

## CONSIDERAÇÕES SOBRE A OBTENÇÃO, PROCESSAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO TERAPÊUTICA DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS EM MEDICINA EQUINA

Leandro Maia<sup>1</sup>  
Bruna De Vita<sup>2</sup>  
Carolina Nogueira de Moraes<sup>3</sup>  
Flavia Caroline Destro<sup>3</sup>  
Fernanda Cruz Landim-Alvarenga<sup>4</sup>  
Rogério Martins Amorim<sup>5</sup>

### RESUMO

Na medicina veterinária, o interesse nas células-tronco mesenquimais (CTMs) tem aumentando exponencialmente nos últimos anos, fato esse demonstrado pelo crescente número de pesquisas e publicações na área. Em equinos, a medula óssea e o tecido adiposo se destacam como as principais fontes para obtenção de CTMs para uso terapêutico, apresentando resultados na literatura bastante promissores, particularmente para o tratamento de lesões ortopédicas. Nesse sentido, o objetivo dessa revisão é descrever as características gerais das CTMs, relatando as fontes de obtenção, o processamento, a caracterização *in vitro* e aplicação terapêutica na medicina equina.

**Palavras-chaves:** CTMs, cultivo, diferenciação, tratamento, cavalo.

## CONSIDERATIONS ABOUT COLLECTION, PROCESSING, CHARACTERIZATION AND THERAPEUTIC APPLICATION OF MESENCHYMAL STEM CELLS IN EQUINE MEDICINE

### ABSTRACT

In veterinary medicine, the interest in mesenchymal stem cells (MSCs) has increased exponentially in the last years, a fact demonstrated by the growing number of research and

<sup>1</sup> Aluno de Doutorado do Depto de Clínica Veterinária. Bolsista FAPESP. Distrito de Rubião Júnior S/N, CEP 18618970, Botucatu/SP. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Univ Estadual Paulista, Departamento de Clínica de Veterinária

<sup>2</sup> Aluno de Doutorado do Depto de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Distrito de Rubião Júnior. Distrito de Rubião Júnior S/N, CEP 18618970, Botucatu/SP. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Univ Estadual Paulista, Depto de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária.

<sup>3</sup> Aluna de Mestrado Depto de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Distrito de Rubião Júnior. Distrito de Rubião Júnior S/N, CEP 18618970, Botucatu/SP. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Univ Estadual Paulista, Depto de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária.

<sup>4</sup> Professora Titular do Depto de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária. Distrito de Rubião Júnior S/N, CEP 18618970, Botucatu/SP. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Univ Estadual Paulista, Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária.

<sup>5</sup> Professor Assistente Doutor do Depto de Clínica Veterinária. Distrito de Rubião Júnior S/N, CEP 18618970, Botucatu/SP. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Univ Estadual Paulista, Departamento de Depto de Clínica Veterinária

publications in the area. In equines, bone marrow and adipose tissue stand out as the main source for obtainment of MSCs for therapeutic use, showing very promising results at literature particularly for the treatment of orthopedic lesions. At this sense, the aim of this review is to describe the general characteristics of MSCs, describing the sources of production, the processing, characterization and *in vitro* therapeutic application in equine medicine.

**Keywords:** MSCs, culture, differentiation, treatment, horse.

## **CONSIDERACIONES SOBRE LA OBTENCIÓN, PROCESAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y APLICACIÓN TERAPÉUTICA DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES EN MEDICINA EQUINA.**

### **RESUMEN**

En la medicina veterinaria, el interés en las células madre mesenquimales (CMMs) ha aumentando exponencialmente en los últimos años, hecho demostrado con el incremento en el número de investigaciones y publicaciones en el área. En equinos, la médula ósea y el tejido adiposo se destacan como las principales fuentes para obtención de CMMs para uso terapéutico, presentando resultados bastante prometedores en la literatura, particularmente para el tratamiento de lesiones ortopédicas. De esta manera, el objetivo de esta revisión es describir las características generales de las CMMs, relatando las fuentes de obtención, el procesamiento, la caracterización *in vitro* y su aplicación terapéutica en la medicina equina.

**Palabras-claves:** CMMs, cultivo, diferenciación, tratamiento, caballo.

### **INTRODUÇÃO**

O interesse terapêutico e biológico nas células-tronco (CT) tem aumentando nos últimos anos, fato esse demonstrado pelo crescente número de pesquisas e publicações na área. De acordo com Frisbie e Smith (1), o interesse no uso das CT está relacionado ao seu potencial de regeneração, o qual pode ser atribuído a seus efeitos parácrinos, migratórios, imunomoduladores, antiinflamatórios e antiapoptóticos (2, 3).

As células-tronco adultas de origem mesenquimal (CTMs) provenientes da medula óssea e do tecido adiposo são os dois tipos mais comuns utilizados atualmente na abordagem terapêutica para regeneração de tecidos, sendo facilmente obtidas para isolamento e cultivo na espécie equina (4).

Na medicina equina, os estudos com CTMs estão restritos particularmente ao tratamento de lesões tendoligamentares e osteoarticulares, com resultados promissores para utilização em outros tecidos, inclusive extramesenquimais. É fundamental para o aprimoramento da terapia celular que o processamento e a caracterização das CTMs seja aperfeiçoado e dominado e que os seus mecanismos de ação sejam melhores elucidados para adequada aplicação terapêutica

O objetivo dessa revisão é descrever as características gerais das CTMs, relatando as fontes de obtenção, o processamento, a caracterização *in vitro* e aplicação terapêutica na medicina equina.

### **REVISÃO DE LITERATURA**

#### **CÉLULAS-TRONCO**

As células-tronco (CT) podem ser definidas como células com grande capacidade de proliferação e auto-renovação, além da capacidade de responder a estímulos externos e dar origem a diferentes linhagens celulares mais especializadas (5).

De acordo com a origem tecidual, as CT podem ser classificadas em células-tronco embrionárias e adultas (CTAs). O primeiro tipo é derivado da massa celular interna do blastocisto, sendo totipotentes ou capazes de se transformar em qualquer tipo celular, e por sua vez em um organismo inteiro. O segundo tipo inclui as células-tronco hematopoiéticas (CTH) e mesenquimais (CTMs), podendo ser isoladas de tecidos de origem mesodermal, tais como medula óssea, músculo, tendão, tecido adiposo (3), sangue periférico (6), matriz do cordão umbilical (7) e líquido amniótico (8). As CTH são responsáveis pela produção da linhagem linfóide e mielóide e as CTMs são capazes de se diferenciar em tipos celulares de origem mesodermal, incluindo osso, músculo, cartilagem, tecido adiposo, ligamento e tendão (3). Outros tipos de CTAs, além das mesenquimais incluem as epiteliais, as musculares e as neuronais, sendo que a plasticidade, ou seja, a capacidade de originar diferentes tipos de células maduras é muito elevada nas CTMs (9).

As CT desempenham um papel fundamental na auto-renovação de tecidos adultos ao longo da vida. Alguns tecidos são caracterizados pela contínua perda de células, incluindo o sistema hematopoiético, intestino e a pele, sendo as CTAs responsáveis pela reposição celular e consequentemente homeostase tecidual (10). Segundo Nardi (9), além da reposição de células que sofrem apoptose, as CTAs podem proporcionar a recuperação de lesões não fisiológicas decorrentes de acidentes ou agentes patogênicos.

## **BIOLOGIA DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS (CTMS)**

As CTMs são células adultas indiferenciadas que podem ser isoladas de diferentes tecidos, mas primariamente do estroma da medula óssea. A origem embrionária dessas células é mesodermal; elas surgem a partir de células mesenquimais que dão origem a tecidos conjuntivos, como ossos, cartilagens, gordura, bem como o sistema vascular e hematopoiético (10). Em condições especiais essas células possuem a capacidade de se diferenciar em tecidos de origem ectodermal, mesodermal e endodermal, além de serem facilmente isoladas e expandidas *in vitro* (11). As CTMs possuem comportamento migratório, sendo esta característica a base para que as células-tronco possam atingir os sítios enfermos após a administração intravenosa, intralesional ou perilesional. As citocinas liberadas nos sítios de inflamação ou lesão promovem a sinalização química para orientar a migração das células implantadas (3). Segundo Chen et al. (11), essas células migram seletivamente para áreas de lesão, inflamação e tumores, onde estão envolvidas na reparação tecidual e formação do estroma associado ao tumor. Esta característica as tornam candidatas atrativas para uso como veículo para terapia em sítios específicos.

As CTs são capazes de autoregular os fatores da cascata da inflamação, incluindo as citocinas pro-inflamatórias interleucinas-1 $\beta$ , fator de necrose tumoral- $\alpha$  e interferon- $\gamma$ . Estes efeitos antiinflamatórios podem ter influências profundas no ambiente tecidual local e igualmente influenciar a habilidade de investigadores em utilizar células-tronco alogênicas sem induzir uma resposta imune do hospedeiro. Adicionalmente, essas células também secretam fatores de crescimento que promovem a efetiva revascularização tecidual, além de apresentarem efeito antiapoptótico, importante na restauração e manutenção da função tecidual (3).

De acordo com Phinney e Prockop (12), relatos tem revelado que as células-tronco progenitoras, particularmente as derivadas da medula óssea, promovem reparação tecidual mediante secreções de fatores que aumentam a regeneração das células lesadas, além de estimularem a proliferação e diferenciação de células-tronco endógenas em diversos tecidos e reduzirem as reações inflamatórias e imunes.

Chen et al. (13) demonstraram que as CTMs secretam diferentes citocinas e quimiocinas, tais como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF-a), fator de crescimento ligado a insulina, (IGF-1), fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento de queratinócito (KGF), fator derivado de estroma-1, angiopoietina-1, proteína inflamatória alfa e beta-1 de macrófagos e eritropoietina em quantidades superiores aos fibroblastos da derme. Adicionalmente, foi evidenciado que a secreção desses fatores recruta macrófagos e células da linhagem endotelial, aumentando assim a cicatrização de feridas cutâneas.

## PRINCIPAIS FONTES DE OBTENÇÃO DAS CTMS EM EQUINOS

Em equinos, as CTMs podem ser obtidas a partir da medula óssea (4, 14-18), sangue do cordão umbilical (19, 20), sangue periférico (21), tecido adiposo (4, 15, 22), matriz do cordão umbilical (7) e líquido amniótico (8). Segundo Colleoni et al. (15), as CTMs estão presentes em muitos tecidos, mas as células mais comumente utilizadas para uso clínico são as obtidas da medula óssea e tecido adiposo.

### Medula óssea

A medula óssea (MO) é o maior órgão hematopoiético do corpo, sendo responsável pela produção de eritrócitos, plaquetas, granulócitos, monócitos e um pequeno número de linfócitos (23). A concentração de CTMs na MO é considerada muito baixa (0,001 a 0,01%) (24), podendo essa desvantagem ser contornada pela expansão *in vitro* por duas a quatro semanas (3).

A técnica de colheita do sangue da MO é realizada tradicionalmente por punção do osso esterno (Figura 1), com o animal em estação utilizado-se a agulha de Jamshidi® ou de Komiyashiki® (25), com prévia sedação e bloqueio anestésico local. Conforme Kasashima et al. (17) o sítio anatômico mais seguro e factível para punção aspirativa da MO é na quinta esternébra, por sua localização cranial ao ápice do coração e adequada espessura dorsoventral. Adicionalmente, de acordo com esses mesmos autores, a aspiração da MO pode também ser conduzida na quarta e na sexta esternébra, mas há o inconveniente da primeira estar localizada entre os membro torácicos e a última próximo ao coração.

De forma alternativa, outro sítio anatômico que pode ser utilizado para punção aspirativa da MO é a tuberosidade coxal (TC). A técnica de colheita consiste na contenção em brete, bloqueio anestésico local, seguido da introdução da agulha de punção de MO na angulação e sentido adequado (25). Segundo Kasashima et al. (17), a agulha deve ser introduzida na proeminência óssea da TC no sentido dorsoventral e craniocaudal. Normalmente a penetração da agulha de 1 a 2 cm na TC é suficiente para colheita da MO no equino adulto, sendo necessária uma menor penetração em potros (23).

Comumente, o aspirado de medula óssea é acondicionado em uma solução de gradiente de densidade e a fração de células mononucleares é separada por centrifugação previamente a sua aspiração e cultivo. As células mononucleares têm uma densidade de 1073 g/dL, portanto, são isoladas em gradiente Ficoll 1077 g/dL (24). A solução de Ficoll é composta por uma mistura de polímeros de carboidratos e o composto iodado de metrazamida. Após a centrifugação à baixa velocidade, as hemácias, e os leucócitos granulócitos atravessam a fase orgânica (Ficoll-hipaque) e sedimentam, as células mononucleares (“anel celular”) localizam-se na interface entre as duas soluções, e as plaquetas e proteínas plasmáticas se localizam na fase aquosa (superior) (26). Após a separação da fração mononuclear, as células são lavadas e cultivadas em meio de manutenção, acrescido de antibiótico e antimicótico em estufa a 5% CO<sub>2</sub> a 37° C.

A cultura da MO contém inicialmente uma mistura heterogênea de tipos celulares, que se torna mais homogênea após as três primeiras semanas de cultivo. Durante o início do cultivo, a proporção de células hematopoiéticas comprometidas com a diferenciação terminal é reduzida por apoptose espontânea, sendo removidas pela não aderência. Desta forma, a população de células mesenquimais torna-se mais homogênea (27).

Uma das grandes vantagens dessa fonte é o seu elevado potencial osteogênico (28) e condrogênico (4), já comprovado experimentalmente.

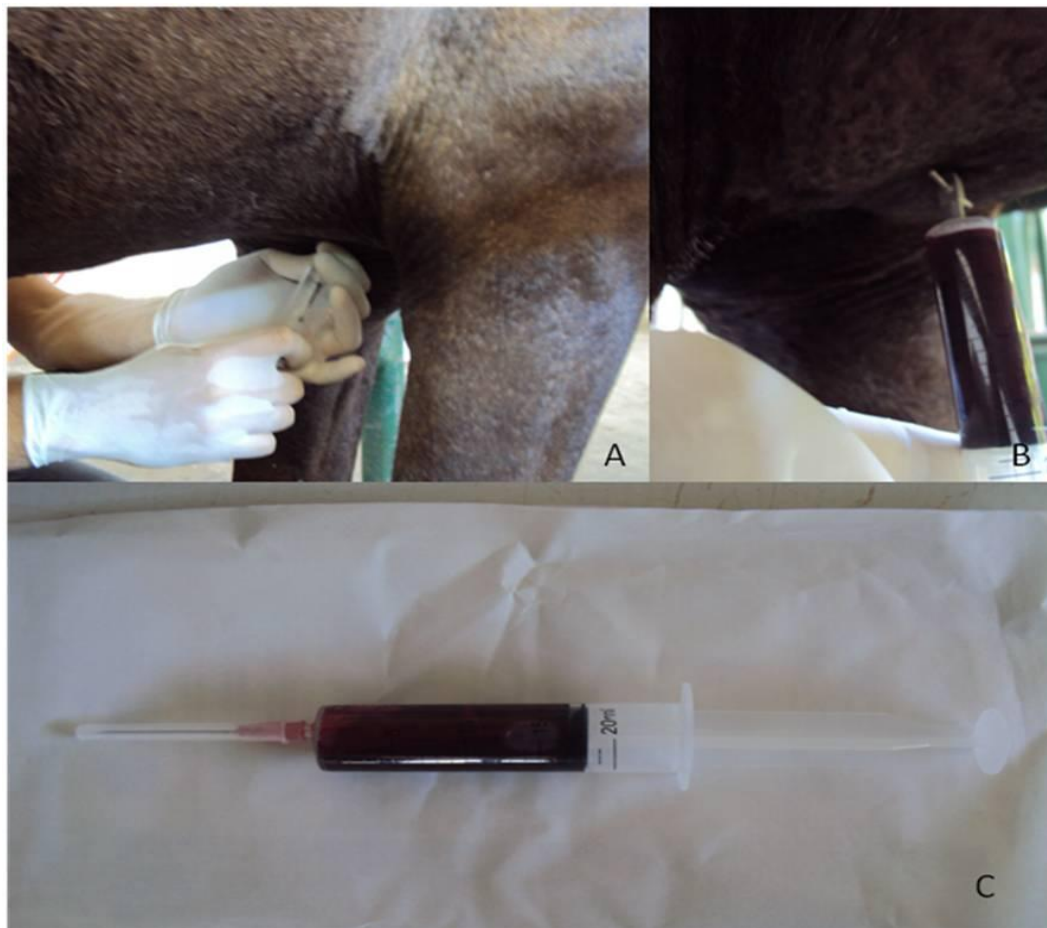


Figura 1. Punção aspirativa da medula óssea no grupo tratado. a) Bloqueio local com lidocaína a 2% com vasoconstrictor após sedação com xilazina a 10%. b) Punção aspirativa da medula óssea após fixação da agulha na esternébra. c) Amostra de medula óssea utilizada para isolamento e cultivo das CTMs. Fonte: Arquivo pessoal - Leandro Maia.

### **Tecido adiposo (TA)**

O tecido adiposo (TA) é uma fonte promissora de CTAs com fenótipo similar ao das células isoladas do aspirado de medula óssea (3).

A população de células isoladas do tecido adiposo é heterogênea e contém uma combinação fisiológica de fibroblastos, células e progenitores endoteliais, pericitos, macrófagos, pré-adipócitos, linfócitos B e T e células musculares lisas. O total da população de células-tronco é estimado em 1 a 3% do total de células nucleadas (29).

A colheita do tecido adiposo é conduzida normalmente na região acima do músculo glúteo dorsal, na base da cauda, mediante a prévia sedação, tricotomia, anti-sepsia e bloqueio anestésico local em L invertido (4, 30). Após a colheita, o TA é acondicionado em frascos

contendo solução fosfato tamponado (PBS) e encaminhado ao laboratório para digestão enzimática com colagenase, seguido do isolamento da fração vascular estromal (4, 15, 22, 30, 31) para cultivo ou direta aplicação terapêutica.

As vantagens do TA em comparação com a medula óssea como fonte de CTAs incluem: (I) mínima morbidade associada à colheita; (II) número de células-tronco clinicamente relevante, eliminando potencialmente a necessidade para propagação *in vitro*; (III) elevada proporção de células-tronco comparada com a medula óssea (2% vs 0,002%); e alta taxa de proliferação das células-tronco *in vitro* quando comparada com a medula óssea (29). Por outro lado, uma das desvantagens do uso dessa fonte é estética (ferida cirúrgica), desencorajando algumas vezes os proprietários de animais de alto valor e rendimento a realizarem o procedimento.

## CARACTERIZAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO

Durante o cultivo, se faz necessária tanto a caracterização morfológica, imunofenotípica, quanto a diferenciação das CTMs em linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica.

A Sociedade Internacional de Terapia Celular (SITC) criou critérios mínimos para a caracterização das CTMs humanas (32), sendo observada uma tendência para utilização de critérios semelhantes na medicina equina (7, 8, 27, 33, 34). Os critérios da SITC incluem: (I) aderência ao plástico em cultura celular; (II) expressão dos receptores de superfície celular CD105, CD73 e CD90 ( $\geq 95\%$  positivos) e ausência de expressão ( $\leq 2\%$  positivos) dos marcadores CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD19 ou CD79 $\alpha$  e HLA-DR, além da (III) demonstração *in vitro* para diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica (32).

### Caracterização morfológica

Em cultivo, as CTMs equina caracterizam-se por apresentar crescimento em monocamada, morfologia fibroblastóide e aderência ao plástico (Figura 2). É importante ressaltar, que estes aspectos morfológicos são muito inespecíficos e também compartilhados por outros tipos celulares, como os fibroblastos, o que dificulta a utilização isoladamente desses parâmetros para caracterização das CTMs (8, 19).

### Caracterização imunofenotípica de receptores de superfície celular

Marcadores de superfície celular são moléculas bioativas embebidas ou apostas a superfície externa de todas as células. Estas moléculas funcionam como receptores, possibilitando que as células se comuniquem umas com as outras ou se liguem especificamente a determinadas estruturas biológicas ou celulares. Estas moléculas que refletem a função celular podem também ser utilizadas para efeito de marcação e identificação de tipos celulares particulares, incluindo as CT (35).

A designação “Cluster of differentiation” (CD) refere-se aos marcadores de superfície celular utilizados para caracterizar tipos celulares (24). Até o momento nenhum marcador CD foi encontrado para identificar definitivamente as CTMs sendo necessário, na opinião de Taylor e Clegg (24), uma combinação de marcadores para caracterização de uma população homogênea.

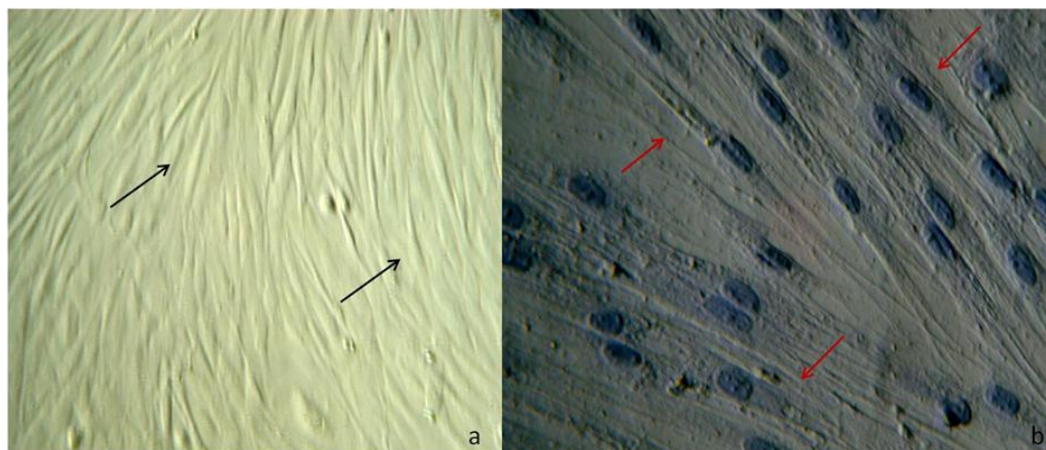


Figura 2. Células-tronco mesenquimais (CTMs) da medula óssea de equino. a) Nota-se a presença de CTMs com morfologia fibroblastóide, cultivadas em monocamada (setas). b) Nota-se a presença de CTMs com morfologia fibroblastóide e núcleo corado com hematoxilina (setas). Objetiva 10x (a) e 20x (b). Fonte: Arquivo pessoal - Leandro Maia.

A capacidade para caracterizar as CTMs equinas é prejudicada pela limitada disponibilidade de anticorpos e variabilidade nas reações cruzadas (36). Em estudo, Ibrahim et al. (37) demonstraram que de 379 anticorpos para marcadores de superfície celular (CD) humanos, apenas 14 (4%) apresentavam reação cruzada em leucócitos equinos. Carvalho et al. (38) avaliaram a expressão dos marcadores CD44, CD90 e CD13 em CTMs provenientes do tecido adiposo de equinos. Os resultados revelaram expressão dos marcadores CD44 e CD90 na citometria de fluxo, em todas as passagens estudadas (1-4). Já o marcador CD13 não demonstrou reatividade.

Devido à dificuldade de reação cruzada, De Schauer et al. (39) recentemente recomendaram um painel de marcadores de superfície celular para CTMs equina. As células devem expressar positivamente os marcadores CD29, CD44 e CD90 e serem negativas para os marcadores CD14, CD79 e MHCII.

### Diferenciação *in vitro* das CTMs em linhagens mesenquimais

A diferenciação é um processo que cursa com mudanças no tamanho, morfologia, potencial de membrana e atividade metabólica das células em resposta a modificações na expressão gênica (24).

A característica fundamental das CTMs em cultivo é a sua capacidade de se diferenciar em osso, cartilagem e gordura (35).

### Diferenciação osteogênica

A diferenciação osteogênica das CTMs necessita da presença dos agentes indutores: betaglicerol fosfato, ácido ascórbico, dexametasona e soro fetal bovino. Na presença dessas substâncias as CTMs adquirem morfologia de osteoblastos e passam a expressar fosfatase alcalina e a depositar matriz extracelular de cálcio rica em cálcio (40), que pode ser evidenciada pela coloração positiva com Alizarin red (17, 25, 28, 39) ou von Kossa (39, 41). Adicionalmente, outras técnicas para avaliar a diferenciação osteogênica, incluem a expressão dos genes Runx2 (Runt relacionado ao fator de transcrição 2), SPP1 (osteopontina), osteonectina e detecção das proteínas Runx2, colágeno do tipo I (COL1), osteocalcina,  $\beta 1$  integrina, osteopontina (39).

Estudo recente conduzido por Toupadakis et al. (28) compararam o potencial de diferenciação osteogênica das células-tronco mesenquimais provenientes da medula óssea,



tecido adiposo, matriz e sangue do cordão umbilical de equinos. Os resultados mediante a avaliação da expressão gênica, atividade de fosfatase alcalina e deposição da matriz extracelular de cálcio revelaram que as CTMs da MO diferenciam-se mais rapidamente e eficientemente para linhagem osteogênica do que as outras fontes estudadas. Esse excelente potencial osteogênico das CTMs provenientes da MO foi reafirmado recentemente por Maia et al. (25), mediante a mudança da morfologia fibroblástóide das células para poligonal, além da precoce e abundante deposição matriz de cálcio ao décimo dia de diferenciação.

### **Diferenciação adipogênica**

A diferenciação adipogênica das CTMs ocorre quando a monocamada celular é cultivada na presença de isobutilxantina. Nestas condições ocorre, ativação do gene PPAR $\alpha$  (*peroxisome proliferator activated receptor gamma*) e a síntese de ácidos graxos. Desta forma, as células cultivadas, rapidamente acumulam gotículas de lipídeos no citoplasma (40), que podem ser demonstradas pela coloração positiva a Oil Red (6, 8, 27, 39). Outros componentes importantes no meio de diferenciação adipogênica, além da isobutilmetilxantina, incluem a dexametasona, a indometacina, a insulina (6, 8) e o soro de coelho (27). De acordo com Stewart e Stewart (42), a isobutilmetilxantina sensibiliza as células a insulina, que por sua vez estimula a síntese de lipídeos e o acúmulo no interior de vacúolos intracelulares.

A adipogênese também pode ser avaliada pela expressão do gene PPAR $\alpha$  e identificação das proteínas adiponectina e  $\beta$ 1 integrina (39).

### **Diferenciação condrogênica**

A diferenciação condrogênica é conduzida em ambiente tridimensional com meio indutor enriquecido com fator de crescimento transformante beta (TGF- $\beta$ ) (27, 41) e/ou proteína morfogênica óssea (BMPs) (4, 17, 42). De forma factível, esse procedimento pode ser realizado em tubos do tipo falcon de 15 mL com trocas de meio a cada três ou quatro dias. Estima-se que o tempo necessário para diferenciação seja de aproximadamente 14 a 25 dias (26).

A resposta positiva à diferenciação pode ser avaliada histologicamente utilizando as colorações de azul de toluidina, alcian blue, safranina O e tricrômico de Mason ou também pela expressão dos genes Sox-9, colágeno do tipo II (COLII), relação do COLII/COL1 e de agrecan/versican, além da identificação das proteínas colágeno do tipo II e  $\beta$ 1 integrina (39).

Vidal et al. (4) compararam o potencial condrogênico das CTMs provenientes da MO e tecido adiposo de equinos expostas ao meio de diferenciação condrogênico suplementado ou não com BMP-6 e TGF $\beta$ 3. Os resultados desse estudo revelaram que as CTMs provenientes da MO apresentam potencial condrogênico superior as do tecido adiposo na presença dos fatores de crescimento estimulatórios.

## **APLICAÇÃO TERAPÊUTICA DAS CTMs EM EQUINOS**

As CTMs provenientes da medula óssea e do tecido adiposo são os dois tipos mais comuns de células-tronco utilizadas na abordagem terapêutica para regeneração de tecidos em equinos, sendo ambos facilmente obtidos para isolamento e expansão (4).

Na medicina equina, os estudos com terapia celular utilizando CTMs estão focados principalmente para ao tratamento de lesões tendoligamentares e osteoarticulares (14, 18, 30, 43-46). Segundo Dalgren (3), os implantes intraarticulares e intralesionais em tendões e ligamentos são as principais aplicações clínicas das CTMs em equinos.



Para uso terapêutico, as células provenientes da medula óssea e do tecido adiposo podem ser utilizadas nas formas cultivadas ou não cultivadas (fração mononuclear e fração vascular estromal), com vantagens e limitações de acordo com cada fonte.

### Aplicação em tendinopatias

O principal desafio no tratamento das tendinopatias em equinos está relacionado ao período necessário para reparação tecidual que, associado aos métodos terapêuticos tradicionais, pode cursar com meses ou anos para completa cicatrização da lesão, além do mais, há alto índice de recidivas (47). Desta forma, a terapia intralesional com CTMs tem se mostrado uma alternativa promissora para regeneração e restabelecimento da função tendínea.

Segundo Smith et al. (48), as CTMs apresentam potencial de diferenciação em tenócitos, com regeneração da matriz tendínea após lesão. Violine et al. (16) demonstraram *in vitro* que as CTMs provenientes da medula óssea se diferenciam em tenócitos e expressaram os marcadores de células-tronco embrionárias Oct4 e Nanog.

Pacini et al. (14) estudaram 26 equinos com tendinite do tendão do músculo flexor digital superficial (TFDS), no qual 11 foram tratados com CTMs provenientes da medula óssea e os demais com terapia convencional (grupo controle). Dos 11 animais tratados com CTM, nove apresentaram melhora significativa pelo exame ultrassonográfico e retornaram a atividade atlética sem recidiva. Por outro lado, todos os equinos tratados com terapia convencional apresentaram recidiva após 4 a 12 meses do tratamento (média =7 meses). Em outro estudo, porém com tendinite induzida no TFDS com colagenase, Crovace et al. (44) observaram por meio de histopatologia e imunistoquímica a presença de colágeno do tipo I e III, além de organização da arquitetura tecidual nos tendões tratados com CTM e células mononucleares provenientes da medula óssea.

Lacitignola et al. (49) compararam o efeito de células mononucleares (CMs), CTMs da medula óssea, placebo (solução fisiológica) ou cola de fibrina na reparação da tendinite do TFDS induzida por colagenase. Três semanas após a indução da lesão, os animais receberam por via intralesional  $5,5 \times 10^6$  CTMs e  $122 \times 10^6$  CMs. Os resultados desse estudo revelaram que as CTMs e as CMs proporcionaram regeneração qualitativa da matriz extracelular do tendão similar em relação à orientação das fibras, relação de colágeno do tipo I/III e expressão da proteína oligomérica da matriz cartilaginosa (COMP).

Em estudo com seis equinos com tendinite induzida no TFDS, Barreira (43) constatou que a terapia com células precursoras mesenquimais da medula óssea não cultivada também acelera o processo de cicatrização do TFDS de equinos. Em outro estudo, mais recente com implante autólogo de CMs provenientes da medula óssea, Oliveira (50) observou que o tratamento instituído, além de acelerar o processo de cicatrização tendínea, melhora a organização tecidual e a expressão de colágeno tipo I.

Nixon et al. (46) estudaram equinos com tendinite induzida por colagenase que foram tratados com a fração vascular estromal do tecido adiposo e observaram após o 42º dia do tratamento melhora na organização tecidual quando comparado ao grupo controle que foi tratado com PBS.

Del Blue et al. (51) avaliaram os efeitos das células-tronco mesenquimais cultivadas provenientes do tecido adiposo em associação com o plasma rico em plaquetas para o tratamento de tendinite do TFDS de 16 equinos. Os resultados revelaram que dos 16 equinos que foram tratados, 14 recuperaram a funcionalidade do tendão e retornaram a atividade física normalmente.

Carvalho et al. (30) estudaram experimentalmente o efeito do tratamento das CTMs proveniente do TA na tendinite do TFDS de equinos (N=8), observando na análise histológica e imunistoquímica, redução da inflamação, bem como melhora na organização das fibras colágenas e aumento na expressão do colágeno do tipo I.

## Aplicação em enfermidades articulares

As claudicações originadas de enfermidades articulares, tais como osteoartrites e osteocondroses são uma significativa fonte de morbidade e perda de rendimento em equinos atletas. A regeneração da cartilagem apresenta desafios únicos devido a sua falta de vascularização e inervação, promovendo assim uma cicatrização intrínseca lenta e ineficiente. O tecido tipicamente resultante desse processo é a fibrose ou fibrocartilagem que não tem propriedades mecânicas necessárias para suportar a tensão fisiológica. Como resultado desses desafios, a restauração da cartilagem com o uso de CTMs, tem sido considerada uma opção atrativa para o tratamento da sinovite e degeneração articular na espécie equina (36).

A aplicação intraarticular das células-tronco presume a sua habilidade de migrar para membrana sinovial, cartilagem ou osso subcondral exposto em resposta a inflamação e /ou isquemia (3).

Em uma série de casos clínicos, 60 equinos acometidos com osteocondrite dissecante, cisto ósseo subcondral, osteoartrite e lesão de menisco foram tratados com aplicação intraarticular de células nucleadas derivadas do tecido adiposo e acompanhados ao longo do tempo. Muitos dos casos envolveram a articulação do joelho, sendo que 35% eram condições crônicas que tinham sido tratadas com uma ou mais modalidades convencionais, incluindo artroscopia, esteróides, ondas de choque extracorpórea ou soro autólogo condicionado. Com relação à osteoartrite, 67% dos equinos retornaram ao nível de desempenho anterior após o tratamento. Já nos animais unicamente acometidos com lesões císticas, o retorno foi de 80% ao nível de desempenho anterior. Em geral, apenas 17% dos equinos não responderam ao tratamento com as células nucleadas provenientes do tecido adiposo. Esses achados suportam o uso da terapia intraarticular com CTs para tratamento de enfermidades articulares em equinos (3).

McIlwraith et al. (18) avaliaram o efeito do implante intraarticular de CTMs provenientes da MO em microfraturas criadas cirurgicamente nos côndilos mediais do fêmur de dez equinos. Um mês após a indução da lesão, foram administrados  $20 \times 10^6$  CTMs associadas a 22 mg de hialuronato no grupo tratado e unicamente o hialuronato na mesma dose na articulação contralateral (grupo controle). Os animais foram avaliados por parâmetros radiográficos, musculoesqueléticos e artroscópicos (sexto mês) após tratamento, sendo que no décimo segundo mês, todos foram sacrificados e as articulações (tratadas e controles) avaliadas por ressonância magnética, macroscopia, histologia, histomorfometria, imunohistoquímica, e bioquímica. Os resultados desse estudo revelaram que a aplicação de CTMs aumenta a qualidade de reparação e resistência cartilágnea pela avaliação macroscópica e artroscópica, bem como do conteúdo de agregan pela análise imunoistoquímica. Diferenças ( $p > 0,05$ ) com relação aos parâmetros clínicos e histológicos não foram observadas entre os grupos estudados.

Outras possibilidades de aplicação terapêutica das CTMs, além da ortopedia são para o tratamento de paralisia de nervo facial primária (52), lesões de córnea e retina (53) e endometrioses (54).

## COMENTÁRIOS FINAIS

Nos últimos anos tem sido crescente o número de pesquisas científicas realizadas visando o incremento da equideocultura nacional, frente à importância da indústria do cavalo no Brasil como segmento da economia agrícola. As publicações nestas áreas refletem as tendências atuais da indústria equina, com enfoque na medicina esportiva, neonatologia,

técnicas de diagnóstico clínico, novas tecnologias da reprodução de garanhões e éguas, estudos avançados sobre sanidade e doenças dos equinos, assim como estudos sobre o comportamento e bem estar nos sistemas de produção dos mesmos (55).

Neste sentido, o aperfeiçoamento e o domínio das técnicas de colheita, processamento e caracterização das células-tronco, são alguns dos pré-requisitos necessários para o sucesso da terapia celular na espécie equina. Além disso, um melhor conhecimento dos mecanismos genéticos e moleculares de controle e diferenciação das CTMs forneceria informações valiosas sobre os mecanismos de ação envolvidos na reparação tecidual mediada por estas células.

A literatura tem demonstrado resultados animadores com o uso de CTMs em lesões ortopédicas, fomentando o uso desta terapia também em lesões de outros tecidos e sistemas, incluindo os não de origem mesodérmica. No entanto, questões práticas relacionadas com a concentração celular adequada para implante em cada tecido, número de implantes a serem realizados, melhor via de administração e melhor tipo celular para cada enfermidade ainda precisam ser esclarecidos para otimizar a utilização da terapia celular. Mais importante do que isso, os reais mecanismos de ação e efeitos biológicos das CTMs em cada fase da cicatrização e da reparação tecidual devem ser explorados e melhor compreendidos. Sendo assim, apesar dos enormes avanços obtidos nesta área nos últimos anos este ainda é um tema que carece de inúmeras respostas, abrindo, portanto um vasto campo para novas pesquisas na medicina equina.

**Agradecimento:** A FAPESP pela concessão da bolsa de doutorado (Processo 2009/51431-6).

## REFERÊNCIAS

1. Frisbie DD, Smith RKW, Clinical update on the use of mesenchymal stem cells in equine orthopaedics. *Equine Vet J.* 2010;42:86-9.
2. Brooke G, Cook M, Blair C, Han R, Heazlewood C, Jones B, et al. Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells. *Semin Cell Dev Biol.* 2007;18:846-58.
3. Dahlgren LA. Stem cell therapy. In: Robinson NE, Sprayberry KA. *Current therapy in equine medicine.* 6ª ed. St. Louis: Saunders; 2009. p.908-11.
4. Vidal MA, Robinson SO, Lopez MJ, Paulsen DB, Borkhsenius O, Johnson JR, et al. Comparison of chondrogenic potential in equine mesenchymal stromal cells derived from adipose tissue and bone marrow. *Vet Surg.* 2008;37:713-24.
5. Pereira LV. A importância do uso das células tronco para a saúde pública. *Cienc Saude Colet.* 2008;13:7-14.
6. Martinello T, Bronzini I, Maccatrozoo L, Lacopetti I, Sampaolesi M, Mascarello F, et al. Cryopreservation does not affect the stem characteristics of multipotent cells isolated from equine peripheral blood. *Tissue Eng Part C Methods.* 2010;16:771-81.
7. Hoynowski SM, Fry MM, Gardner BM, Leming MT, Tucker JR, Black L, et al. Characterization and differentiation of equine umbilical cord-derived matrix cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;362:347-53.
8. Lovati A, Corradeti B, Lange CA, Recordati C, Bonacina E, Bizarro D, et al. Comparison of equine bone marrow-umbilical cord matrix and amniotic fluid-derived progenitor cells.

- Vet Res Commun. 2011;35:103-12.
9. Nardi NB. Células-tronco: fatos, ficção e futuro. Genética na escola [Internet]. Ribeirão Preto; 2007 [acesso em 2011 Nov 16]. Disponível em: <http://www.sbg.org.br/GeneticaEscola2/web/ano2vo12/05.pdf>
  10. Humpreys BD, Bonventre JV. Mesenchymal stem cells in acute injury kidney. *Annu Rev Med.* 2008;59:311-25.
  11. Chen Y, Shao JZ, Xiang LX, Dong XJ, Zhang GR. Mesenchymal stem cells: A promising candidate in regenerative medicine. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40:815-20.
  12. Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair - current views. *Stem Cells.* 2007;25:2896-902.
  13. Chen L, Tredget EE, Wu PYG, Wu Y. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PloS One.* 2008;3:1-12.
  14. Pacini S, Spinabella S, Trombi L, Galimberti S, Dini F, Carulicci F. Suspension of bone marrow-derived undifferentiated mesenchymal stromal cells for repair of superficial digital flexor tendon in race horses. *Tissue Eng.* 2007;12:2949-55.
  15. Colleoni S, Bottani E, Tessaro I, Mari G, Merlo B, Romagnoli N, et al. Isolation, growth and differentiation of equine mesenchymal stem cells: effect of donor, source, amount of tissue and supplementation with basic fibroblast growth factor. *Vet Res Commun.* 2009;33:811-21.
  16. Violini S, Ramelli P, Pisani LF, Gorni C, Mariani P. Horse bone marrow mesenchymal stem cells express embryo stem cell markers and show the ability for tenogenic differentiation by in vitro exposure to BMP-12. *BMC Cell Biol.* 2009;10:1-10.
  17. Kasashima Y, Ueno T, Tomita A, Goodship AE, Smith R KW. Optimisation of bone marrow aspiration from the equine sternum for the safe recovery of mesenchymal stem cells. *Equine Vet J.* 2011;43:288-94.
  18. McIlwraith CW, Frisbie DD, Rodkey WG, Kisiday JD, Werpy NM, Kawcak CE. Evaluation of intra-articular mesenchymal stem cells to augment healing of microfractured chondral defects. *Arthroscopic.* 2011;27:1552-61.
  19. Koch TG, Heerckens T, Thomsen PD, Betts DH. Isolation of mesenchymal stem cells from equine umbilical cord blood. *BMC Biotechnol.* 2007;7:1-9.
  20. Reed SA, Johnson SE. Equine umbilical cord blood contains a population of stem cells that express Oct4 and differentiate into mesodermal and endodermal cell types. *J Cell Physiol.* 2008;215:329-36.
  21. Koerner J, Nestic D, Romero JD, Brehm W, Mainil-Varlet P, Grogan SP. Equine peripheral blood-derived progenitors in comparison to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2006;24:1613-9.
  22. Mambelli LI, Santos EJC, Frazão PJR, Chaparro MB, Kerkis A, Zoppa ALV, et al.

- Characterization of equine adipose tissue–derived progenitor cells before and after cryopreservation. *Tissue Eng Part C Methods*. 2009;15:87-94.
23. Latimer KS, Andreade CB. Bone marrow. In: Cowell RL, Tyler RD. *Diagnostic cytology and hematology of the horse*. 2ª ed. St. Louis: Mosby; 2002. p.217-26.
  24. Taylor SE, Clegg PD. Collection and propagation methods for mesenchymal stromal cells. *Vet Clin North Am Equine Pract*. 2011;27:243-61.
  25. Maia L, Freita NPP, De Vita B, Landim-Alvarenga FC, Amorim RM. Avaliação do potencial osteogenico das células-tronco mesenquimais de medula óssea de equinos, isoladas com Ficoo-Paque de diferentes densidades. In: *Anais da 12ª Conferência Anual da Abraveq; 2011, Campinas*. Campinas: Associação Brasileira de Médicos Veterinários de Equídeos; 2011. p.198-9.
  26. Fontes AM, Orellana MD, Prata KL. Células-tronco e seus métodos de estudo. In: Zago MA, Covas DT. *Células-tronco: a nova fronteira da medicina*. São Paulo: Atheneu; 2006. p.93-108.
  27. Radcliffe CH, Flaminio JBF, Fortier L. Temporal analysis of equine bone marrow aspirate during establishment of putative mesenchymal progenitor cell populations. *Stem Cells Dev*. 2010;19:269-81.
  28. Toupadakis CA, Woung A, Genetos DC, Cheung WK, Borjesson DL, Leach JK, et al. Comparison of the osteogenic potential of equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, umbilical cord blood, and umbilical cord tissue. *Am J Vet Res*. 2010;71:1237-45.
  29. Dahlgren LA. Management of tendon injuries. In: Robinson NE, Sprayberry KA. *Current therapy in equine medicine*. 6ª ed. St. Louis: Saunders; 2009. p.518-23.
  30. Carvalho AM, Alves ALG, Oliveira PGG, Alvarez LEC, Amorim RL, Hussni CA, et al. Use of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for experimental tendinitis therapy in equines. *J Equine Vet Sci*. 2011;31:26-34.
  31. Vidal MA, Kilroy GE, Lopez MJ, Johnson JR, Moore RM, Gimble JM. Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Vet Surg*. 2007;36:613-22.
  32. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krauses DS, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8:315-7.
  33. Arnhold SJ, Goletz I, Klein H, Stumpf G, Beluche LA, Rohde C, et al. Isolation and characterization of bone marrow–derived equine mesenchymal stem cells. *Am J Vet Res*. 2007;68:1095-105.
  34. Guest DJ, Ousey JC, Smith MRW. Defining the expression of marker genes in equine mesenchymal stromal cells. *Stem Cells Cloning Adv Appl*. 2008;1:1-9.
  35. Covas DT. Células-tronco mesenquimais. In: Zago MA, Covas DT. *Células-tronco: a nova fronteira da medicina*. São Paulo: Atheneu; 2006. p.35-48.

36. Borjesson DL, Peroni JF. The regenerative medicine laboratory: facilitating stem cell therapy for equine disease. *Clin Lab Med*. 2011;31:109-23.
37. Ibrahim S, Saudenrs K, Kydd JH, Lunn DP, Steinbach F. Screening of anti-human leukocyte monoclonal antibodies for reactivity with equine leukocyte. *Vet Immunol Immunopathol*. 2007;119:63-80.
38. Carvalho AM, Alves ALG, Golim MA, Moroz A, Hussni CA, Oliveira PGG, et al. Isolation and immunophenotypic characterization of mesenchymal stem cells derived from equine species adipose tissue. *Vet Immunol Immunopathol*. 2009;132:303-6.
39. De Schauwer C, Meyer E, Van de Walle GR, Van Soom A. Markers of stemness in equine mesenchymal stem cells: a plea for uniformity. *Theriogenology*. 2011;75:1431-43.
40. Covas DT. A identificação das células-tronco. In: Zago MA, Covas DT. *Células-tronco: a nova fronteira da medicina*. São Paulo: Atheneu; 2006. p.87-92.
41. Müller M, Raabe O, Addicks K, Wenisch S, Arnhold S. Effects of non-steroidal anti-1 inflammatory drugs on proliferation, differentiation and migration in equine mesenchymal stem cells. *Cell Biol Int*. 2011;1:235-48.
42. Stewart MC, Stewart AA. Mesenchymal stem cells: characteristics, sources, and mechanisms of action. *Vet Clin North Am Equine Pract*. 2011;27:243-61.
43. Barreira APB. Implante autólogo de células mesenquimais no tratamento de tendinites induzida em equinos: avaliação clínica, ultra-sonográfica e imunoistoquímica [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2005.
44. Crovace A, Lacitignola L, De Siena R, Rossi G, Francioso E. Cell therapy for tendon repair in horses: an experimental study. *Vet Res Commun*. 2007;31:281-3.
45. Wilke MM, Nydam DV, Nixon AJ. Enhanced early chondrogenesis in articular defects following arthroscopic mesenchymal stem cell implantation in an equine model. *J Orthop Res*. 2007;25:913-25.
46. Nixon AJ, Dahlgren LA, Haupt JL, Yeager AE, Ward DL. Effect of adipose-derived nucleated cell fractions on tendon repair in horses with collagenase-induced tendinitis. *Am J Vet Res*. 2008;69:928-37.
47. Maia L, Souza MV. Considerações sobre a tendinite do tendão do músculo flexor digital superficial de equinos. *Rev Bras Med Equina*. 2009;5(26):24-34.
48. Smith RK, Korda M, Blunn GM, Goodship AE. Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. *Equine Vet J*. 2003;35:99-102.
49. Lacitignola L, Crovace A, Rossi G, Francioso E. Cell therapy for tendinitis, experimental and clinical report. *Vet Res Commun*. 2008;32:33-8.
50. Oliveira PGG. Implante autólogo de células mononucleares provenientes de medula óssea no tratamento de tendinites induzidas experimentalmente em equinos: avaliação a longo prazo – 120 dias [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia,

Universidade Estadual Paulista; 2008.

51. Del Blue M, Riccò 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 Commun.* 2008;32:51-5.
52. Maia L, Amorim RM, Alvarenga FCL, Alvarenga ML, Joaquim JGF, Lima Neto JF, et al. Uso de la terapia celular en el tratamiento de parálisis del nervio facial: Reporte de caso. In: *Anales del 2º Congreso Latinoamericano de Neurologia Veterinária*; 2009, Bogotá. Bogotá: Neurolatinvet; 2009. p.1-6.
53. Marfe G, Massaro-Giordano M, Ranalli M, Cozzoli E, Di Stefano C, Malafoglia V. Blood derived stem cells: an ameliorative therapy in veterinary ophthalmology. *J Cell Physiol.* 2012;227:1250-6.
54. Mambelli LI, Mattos RC, Winter G, Malschitzky E, Miglino MA, Kerkis I. Endometrosis treatment by equine adipose tissue-derived stem cells application. In: *Anais do 6º Congresso Brasileiro de Células-tronco e Terapia Celular*; 2011, Salvador. Salvador: Associação Brasileira de Terapia Celular; 2011. p.133.
55. Almeida FQ, Silva VP. Progresso científico em equideocultura na 1a década do século XXI. *Rev Bras Zootec.* 2010;39(supl esp):119-29.

**Recebido em: 09/02/2012**

**Aceito em: 13/11/2012**