às multipotentes; e unipotentes, que se diferenciam em um único tipo celular (WAGERS e WEISSMAN, 2004).

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

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

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

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

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

As células tronco mesenquimais (CTM) se localizam na medula óssea e em outros tecidos como o adiposo. Na presença de um estímulo apropriado, elas se diferenciam *in vitro* e *in vivo* em adipócitos, condrócitos, osteoblastos, tenócitos, fibroblastos e miofibroblastos (SMITH e WEBBON, 2005).

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

Outros tecidos que também apresentam CTA são o sangue periférico, fígado, trato gastrintestinal, sistema nervoso periférico, pâncreas, vasos sanguíneos, coração, e dente (FUCHS e SEGRE, 2000).

#### **4.1 História e origem da utilização**

A terminologia “célula-tronco” é uma tradução do inglês “*stem cell*”. *Stem* significa caule, haste. O verbo “*to stem*” quer dizer originar. Assim, células-tronco têm essa denominação por ser um tronco comum do qual se originam outras células (IGLÉZIAS, 2004). Essa versatilidade as tornam a grande promessa para o tratamento de doenças graves como problemas cardíacos, câncer, disfunções neurológicas, distúrbios hepáticos e renais, osteoporose entre outras (MAYHALL et al., 2004). Na medicina equina elas são uma grande promessa para o tratamento das lesões de tecido mole dos membros dos cavalos atletas.

O primeiro relato de caso de pesquisa com células tronco utilizando células embrionárias foi publicado em 1998, pela equipe do Prof. James A. Thomson, da Universidade de Wisconsin/EUA. Neste mesmo ano, a equipe do Prof. Jhon D. Gearhart, da Universidade Johns Hopkins, realizou pesquisas com células tronco fetais humanas. Vários segmentos da população tem assumido uma posição contrária a este tipo de pesquisa (GOLDIM, 2006).

No Brasil, a lei de Biossegurança inclui a questão da pesquisa com células tronco, sendo permitido utilizar embriões produzidos para fins reprodutivos e que já estavam congelados anteriormente (GOLDIM, 2006).

## 4.2 Células tronco da medula óssea e do tecido adiposo

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

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

No tecido adiposo, além de maior facilidade de coleta comparado a medula óssea, pode-se encontrar cerca de 2% de CTM do total celular lipoaspirado (KINGHAM et al., 2007), otimizando a colheita e a expansão celular, enquanto a medula óssea possui aproximadamente 0,001 a 0,01% de CTM do total de células (MIAO et al., 2006). Isso é interessante na terapia celular aplicada à espécie equina, principalmente porque lesões em tecidos como ossos e tendões requerer grandes quantidades celulares para alcançar a eficácia terapêutica (VIDAL et al., 2007).

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

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

As CT podem ser enzimaticamente digeridas do TA e separadas do sobrenadante de adipócitos por centrifugação. Uma população mais homogênea emerge em cultivo, nas mesmas condições de crescimento das CTM. Essa população chamada de células-tronco derivadas de tecido adiposo tem muitas características semelhantes à MO como potencial proliferativo extenso e capacidade de diferenciação (STREM et al., 2005).

*In vitro*, as células-tronco derivadas de tecido adiposo se diferenciam em linhagens osteogênicas, adipogênicas, miogênicas e condrogênicas quando tratadas com fatores



específicos (ZUK et al., 2002). Culturas desse tipo celular geram nódulos que produzem grande quantidade de moléculas de matriz extracelular como proteoglicanos sulfatados, colágeno tipo II e IV (STREM et al., 2005).

### **4.3 Células-tronco e sua aplicabilidade no tratamento de lesões tendíneas e ligamentares nos membros dos equinos**

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

Como benefício, a injeção de CTM na região danificada gera sua diferenciação em fibroblastos maduros do tendão ou ligamento, sinalizando a influência do tecido na produção de matriz apropriada ao reparo. Além disso, a MO contém alta concentração de fatores de crescimento acelerando a cicatrização (DAHLGREN, 2005).

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

Com o animal em estação, sob sedação, as CTM da MO tem sido implantadas no local da lesão tendínea, guiadas pelo ultra-som. O momento ideal para implantação dessas células é um a dois meses após a lesão. Assim, espera-se passar a fase de debridamento e o início da formação de um leito de tecido de granulação, que será um suporte para as células implantadas. Após o implante, os animais entram em um regime controlado de exercícios com avaliações ultrassonográficas a cada dois ou três meses, e podem retornar ao treinamento após 48 semanas (SMITH e WEBBON, 2005).

Barreira (2005) induziu lesão do tendão flexor digital superficial com colagenase e, de forma diferente de Smith e Webbon (2005), após quatorze dias, fez a aplicação das CTM. Essa aplicação, guiada pelo ultra-som, foi realizada com o animal em estação, sob sedação e bloqueio regional dos nervos palmares medial e lateral. Após quinze dias, foi iniciado exercício leve (andar a passo por cinco minutos, uma vez ao dia) que foi aumentando em cinco minutos a cada doze dias até o dia 48. Aos 48 dias pós terapia celular, houve uma melhora da lesão tendínea, confirmada por meio de avaliação ultrasonográfica, histopatológica e imunoistoquímica.

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

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

O baixo número de CTM obtidas no aspirado da MO pode não ser adequado em promover os efeitos benéficos dessa terapia. Grandes volumes (20 a 30 mL seriam necessários e esses produziram lesões mecânicas na matriz extra celular. Além disso, um alto nível de TGF- $\beta$ 1 (fator de crescimento) no fluido aspirado pode resultar em excesso de formação de tecido cicatricial, o que não seria benéfico na cicatrização de tendões flexores e ligamentos, pois esses teriam sua elasticidade diminuída (DAHLGREN, 2005).

#### **4.4 Colheita de células-tronco adultas nos equinos**

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

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

Os locais possíveis para a punção de MO em animais adultos são os ossos do esterno, costela e crânio, e os ossos longos como úmero, fêmur e tíbia, pois nestes locais há uma constante função hematopoiética. O esterno é um local frequentemente utilizado para se obter amostras de MO em equinos, pois a atividade hematopoiética persiste na esternébra ao longo da vida, os ossos não são cobertos por uma grande massa muscular, e a cavidade medular é coberta por uma fina camada de osso, facilitando o acesso a essa região. As desvantagens da punção neste local são a posição desconfortável e perigosa em que o coletor é forçado a assumir na obtenção das amostras e a relativa proximidade dos órgãos vitais, incluindo o coração (BARREIRA, 2005). Pode-se também aspirar MO da tuberosidade coxal com o

animal em estação ou decúbito. Uma agulha seria introduzida na protuberância e direcionada caudoventralmente e, a seguir, aspira-se a medula (SUTTER, 2007).

Outra metodologia é a coleta no esterno é realizada com o animal em estação sob o efeito de sedação e bloqueio anestésico do sub-cutâneo, músculo e região próxima ao perióstio. Faz-se então, uma pequena incisão de pele e subcutâneo com lâmina de bisturi 11, permitindo a introdução da agulha na musculatura por 4 a 6 cm de profundidade até chegar na superfície da esternébra. Após sentir a extremidade óssea na superfície da agulha, faz-se uma pressão sobre a mesma permitindo sua penetração por mais 4 a 5 cm até que a agulha fique firme. Faz-se então uma aspiração nas células da MO com o auxílio de uma seringa de 20 mL, sem anti-coagulante. Para conferir se o material é realmente da MO realiza-se um esfregaço (BARREIRA, 2005).

Após a coleta da MO do equino, o material é encaminhado ao laboratório onde as CTM são recuperadas e expandidas, *in vitro*, até um número de  $4 \times 10^6$  células. Essas são então ressuspendidas em um sobrenadante oriundo da MO e aplicadas no animal. Uma desvantagem desse método é que o material fica no laboratório por três a quatro semanas e, durante esse período pode se desenvolver um tecido cicatricial na lesão do animal (DAHLGREN, 2005).

O TA pode ser colhido da região proximal abaxial da cauda de forma simples, com o animal em estação e enviado ao laboratório para isolamento de células nucleadas, uma porção das quais são CTM (DAHLGREN, 2005). Geralmente, essa região possui uma grande quantidade de TA, mesmo em animais com escore corporal 2 (SPEIRS, 1999). Em um período de quarenta e oito horas essas células são encaminhadas ao veterinário e podem ser aplicadas nos tendões ou ligamentos lesados. O volume empregado varia de acordo com o tamanho da lesão (DAHLGREN, 2005).

#### **4.4.1. Complicações da punção de medula óssea nos equinos**

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

#### **4.5 Protocolo de aplicação de células-tronco em tendão e ligamentos**

A aplicação das células-tronco obtidas deve ser feita somente após a delimitação da lesão por exame ultrassonográfico. Para as aplicações percutâneas, deve ser feita uma sedação no animal utilizando detomidina e butorfanol, e um bloqueio anestésico local somente deve ser realizado se o animal apresentar sensibilidade local à aplicação, mesmo após a sedação. O transdutor do aparelho de ultrassom deve ser envolvido por uma embalagem estéril e deve ser utilizado um gel estéril. As agulhas devem então ser introduzidas em um ângulo agudo em relação à pele e deve então ser guiada pelas imagens ultrassonográficas. O material deve ser aplicado em vários pontos, com um centímetro proximal e distal à lesão. O procedimento deve ser guiado por ultrassom diagnóstico a fim de verificar o ponto exato da aplicação (RICHARD; MITCHELL, 2005). Segundo Herthel (2001), a primeira publicação de injeção percutânea de células-tronco provenientes de medula óssea foi publicada em 1987 por Pierce of Amgen, Inc.

O animal é mantido com bandagem estéril no membro por duas a quatro horas depois do tratamento e aplica-se gelo por trinta minutos ao redor do local afetado. Esse procedimento deve ser realizado duas vezes ao dia, durante três dias. Os animais devem receber 500mg de flunixin meglumine, duas vezes ao dia, via oral, por cinco dias após o tratamento, e devem caminhar puxados, duas vezes ao dia, por dez a quinze minutos, a partir do dia seguinte ao tratamento. Realiza-se exame ultrassonográfico com cinco dias para verificar a resposta ao tratamento e após trinta dias, começa a caminhar montado, realizando-se um novo exame ultrassonográfico (RICHARD; MITCHELL, 2005).

Caso o animal se mantenha sem dor, aumenta-se cinco a dez minutos de exercício, a cada semana, até retornar ao exercício normal. O animal é monitorado com exame ultrassonográfico a cada trinta dias, até que se completem 120 dias após o tratamento ou até que se verifique completa recuperação do animal (RICHARD; MITCHELL, 2005).

## 5 CONCLUSÕES

Com a realização desta revisão bibliográfica pode-se concluir que mesmo com o avanço da ciência, o trabalho com equinos exige dedicação, sensibilidade e amplo conhecimento por parte do profissional. A crescente participação de equinos nas mais variadas modalidades atléticas vem acompanhada de aumento nas incidências inflamatórias em seu esqueleto apendicular. Proporcionalmente crescente é a procura por terapias que venham a antecipar a resolução do processo com a menor quantidade de sequelas associadas a ele.

O plasma rico em plaquetas é um preparado do sangue total que deve apresentar entre três a cinco vezes mais plaquetas que os níveis fisiológicos. As plaquetas armazenam grande quantidade de fatores de crescimento, que são peptídeos sinalizadores os quais regulam o metabolismo celular, resultando na proliferação e diferenciação celular, como também no aumento da produção da matriz extracelular. Do mesmo modo, por ser um produto autólogo, com método de coleta não invasivo e de rápida preparação, o PRP é uma terapia indicada para o tratamento de lesões musculoesqueléticas em equinos.

No que diz respeito à terapêutica com IRAP, atualmente, acredita-se que os processos patológicos subjacentes a artropatias representem falha na manutenção do mecanismo homeostático normal da cartilagem articular; em última instância, esta homeostase poderia ser definida como um balanço entre processos anabólicos e catabólicos da cartilagem em face ao estresse a ela imposto. Nesse sentido, as citocinas são as responsáveis pelo orquestramento dos eventos moleculares envolvidos nos processos anabólicos e catabólicos da matriz extracelular da cartilagem articular. A identificação das principais citocinas inflamatórias abriu um novo leque de opções para o tratamento das enfermidades inflamatórias articulares. Além do potencial farmacológico, o estudo da natureza deste controle regulatório peptídico nos tecidos normais levou a importantes conclusões a respeito da etiopatogenia da osteoartrite em equinos.

Recentemente, tratamentos baseados no potencial de células tronco e fatores de crescimento em melhorar o reparo tecidual tem atraído a atenção de veterinários atuantes na clínica de equinos atletas e pesquisadores no tratamento de tendinites e desmites. As células-tronco mesenquimais são células-tronco não hematopoiéticas e possuem propriedades multipotentes de diferenciação, podendo originar no organismo células de linhagem mesenquimal e não mesenquimal. Estas células podem, portanto, dar origem a linhagens de células ósseas, cartilaginosas, adiposas, musculares, hepáticas, endoteliais, epiteliais e

neurogênicas e por isso tem sido consideradas uma fonte atrativa de regeneração tecidual. Devido aos excelentes resultados obtidos em pesquisas com células-tronco e suas aplicabilidades promissoras, a terapia com estas células encontra-se em momento de máxima ascensão, estimulando assim, inúmeras pesquisas.

Atualmente, a utilização de terapias celulares é uma realidade na clínica de equinos e tende a crescer muito nos próximos anos. Para isso, maiores pesquisas devem ser realizadas para que se possa chegar a um tratamento regenerativo adequado, com o objetivo de recuperar as estruturas e funções originais do tecido lesado.

## REFERÊNCIAS

ANITUA, E.; ANDIA, I.; ARDANZA, B.; NURDEN, P.; NURDEN, A.T. Autologous platelet source of proteins for healing and tissue regeneration. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 91, n. 1, p. 4-15, 2004.

AREND, W.P.; WELGUS, H.G.; THOMPSON, R.C. et al. Biological properties of recombinant human monocyte-derived interleukin 1 receptor antagonist. **J Clin Invest**, v. 85, n. 5, p. 1694-1697, 1990.

ARGUELLES, D. et al. Clinical experiences with platelet-rich plasma as a treatment of tendon and ligament injuries in the horse. In: **Annual Scientific Meeting**, 16th, 2005, Ireland.

ASSOIAN, R.K; KOMORIYA, A.; MEYERS, C.A. et al. Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. **J Biol Chem**, v. 258, n. 11, p. 7155-7160, 1983.

BALAVOINE, J.F.; DE ROCHEMONTEIX, B.; WILLIAMSON, K. et al. Prostaglandin E2 and collagenase production by fibroblasts and synovial cells is regulated by urine-derived human interleukin 1 and inhibitor(s). **J Clin Invest**, v. 78, n. 4, p. 1120-1124, 1986.

BALTZER, A.W.; MOSER, C.; JANSEN, S.A. et al. Autologous conditioned serum (Orthokine) is an effective treatment for knee osteoarthritis. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 17, n. 2, p. 152-160, 2009.

BARBOSA, A.L.T.; DEL CARLO, R.J.; GOMES, B.N.; MONTEIRO, B.S. Plasma rico em plaquetas: uma fonte de múltiplos fatores de crescimento para enxertos ósseos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, supl. 1, p. 1-145, 2006.

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

BENNETT, N.T.; SCHULTZ, G.S. Growth factors and wound healing. Part II. **The American Journal of Surgery**, v. 166, n. 1, p. 74-81, 1993.

BIANCO, P.; RIMINUCCI, M.; GRONTHOS, S.; et al. Bonemarrow stromal stem cells: nature, biology, and potencial applications. **Stem Cells**, v. 19, p. 180-192, 2001.  
Disponível em: <http://www.stemcells.com>. Acesso em: 20 nov. 2012.

BLOCKMANS, D. et al. Platelet activation. **Blood Reviews**, Cambridge, v. 9, n. 3, p. 143-156, 1995.

BOSCH, G.; VAN SCHIE, H.T.; DE GROOT, M.W. et al. Effects of platelet-rich plasma on the quality of repair of mechanically induced core lesions in equine superficial digital flexor tendons: a placebo-controlled experimental study. **J Orthop Res.**, v. 28, n. 2, p.

211-217, 2010.

CARMONA, J.U. et al. Autologous platelet concentrates as a treatment of horses with osteoarthritis: a preliminary pilot clinical study. **Journal of Equine Veterinary Science**, Fort Collins, v. 27, n. 4, p. 167-170, 2007.

CARMONA, J.U. **Use of autologous platelet concentrates for the treatment of musculoskeletal injuries in the horse**. 2006. 91f. Tese de Doutorado em Medicina Veterinária. Universidade Autônoma de Barcelona, Barcelona, 2006.

CARMONA, J.U.; LÓPEZ, C. Autologous platelet concentrates as a treatment for shoulder injury in a horse. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 31, n. 9, p. 1-5, 2011.

CARTER, C.A. et al. Platelet rich plasma gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 74, p. 244-255, 2003.

CHEVALIER, X.; GOUPILLE, P.; BEAULIEU, A.D. et al. Intraarticular injection of anakinra in osteoarthritis of the knee: a multicenter, randomized, double-blind, placebocontrolled study. **Arthritis Rheum**, v. 61, n. 3, p. 344-352, 2009.

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

DAHLGREN, L.A. Review of treatment options for equine tendon and ligament injuries: what's new and how do they work. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 51, 2005, **Seattle. Proceedings...** Lexington KY: American Association of Equine Practitioners, 2005. Disponível em: [www.ivis.org](http://www.ivis.org). Acesso em: 21 dez. 2012.

DE ROSSI, R. et al. Effects of platelet-rich plasma gel on skin healing in surgical wound in horses. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 24, n. 4, p. 276-281, 2009.

DEBUS, E.S.; SCHMIDT, K.; ZIEGLER, U.E.; THIEDE, A. The role of growth factors in wound healing. **Zentralblatt für Chirurgie**, v. 125, n. 1, p. 49-55, 2000.

DECLAIR, V. The importance of growth factors in wound healing. **Ostomy Wound Manage**, v. 45, n. 4, p. 64-68, 1999.

DINARELLO, C.A. Interleukin-1 and Interleukin-1 antagonist. **Blood**, v. 77, n. 8, p. 1627-1652, 1991.

DINATO, C.J.; BARRETO, M.A.; MENDONÇA, R.G.; SCARSO, J. Plasma Rico em Plaquetas. In: DINATO, C.J.; POLIDO, D.W. (Eds). **Implantes osseointegrados: cirurgia e prótese**. São Paulo: Artes Médicas, 2001. p. 315-342.

EVERTS, P.A.M. et al. Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. **Journal of Extracorporeal Technology**, Bloomsburg, v. 38, n. 2 p. 174-187, 2006.



FRISBIE, D.D.; GHIVIZZANI, S.C.; ROBBINS, P.D. et al. Treatment of experimental equine osteoarthritis by in vivo delivery of the equine interleukin-1 receptor antagonist gene. **Gene Ther**, v. 9, n. 1, p. 12-20, 2002.

FRISBIE, D.D.; KAWCAK, C.E.; WERPY, N.M. et al. Clinical, biochemical, and histologic effects of intra-articular administration of autologous conditioned serum in horses with experimentally induced osteoarthritis. **Am J Vet Res**, v. 68, n. 3, p. 290-296, 2007

FUCHS, E.; SEGRE, J.A. Stem cells: a new lease on life. **Cell**, v. 100, p. 143-155, 2000.

GOLDIN, J. R. Pesquisa com célula-tronco. 2006. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/bioetica/celtron.htm> acesso em 08 de jan de 2013

GROVE, J.E.; BRUSCIA, E.; KRAUSE, D.S. Plasticity of bone marrow-derived stem cells. **Stem Cells**, v. 22, p. 487-500, 2004. Disponível em: <http://www.stemcells.com>. Acesso em: 15 jan. 2013

GUERRA, P.; MEDEIROS, S.A.F. Estudo mostra que o mercado equino gera 7,3 bilhões por ano. **Revista Gleba – informativo técnico**, ano 51, n. 216, 2006.

HANDIN, R.I. et al. **Blood: principles, practice of hematology**. Philadelphia: J. B. Lippincott, 1995.

HANNUM, C.H.; WILCOX, C.J.; AREND, W.P. et al. Interleukin-1 receptor antagonist activity of a human interleukin-1 inhibitor. **Nature**, v. 343, n. 6256, p. 336-340, 1990.

HARRISON, P.; CRAMER, E. M. Platelet alpha-granules. **Blood Review**, Cambridge, v. 7, n. 1, p. 52-62, 1993.

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

HOFFBRAND, A.V. et al. Plaquetas, coagulação do sangue e hemostasia. In: \_\_\_\_\_. **Fundamentos em Hematologia**. Artmed, 2004. Cap. 18, p. 244-257.

HU, H.; FORSLUND, M; LI, N. Influence of extracellular calcium on single platelet activation as measured by whole blood flow cytometry. **Thromb Res**, v. 116, n. 6, p. 241-247, 2005.

IGLÉZIAS, J.C.R. Célula-tronco. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**. v. 6, p. 3-9, 2004.

JAMESON, C. A. Autologous platelet concentrate for the production of platelet gel. **LabMedicine**, v. 38, n. 1, p. 39-42, 2007.

JOHNSTONE, I.B. Comparative effects of phenylbutazone, naproxen and flunixin meglumine on equine platelet aggregation and platelet factor 3 availability in vitro. **Can J Comp Med**, v. 47, n. 2, p. 172-179, 1983.

KAPLAN, D.R.; CHAO, F.C.; STILES, C.D. et al. Platelet alpha granules contain a growth factor for fibroblasts. **Blood**, v. 55, n. 6, p. 1043-1052, 1979.

KATO, H.; OHASHI, T.; MATSUSHIRO, H. et al. Molecular cloning and functional expression of equine interleukin-1 receptor antagonist. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 56, n. 3-4, p. 221-231, 1997.

KERN, S.; EICHLER, H.; STOEVE, J. et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. **Stem Cells**, v. 24, p. 1294-1301, 2006. Disponível em: [www.stemcells.com](http://www.stemcells.com). Acesso em: 25 nov. 2012.

KINGHAM, P. J.; KALBERMATTEN, D. F.; MAHAY, D.; ARMSTRONG, S. J.; WIBERG, M.; TERENGGHI, G. Adipose-derived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. **Experimental Neurology**, v. 207, n. 2, p. 267–274, 2007.

LAURINDO, I.M.M; MELLO, S.B.V; NOVAES, G.S.; PALACIOS, F.A.S; YOSHINARI, N.H. Participação dos radicais livres na inflamação articular. **Revista do Hospital de Clínicas**, v. 52, n. 2, p. 72-79, 1997.

MAIA L. **Plasma rico em plaquetas no tratamento de tendinite em eqüinos: avaliação clínica, ultrasonográfica e histopatológica**. 2008. 78f. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária – Universidade Federal de Viçosa, 2008.

MARX, R.E.; CARLSON, E.R.; EISCHSTAEDT, R.M.; SCHIMMELE, S.R.; STRAUSS, J.E.; GEORGEFF K.R. Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 85, n. 6, p. 638-646, 1998.

MARX, R.E. Platelet-rich plasma (PRP): What is PRP and what is not PRP? **Implant Dentistry**, v. 10, n. 4, p. 225-228, 2001.

MARX, R.E. Platelet-rich plasma: Evidence to support its use. **Journal Oral Maxillofacial Surgery**, n. 62, p. 489-496, 2004.

MAY, S.A.; HOOKE, R.E.; LEES, P. The characterization of equine interleukin-1. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 24, n. 2, p. 169-175, 1990.

MAYHALL, E.A.; PAFFETT-LUGASSY, N.; ZON, L.I. The clinical potencial of stem cells. **Cur. Opinion Cell Biol.**, v. 16, n. 6, p. 713-720, 2004.

MAZZUCCO, L.; MEDICI, D.; SERRA, M. et al. The use of autologous platelet gel to treat difficult-to-heal wounds: a pilot study. **Transfusion**, v. 44, n. 7, p. 1013–1018, 2004.

MCILWRAITH, C.W; TROTTER, G.W. Joint disease in the horse. Philadelphia: Saunders, 1996, 490 p.

MIAO, Z.; JIN, J.; CHEN, L.; ZHU, J.; HUANG, W.; ZHAO, J.; QIAN, H.; ZHANG, X. Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: Comparison with human bone

marrow mesenchymal stem cells. **Cell Biology International**, v. 30, n. 3, p. 681-687, 2006.

MONTEIRO, S.O.; LEPAGE, O.M.; THEORET, C.L. Effects of platelet-rich plasma on the repair of wounds on the distal aspect of the forelimb in horses. **Am J Vet Res**, v. 70, n. 2, p. 277-282, 2009.

MORISSET, S.; FRISBIE, D.D.; ROBBINS, P.D.; et al. IL-1ra/IGF-1 gene therapy modulates repair of microfractured chondral defects. **Clin Orthop Relat Res**, v. 462, p. 221-228, 2007.

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

MURRAY, M.M.; FORSYTHE, B.; CHEN, F. et al. The effect of thrombin on ACL fibroblast interactions with collagen hydrogels. **J Orthop Res**, v. 24, n. 3, p. 508-515, 2006.

NIXON, A.J.; HAUPT, J.L.; FRISBIE, D.D. et al. Gene-mediated restoration of cartilage matrix by combination insulin-like growth factor-I/interleukin-1 receptor antagonist therapy. **Gene Ther**, v. 12, n. 2, p. 177-186, 2005.

PELLETIER, J.; CARON, J.P.; EVANS, C.; ROBBINS, P.D.; GEORGESCU, H.I.; JOVANOVIC, D.; FERNANDES, J.C.; MARTEL-PELLETIER, J. In vivo suppression of early experimental osteoarthritis by interleukin-1 receptor antagonist using gene therapy. **Arthritis and Rheumatism**, v. 40, n. 6, p. 1012-1019, 1997.

PRESNELL, S.C.; PETERSEN, B.; HEIDARAN, M. Stem cells in adult tissues. **Cell Developmental Biol.** v. 13, n. 5, p. 369-376, 2002. Disponível em: <http://www.idealibrary.com>. Acesso em: 08 jan. 2013.

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

RICHARD, D.; MITCHELL, D. V. M. Treatment of Tendon and Ligament Injuries with UBM Powder (ACELL- Vet®), 2005. Disponível em: [http://www.acell.com/vet\\_download](http://www.acell.com/vet_download) acesso em 06 de jan de 2013.

RICHARDSON, D.W.; DODGE, G.R. Effects of interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  on expression of matrix-related genes by cultured equine articular chondrocytes. **American Journal of Veterinary Research**, v. 61, n. 6, p. 624-630, 2000.

SALDALAMACCHIA, G. et al. Uso del gel di piastrine autologo per la cura delle ulcere del piede diabetico. **Giornale Italiano di Diabetologia Metabolismo**, v. 24, p. 103-105, 2004.

SCHALM, O.W.; JAIN, N.C.; CARROL, E.J. Normal values in blood morphology with comments of species characteristics in response to disease. **Veterinary Hematology**. 3. Ed. Philadelphia: Lea & Febiger. Cap. 3, p. 82-218, 1975.

SCHLIEPHAKE, H. Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Guildford, v. 31, n. 5, p. 469-484, 2002.

SCHNABEL, V.L.; MOHHAMED, O.H.; MILLER, J.B.; MCDERMOTT, G.W.; JACOBSON, S.M.; SANTAGELO, S.K.; FORTIER, A.L. Platelet Rich Plasma (PRP) enhanced anabolic gene expression patterns in flexor digitorum superficialis tendons. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 25, n. 2, p. 234-240, 2007.

SMITH, R.K.W.; WEBBON, P.M. Harnessing the stem cell for the treatment of tendon injuries: heralding a new dawn? **British J. Sports Med.** v. 39, p. 582-584, 2005.  
Disponível em: <http://www.bjsportmedicine>. Acesso em: 20 dez. 2012.

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

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

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

SUTTER, W.W. et al. Comparison of hematologic values and transforming growth factor-beta and insulin-like growth factor concentrations in platelet concentrates obtained by use of buffy coat and apheresis methods from equine blood. **American Journal Veterinary Research**, Schaumburg, v. 65, n. 7, p. 924-930. 2004.

TABLIN, F.; WALKER, N.J.; HOGLE, S.E. et al. Assessment of platelet growth factors in supernatants from rehydrated freeze-dried equine platelets and their effects on fibroblasts in vitro. **Am J Vet Res**, v. 69, n. 11, p. 1512-1519, 2008.

VENDRAMIN, F.S. et al. Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento: técnica de obtenção e utilização em cirurgia plástica. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 33, n. 1, p. 24-28, 2006.

VIDAL, M. A.; KILROY, G. E.; LOPEZ, M. J.; JOHNSON, J. R.; MOORE, R. M.; GIMBLE, J. M. Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. **Veterinary Surgery**, v.36, n.7, p. 613- 622, 2007.

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

WASELAU, M.; SUTTER, W.W.; GENOVESE, R.L. et al. Intralesional injection of platelet-rich plasma followed by controlled exercise for treatment of midbody suspensory ligament desmitis in Standardbred racehorses. **J. Am Vet. Med. Assoc.**, v. 232, n. 10, p. 1515–1520, 2008.

WEHLING, P.; MOSER, C.; FRISBIE, D. et al. Autologous conditioned serum in the treatment of orthopedic diseases: the orthokine therapy. **BioDrugs**, v. 21, n. 5, p. 323-332, 2007.

WEIBRICH, G. et al. Quantification of thrombocyte growth factors in platelet concentrates produced by discontinuous cell separation. **Growth factors**, v. 20, p. 93-97, 2002.

WEIBRICH, G. et al. Comparison of platelet, leukocyte, and growth factor levels in point-of-care platelet-enriched plasma, prepared using a modified Curasan kit, with preparations received from a local blood bank. **Clinical Oral Implants Research**, p. 357-362, 2003.

YAMADA, A.L.M. et al. Avaliação clínica e artroscópica do tratamento de lesões condrais, experimentalmente induzidas em equinos, com células tronco mesenquimais e plasma rico em plaquetas. In: XII Conferência anual da ABRAVEQ, 2011, Campinas, São Paulo. **Anais...** Abraveq- Associação Brasileira dos Médicos Veterinários de Equídeos, 2011, v. 35, p. 239, p. 77-78.

ZUK, P.A.; ZHU, M.; ASHIJIAN, P. et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Mol. Biol. Cell**, v. 13, p. 4279-4295, 2002. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com>. Acesso em: 18 jan. 2013.