

U. PORTO



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

Relatório Final de Estágio
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Terapias Regenerativas no Tratamento de Tendinite em Equinos

Ângela Cristina Carvalho Ferreira

Orientador: Dr. Tiago de Melo Silva Ramos Pereira

Co-Orientadores: Dr. Miguel Valdéz Vázquez

Dr. Manuel Torrealba

Porto 2011

U. PORTO



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

Relatório Final de Estágio
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Terapias Regenerativas no Tratamento de Tendinite em Equinos

Ângela Cristina Carvalho Ferreira

Orientador: Dr. Tiago de Melo Silva Ramos Pereira

Co-Orientadores: Dr. Miguel Valdéz Vázquez

Dr. Manuel Torrealba

Porto 2011

Resumo

O presente relatório é o resultado do culminar do estágio curricular do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, realizado nas áreas de Medicina Interna e Cirurgia de equinos.

O estágio decorreu entre Janeiro e Abril de 2011 e foi dividido em duas partes: uma, no *Hospital de Referencia La Equina*, sediado em Málaga, sob orientação do Dr. Miguel Valdés, uma referência a nível mundial; a outra, na Clínica *Hippiatrica* localizada em Loures, onde tive a oportunidade de acompanhar o trabalho de um veterinário de renome, com grande experiência nesta área, Dr. Manuel Torrealba.

A primeira parte, no *Hospital de Referencia La Equina*, teve a duração de 8 semanas e foi realizada nas áreas de Medicina Interna e Cirurgia de Equinos. Neste período tive a oportunidade de auxiliar a equipa do Hospital nas diversas actividades, como: consultas; cirurgias; urgências; acompanhamento de animais internados (aperfeiçoando técnicas de administração, colheitas de amostras e suporte); realização e interpretação de exames complementares de diagnóstico (radiografias, ecografias, análises hematológicas e bioquímicas, coprologias e endoscopias); discussão diária dos casos clínicos (Anexo 1). Nas seguintes oito semanas de estágio, acompanhei todo o trabalho desenvolvido na clínica *Hippiatrica*, nas áreas de Medicina Interna e especialmente Cirurgia de Equinos. Tive oportunidade de auxiliar a anestesia geral de equinos, participar nas consultas, cirurgias, acompanhamento de animais internados, realizar e interpretar exames de diagnóstico (radiografias, ecografias, endoscopias, hematologias e bioquímicas) e ainda acompanhar algumas consultas de ambulatório (Anexo 1).

Este estágio forneceu-me um complemento prático aos conhecimentos teóricos adquiridos, na área de equinos, ao longo dos cinco anos do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Permitiu-me conhecer a realidade actual da profissão de Médico Veterinário de equinos nas áreas de clínica e cirurgia. As duas experiências que vivi, quer em Espanha, quer em Portugal, apesar de bastante diferentes da realidade comum de clínica de ambulatório, permitiram-me perceber e experienciar um tipo de abordagem e metodologia clínica, que aliada aos avanços tecnológicos, providenciam um serviço veterinário de excelência.

Agradecimentos

Este trabalho resulta de esforço e dedicação, mas também, e principalmente, de um enorme apoio por parte de inúmeras pessoas a quem dirijo os mais sinceros agradecimentos.

Ao meu orientador de estágio, o Professor Tiago Pereira, um muito obrigada por toda a ajuda e apoio em todas as etapas do meu estágio, pelos e-mails prontamente respondidos e pela enorme paciência.

Ao meu co-orientador, o Dr. Miguel Valdéz, agradeço toda a disponibilidade, todos os conhecimentos transmitidos, toda a competência e experiência mostrada. A amizade, a boa disposição e o carinho com que fui recebida por ele e por toda a equipa. Tudo isto contribuiu imenso para um crescimento pessoal e para uma aprendizagem sólida durante o tempo de estágio no *La Equina*.

Ao Dr. Manuel Torrealba meu co-orientador, não posso deixar de agradecer tudo o que aprendi e tudo o que me foi proporcionado durante o estágio. Mas tenho principalmente que agradecer pela grande oportunidade e pelo reconhecimento do meu esforço, que foi resultado, sem dúvida alguma, do exemplo digno que me foi dado durante o meu tempo de estágio na *Hippiátrica*.

À Ana, ao João e à Cátia, aos mestres e estagiária, aos tantos momentos incríveis de trabalho, de cansaço, de divertimento, até de bricolage, que passamos juntos.

Aos fantásticos quatro, que me suportaram durante dias e noites de estudo, que riram e choraram comigo, que me obrigaram a ser veterinária e principalmente que, como grandes amigos que são, estiveram sempre presentes nos momentos mais difíceis.

A todos os meus amigos, cuja força e coragem que me transmitiram ao longo destes anos, foi a chave para chegar até aqui.

Por fim, e mais importante de tudo, um obrigado enorme á minha família. Aos meus pais, sem eles, sem o seu esforço, sem o seu apoio e amor, nunca teria sido possível realizar este Sonho. Muito Obrigada.

Lista de Abreviaturas

ADN – Ácido desoxirribonucleico

ADP – Adenosina Difosfato

ATP – Adenosina Trifosfato

COMP – Proteína Oligomérica da Matriz da Cartilagem

EGF – Factor de Crescimento Epidermal

GFG – Factor de Crescimento de Fibroblastos

HGF – Factor de Crescimento de Hepatócitos

IGF I – Factor de Crescimento Similar à Insulina tipo I

MEC – Matriz Extra Celular

MMP's – Metaloproteínases da Matriz

MSC's – Células Estaminais Mesenquimatosas

PBS – Solução Tamponada de Fosfato Salino

PDGF – Factor de Crescimento Derivado das Plaquetas

PGLA – Ácido polilactoglicolítico

PRP – Plasma Rico em Plaquetas

TFDS – Tendão Flexor Digital Superficial

TGF $\beta_{1/2}$ – Factor Transformador de Crescimento

TIMP'S – Inibidores Teciduais de Metaloproteínases

VEGF – Factor de Crescimento do Endotélio Vascular

Índice Remissivo

Resumo.....	iii
Agradecimentos	iv
Lista de Abreviaturas.....	v
Índice Remissivo.....	vi
I. Introdução.....	1
II. Revisão Bibliográfica	2
1. Anatomia e Fisiologia do Tendão	2
2. Patofisiologia da Tendinite.....	4
3. Reparação Tendinosa	5
4. Diagnóstico.....	6
4.1 Ecografia.....	7
4.2 Cintigrafia	8
5. Tratamento.....	10
5.1 Terapias regenerativas	11
5.1.1 Plasma Rico em Plaquetas (PRP)	12
5.1.1.1 Activação Plaquetária.....	13
5.1.1.2 Obtenção do PRP.....	14
5.1.1.3 Efeitos do PRP no tendão.....	16
5.1.2 Células Estaminais	17
5.1.2.1 Células estaminais embrionárias.....	18
5.1.2.2 Células Mesenquimatosas.....	18
5.1.2.2.1 Células Estaminais Derivadas do Tecido Adiposo	20
5.1.2.2.2 Células Estaminais Derivadas da Medula Óssea	21
III. Casos clínicos.....	22
1. Caso clínico nº 1	22
2. Caso clínico nº 2	24
3. Discussão	26
IV. Conclusão	27
V. Bibliografia	27
VI. Anexos	

I. Introdução

A evolução e a selecção dos equinos resultaram em membros simplificados distalmente, com ligamentos fortes e tendões que contribuem para a eficiência da locomoção através das suas propriedades elásticas (Dowling & Dart 2005). Com a intensificação da utilização dos equinos para diferentes actividades, principalmente as ligadas à área desportiva, ocorreu um aumento de afecções que acometem a espécie, particularmente doenças do aparelho locomotor. As lesões músculo-esqueléticas em equinos têm um papel importante no comprometimento e limitação do desempenho atlético (Maireles *et al* 2010).

A tendinite, inflamação do tendão e da inserção muscular tendinosa, representa uma perda financeira substancial nos desportos de competição equina, devido ao longo período de cicatrização e reabilitação do tendão, assim como ao grande risco de recorrência. Estima-se que após o retorno pleno ao trabalho esta recorrência ronde 43% a 93% (Robinson & Sprayberry 2009).

Durante a actividade física, forças repetitivas nas estruturas do tendão, predispõe-no a lesões que podem culminar em ruptura total ao parcial do mesmo (Robinson & Sprayberry 2009). A dinâmica natural do cavalo, as limitações anatómicas dos seus membros, assim como as características histológicas do tendão, são factores que desencadeiam facilmente danos (Gray 1994). A incidência de lesões em tendões e ligamentos nos cavalos de alta performance é de 11% a 46% (Robinson & Sprayberry 2009). O local mais frequente das lesões é a área entre o joelho e o boleto, dos tendões flexores do membro anterior, em especial o flexor digital superficial (Gray 1994; Stashak 2004).

As causas mais comuns para o aparecimento de tendinite são: o exercício intenso; trauma causado por piso duro ou desigual; estiramento; fadiga; má conformação; ligaduras ou bandagens demasiado apertadas (Gray 1994).

As técnicas terapêuticas correntes obtêm um sucesso limitado e os cavalos que recuperam tendem a recidivar e diminuir a performance desportiva. Perante a elevada taxa de insucesso do tratamento, assim como a grande incidência desta patologia, tornou-se necessário desenvolver outros tratamentos baseados na medicina regenerativa que visam melhorar a cicatrização tecidual (Cissel 2009).

II. Revisão Bibliográfica

1. Anatomia e Fisiologia do Tendão

O tendão é uma banda densa de tecido conjuntivo fibroso que actua como intermediário na inserção do músculo no osso (Stashak 2004 a). Além disso, os tendões são um tecido vivo e respondem a forças mecânicas alterando o seu metabolismo, bem como as suas propriedades estruturais e mecânicas. Não há dúvida que esta adaptação é efectuada pelas células, mas os mecanismos pelos quais as células sentem forças mecânicas e as convertem em sinais bioquímicos que conduzem finalmente a alterações adaptativas fisiológicas ou patológicas não são ainda completamente compreendidos (Wang 2006).

O tendão é composto por fibras longitudinais paralelas constituídas por moléculas de colagénio tipo I em disposição helicoidal. As fibras são rodeadas por uma matriz de proteoglicanos, glucoproteínas, fibras elásticas, iões e água, e organizam-se por sua vez em unidades denominadas de fascículos (Stashak 2004 a). Organizados em linhas entre estas fibras encontram-se os fibroblastos, que são responsáveis pela síntese de proteínas da matriz extracelular, pela produção de uma matriz de colagénio organizada e remodelação desta durante a cicatrização do tendão (Wang 2006; Gray 1994).

A composição da matriz extracelular, não colagénica, não é homogénea ao longo de todo o tendão, o que leva a presumir que reflecta os diferentes ambientes biomecânicos experimentados nas várias regiões do tendão. Agregados proteoglicanos são característicos de locais de compressão dos tendões sobre proeminências ósseas, por sua vez, algumas glucoproteínas são actualmente sugeridas como sendo sintetizadas como resposta à carga (Stashak 2004 a).

Entre as fibras de tendão, o endotendão, formado por tecido conjuntivo laxo, suporta os vasos sanguíneos, os nervos e os vasos linfáticos. Este endotendão é uma extensão do peritendão, também constituído por tecido conjuntivo laxo que reveste intimamente o tendão. Em volta do peritendão, o tendão encontra-se encerrado por uma bainha de tecido conjuntivo laxo vascularizado, o paratendão (Stashak 2004 a).

O paratendão é elástico e maleável e permite ao tendão mover-se para a frente e para trás no seu interior (Gray 1994). Nos locais de maior fricção, ou mudança de direcção, o tendão passa a ser revestido por uma bainha tendinosa, constituída por bainha fibrosa externa e membrana sinovial interna. Os ligamentos anulares são fortes bandas fibrinosas que mantêm a correcta posição do tendão em locais susceptíveis de mudança de direcção (Stashak 2004 a).

Os tendões possuem elevada resistência mas baixa elasticidade. A forma helicoidal das fibras de colagénio desaparece a níveis muito baixos de extensão e ruptura a níveis altos (Gray 1994).

Depois do ponto em que se esgota a sua capacidade elástica as características mecânicas tendinosas alteram-se, dando lugar a propriedades viscoelásticas e alterações estruturais aparentemente irreversíveis (Stashak 2004 a). (Fig. 1)

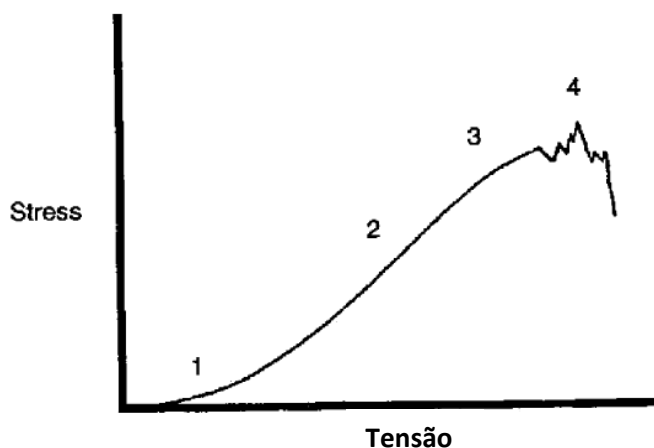


Fig. 1 – Curva simplificada de stress-tensão para o TFDS; 1-região de acomodação; 2- deformação linear; 3- deformação colagénio; 4- ruptura (adaptado de Dowling & Dart 2004)

Existem modelos matemáticos que assumem que as propriedades mecânicas dos tendões estão relacionadas com: elasticidade; viscosidade; plasticidade; fricção interna e tensão, e que uma curva de stress/tensão, representa a resposta *in vitro* instantânea do tendão à tensão (Dowling & Dart 2005). Nesta curva do tendão flexor digital superficial (TFDS) a região inicial de acomodação denomina-se de fase saliente e considera-se que esta é a região correspondente à abertura da estrutura em hélice das fibras (Stashak 2004 a), e corresponde a 3-4% de tensão (Dowling & Dart 2005). Quando se atinge o limite de esforço da fase saliente, as fibras que se encontram rectas estiram-se e o tendão começa a mostrar uma fase elástica quase linear (Stashak 2004 a). Esta fase encontra-se entre 3,6% e 10,6% de tensão (Dowling & Dart 2005). Novos aumentos da carga conduzem à deformação do colagénio, com alongamento e deslizamento fibrilar (Dowling & Dart 2005). Sabe-se que nesta fase o padrão helicoidal não se recupera depois da libertação da força têsil (Stashak 2004 a).

Estudos *in vivo* demonstram que a tensão sobre o TFDS a galope é de 11,5% a 16,6%, o que mostra que no seu esforço máximo o TFDS opera muito próximo dos seus limites fisiológicos (Dowling & Dart 2005).

É geralmente aceite que a resistência mecânica de um tecido é proporcional à sua área de corte transversal, no entanto, no TFDS de cavalos adultos dos membros posteriores, esta área de corte é inversamente proporcional ao teor de colagénio total, ao

peso seco de colagénio e à percentagem de fibras colagénias. Isto sugere que as variações de diâmetro se devem aos componentes não colagénicos e que o corte transversal não representa necessariamente a força de um tendão (Dowling & Dart 2005).

2. Patofisiologia da Tendinite

Num tendão normal existe em um equilíbrio entre os processos anabólicos e catabólicos. Sob condições de exercício fisiológico, os fibroblastos, dentro do parênquima do tendão, mantêm um equilíbrio homeostático entre a destruição tecidual e a produção de proteínas de substituição (Dahlgren 2007). Falhas na manutenção deste equilíbrio, devido a excesso de carga recorrente, levam à libertação de citoquinas que modulam a actividade celular (Sharma & Maffulli 2005). Este equilíbrio é mantido por dois grupos de proteínas: as metaloproteinases de matriz (MMPs) e os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs). As MMPs são uma família de enzimas proteolíticas que degradam a matriz extracelular (MEC) e facilitam a remodelação, tornando-se essenciais na manutenção e reparação tecidual. A actividade da MMPs é controlada em parte pelas TIMPs (Dahlgren 2007).

A etiologia da tendinite nos equinos é provavelmente causada por um conjunto de factores onde as influências mecânicas desenvolvem um papel central. Contudo factores adicionais, como a hipertermia e a má circulação sanguínea que resultam em hipoxia e radicais livres de oxigénio durante o exercício, são também relevantes (Dahlgren 2007).

As lesões tendinosas podem classificar-se como intrínsecas ou extrínsecas. As primeiras resultam de um golpe traumático ou laceração, que danifica fisicamente o tendão, enquanto as segundas estão associadas a uma condição degenerativa. Quando os níveis de exercício ultrapassam o limite de elasticidade do tecido, ou a natureza repetitiva da carga geram danos superiores à capacidade de reparação celular, temos manifestação clínica de inflamação (Dahlgren 2007).

Existem duas teorias acerca do mecanismo que desencadeia a lesão intrínseca do tendão. Uma refere-se à superestimulação causada por uma carga repetitiva que leva a microtraumas (Dahlgren 2007). Como resposta temos a libertação de PGE₂ e LTB₄ que por sua vez causam inflamação local e contribuem para a degeneração do tendão (Wang 2006).

A outra teoria baseia-se na subestimulação das células tendinosas, que conduz ao desenvolvimento de um padrão catabólico. Sobrecarga mecânica em áreas focais do tendão leva a que as fibras de colagénio não tenham capacidade de transmitir informação sobre a carga mecânica a outras células subjacentes. Isto desencadeia stress de privação, que está associado a aumento da apoptose, impedindo que a população celular mantenha a taxa de renovação (Dahlgren 2007).

Histologicamente, a lesão é caracterizada por uma ausência de células inflamatórias e uma pobre capacidade de regeneração, com degeneração intratendinosa do colagénio, desorientação das fibras, hiper celularidade, aumento de vascularização difusa e de glicosaminoglicanos interfibrilares (Sharma & Maffulli 2005).

3. Reparação Tendinosa

A biologia da cicatrização do tendão é dominada por duas teorias: a cura extrínseca e intrínseca. Na cura extrínseca acredita-se que o tendão não tem capacidade interna para curar a si próprio e portanto, requer a formação de aderências, a presença de células inflamatórias e fibroblastos e fornecimento de sangue extratendinoso. Na cura intrínseca, acredita-se que o tendão é curado pela proliferação de células de epitendão e endotendão assim como pelo suprimento de sangue intratendinoso (Lin *et al* 2004).

É plausível que a cura do tendão ocorra provavelmente como uma combinação de ambos os processos e seja dependente da localização do tendão, da magnitude do trauma tendíneo, da disponibilidade de fluido sinovial e do suprimento de sangue (Lin *et al* 2004).

A cicatrização tendinosa ocorre em três fases, que são uma versão especializada das descritas para a cicatrização de feridas em geral: (1) inflamação aguda; (2) proliferação e (3) remodelação (Dahlgren 2007). Estas fases sobrepõem-se e a sua duração pode variar muito devido à localização da lesão (Lin *et al* 2004).

A primeira fase da cicatrização do tendão ocorre quase imediatamente após a lesão do tendão. É caracterizada por sinais de inflamação como: dor, calor e edema e histologicamente, pelo influxo de células responsáveis por uma variedade de eventos necessários à progressão da cicatrização. Como consequência da destruição de vasos do endotendão, os eritrócitos acumulam-se no local da lesão formando um hematoma, que confere características hipoecóicas à lesão observada por ecografia (Dahlgren 2007). Em seguida, o coágulo resultante e a hemostasia activam uma cascata de vasodilatadores e plaquetas, bem como a liberação de substâncias pró-inflamatórias. As células inflamatórias são atraídas para o local da lesão e fagocitam agressivamente a necrose e os restos teciduais, assim como destroem o coágulo de sangue. Os macrófagos ajudam no recrutamento de novos fibroblastos e na libertação de factores de crescimento e promotores de angiogênese, para iniciar o crescimento das redes de capilares dentro da lesão (Lin *et al* 2004).

Com a resposta aguda celular a diminuir, a subsequente fase proliferativa (reparação) da cicatrização ganha força. Estas mudanças começam a ocorrer tão cedo quanto alguns dias após o ferimento e podem durar várias semanas ou meses. O

endotendão hipertrofia dramaticamente com o acúmulo de elementos vasculares e celulares. As células que povoam o endotendão são grandes, redondas ou ovais, e indiferenciadas, sugerindo que podem ser células progenitoras que migraram para o local da lesão, em resposta a factores quimiotáticos libertados imediatamente após a lesão (Dahlgre 2007). O tipo de células predominantes são os fibroblastos, juntamente com um menor número de macrófagos e mastócitos. Estudos de microscopia electrónica revelaram um aumento do retículo endoplasmático dos fibroblastos, o que é indicativo da síntese activa da matriz. As concentrações de ADN (ácido desoxirribonucleico) e colagénio tipo III atingem valores de pico durante todo o processo de reparação (Lin *et al* 2004). Nas quatro semanas seguintes à lesão, o colagénio tipo III aumenta para cerca de 66% do colagénio total quando comparado com a quantidade negligenciável existente num tendão normal. Às oito semanas, o colagénio tipo I é novamente mais que 90% do total. Essas mudanças provavelmente servem para otimizar a síntese de colagénio, numa fase em que é necessário obter rapidamente força tênsil devido à presença de um grande défice consequente da lesão (Dahlgre 2007).

Por volta das quatro semanas, a lesão é preenchida por tecido fibroso imaturo, semelhante a tecido de granulação, que não suporta mais do que exercício mínimo, como passo controlado (Dahlgre 2007).

Na última fase, a de remodelação, os fibroblastos diminuem de tamanho e abrandam a síntese da matriz e as fibras de colagénio começam a orientar-se longitudinalmente ao longo do eixo do tendão (Lin *et al* 2004). Assim que a cicatriz entra em maturação há uma conversão notável do tipo III de colagénio, com fibrilhas mais fracas e de menor diâmetro, pelo tipo I. Formam-se ligações químicas entre as moléculas de colagénio, que com o tempo vão maturando e aumentando a força tênsil do tendão. Esta fase, que pode durar desde as seis semanas até um ano, é crítica para o retorno à actividade atlética (Dahlgre 2007). Apesar da remodelação, as propriedades bioquímicas e mecânicas do tecido cicatrizado nunca correspondem às de um tendão intacto (Sharma & Maffulli 2005).

4. Diagnóstico

A avaliação clínica básica permanece como uma parte essencial no diagnóstico desta patologia. O diagnóstico de uma claudicação deve iniciar-se com um exame físico detalhado, que inclui a avaliação visual do animal, o exame estático e o exame dinâmico. Esta avaliação inicial visa identificar a provável região responsável pela claudicação, sendo confirmada posteriormente através de bloqueios anestésicos regionais. É comum os cavalos com tendinite apresentarem-se com sinais locais de tumefação, distensão, engrossamento e calor associados a uma claudicação (Stashak 2004 a). Posteriormente devem ser realizados

exames imagiológicos que permitam registrar e identificar a lesão. Este registo imagiológico orienta a instituição do tratamento mais adequado à lesão identificada e permite monitorizar a recuperação e a evolução da lesão ao longo do tempo, e consequentemente a eficácia do tratamento (Stashak, 2004 b).

Os métodos de diagnóstico imagiológico que normalmente são empregues no diagnóstico das lesões tendinosas e ligamentosas são: a radiografia, a ecografia, a cintigrafia, a tomografia computadorizada, a ressonância magnética e a termografia (Stashak, 2004 b).

4.1 Ecografia

A ecografia do tendão é um método de diagnóstico prático e não-invasivo que permite detectar lesões precoces e pequenas na sua estrutura, como inflamação subtil entre as fibras, alteração da forma e posicionamento, característicos do processo de tendinite (Rantanen & Mekinnon 1998 a).

A imagem é obtida com base em planos transversais e longitudinais convencionados, para facilitar a comunicação e interpretação das mesmas (Rantanen & Mekinnon 1998 b). Essas zonas são denominadas de 1A, 1B, 2A, 2B, 3A, 3B e 3C para os membros anteriores e de 1A, 1B, 2A, 2B, 3A, 3B, 4A, 4B e 4C para os membros posteriores (Anexo 2). O outro sistema de localização mede a distância em centímetros desde os pontos de referência até ao início da lesão. Parecendo ser o método mais rigoroso, facilita um acesso posterior à informação. Neste sistema, os pontos de referência são a face ventral do osso acessório do carpo nos membros anteriores e a margem proximal do calcâneo para os membros posteriores (Rose & Hodgson 2000).

A avaliação ecográfica dos tendões tem de ter em conta cinco parâmetros básicos: tamanho, forma, textura, posição e alinhamento das fibras. O conhecimento destes parâmetros num tendão saudável é essencial para uma melhor interpretação das lesões. A relação com as várias estruturas envolventes, como tecido subcutâneo, vasculatura, tecidos periligamentosos e peritendinosos e o contorno ósseo, deve também ser cuidadosamente avaliada (Rantanen & Mekinnon 1998 a).

A distância entre a superfície palmar/plantar e a superfície dorsal está normalmente aumentado nos casos de tendinites, contudo podemos ter perda da estrutura das fibras sem aumento do tamanho. A forma do tendão não é um dos parâmetros mais importantes, mas em conjunto com outros, principalmente com alterações do tamanho, pode oferecer informação para diagnóstico precoce de lesões subtis. O alinhamento das fibras é facilmente avaliado nos planos longitudinais e permite ver a integridade destas, a qualidade do

alinhamento e a evolução da reparação da lesão. A densidade reflecte o grau de ecogenicidade das fibras de colagénio, os fluidos inflamatórios, a presença de infiltrados celulares ou uma combinação de componentes teciduais, tudo isto dependendo da cronicidade da lesão. As alterações de posição dos tendões não são um achado comum e geralmente são de forma geral facilmente identificadas no exame físico (Rantanen & Mekinnon 1998 a).

Os achados mais comuns em lesões tendinosas são as alterações da forma visíveis em cortes transversais, existindo vários graus de anormalidades na densidade e textura das fibras, com aumentos focais ou totais das áreas de corte transversal e interrupção do padrão paralelo das fibras de colagénio (Rantanen & Mekinnon 1998 a).

As lesões são classificadas em quatro graus com base na severidade (Farrow 2006):

Grau 1 – estiramento, com perda quase imperceptível da ecogenicidade e pouca ou nenhuma alteração na textura;

Grau 2 – lesão moderada, com uma discreta perda da ecogenicidade e textura anormal;

Grau 3 – apresenta uma cavidade ou defeito, com padrão de reorganização no seu interior ausente ou muito subtil;

Grau 4 – completa ruptura ou avulsão.

4.2 Cintigrafia

A cintigrafia nuclear tornou-se uma ferramenta na investigação da dor e da baixa performance em cavalos, apesar das grandes limitações do conhecimento de alguns factores que influenciam a absorção de radiofármacos (Dyson 2007). Esta técnica é usada essencialmente para diagnóstico de problemas esqueléticos no cavalo, contudo, dependendo do radiofármaco usado e da sequência de imagens, a cintigrafia pode virtualmente ser usada para demonstrar processos patológicos em qualquer órgão (Archer *et al* 2007 a).

O princípio básico deste meio de diagnóstico é a detecção de raios γ emitidos por radionucleótidos. Quando um radionucleótido é ligado a um fármaco específico é possível criar-se uma representação gráfica de função fisiológica, forma, tamanho e posição do órgão alvo. A informação clínica obtida pelas imagens depende da bioquímica do fármaco, da sua interacção com o órgão alvo e do seu transporte através de outros órgãos e tecidos (Dyson *et al* 2007 a).

A informação principal obtida através das imagens é baseada nos processos fisiológicos do órgão alvo, isto é um princípio fundamental na interpretação das mesmas.

Não é a anatomia do órgão que está a ser investigada mas sim um processo fisiológico associado a este (Dyson *et al* 2007 a).

Contudo, como todos os meios de diagnóstico por imagem, a cintigrafia não deve ser usada em isolado, mas sim em conjunto com uma avaliação clínica geral e completa e outros meios de diagnóstico por imagem (Dyson *et al* 2007 a).

As principais indicações para a realização desta técnica são: monitorização da reparação, incapacidade de localizar o local da dor com bloqueios anestésicos, incapacidade de identificar a causa da dor por outros meios de diagnóstico, baixa performance por causa desconhecida (Dyson *et al* 2007 c).

Para a realização deste procedimento é necessária a prévia preparação do paciente: pesagem para determinar a dose de radiofármaco necessária; colocação de cateter IV, para administração dos radiofármacos; sedativos e diuréticos. Em imagens de casco aconselha-se a remoção da ferradura e o revestimento do casco com material impermeável e resistente, para evitar a possível contaminação com urina que contém radionucleótidos (Dyson *et al* 2007 b).

Os diuréticos são úteis, pois a principal via de excreção dos radiofármacos é a urinária, e estudos demonstram que o uso de furosemida na dose de 0.1g/kg uma hora e meia depois da injeção dos radiofármacos, reduz para 50% a dose de radiação 24h depois (Dyson *et al* 2007 b).

Para diagnóstico de patologias musculoesqueléticas temos três fases de imagens que podem ser obtidas, a vascular, a de tecidos moles e a de osso (Dyson *et al* 2007 b).

Imagens vasculares são obtidas quase imediatamente após a injeção dos radiofármacos. O tempo entre a administração e o aparecimento na vasculatura dos membros é em média 43 segundos. As imagens de tecidos moles podem ser obtidas 2 a 20 minutos após a injeção, dependendo da simetria da vasculatura e corrente sanguínea. Nesta fase, por vezes lesões activas de osso levam a uma ligação precoce do fármaco a este, diminuindo a sensibilidade das imagens de tecidos moles. Esta fase representa a distribuição do radiofármaco na rede capilar e fluido extracelular. As imagens de osso idealmente são obtidas entre as 2,5 e as 4 horas pós injeção (Dyson *et al* 2007 b).

O fármaco ideal para lesão em tecidos moles é o TC-pertechnetato, pois não se liga prematuramente a lesões ósseas permitindo uma melhor qualidade de imagem (Dyson *et al* 2007 c).

A aquisição e interpretação de imagens têm implicações importantes na avaliação da validade da cintigrafia como uma ferramenta de diagnóstico (Archer *et al* 2007 b).

O número e a localização das imagens obtidas deve ser baseado nos achados clínicos e história. A especificidade da cintigrafia pode ser aumentada com a realização de

duas imagens perpendiculares, em vez de uma, auxiliando a localização tridimensional da lesão (Archer *et al* 2007 b).

Os princípios básicos, como o tamanho da matriz, tipo de imagem e intervalo de tempo ou número de contagens de raios γ emitidos, necessários para obter as imagens devem ser entendidos de modo a produzir diagnósticos e informações estatisticamente válidas (Dyson 2007).

A avaliação das imagens pode ser qualitativa ou quantitativa. A avaliação qualitativa das imagens pode ser altamente variável entre os observadores e pode ser afectada pela apresentação em cores diferentes e por procedimentos pós observação. Por convenção as imagens são inicialmente avaliadas numa escala contínua de cinzentos. A avaliação quantitativa das cintigrafias permite a captação de diferenças mais subtis que podem ser perdidas por uma avaliação qualitativa. Nesta avaliação, faz-se a contagem de raios γ de regiões de interesse que podem ser comparadas com as contagens obtida no membro contralateral ou numa região separada (Archer *et al* 2007 b).

Existem contudo variações na absorção de radiofármacos em animais saudáveis. O aumento da absorção está relacionado com o aumento da actividade osteoblástica, não estando necessariamente relacionado com o aumento da actividade osteoclástica. Esta condição, origina locais de intensa absorção de radiofármaco em locais não associados a dor e consequente claudicação. São exemplos disso, as exostoses do II e IV metacarpo ou metatarso, não dolorosas e clinicamente quiescentes, a face dorsoproximal da diáfise da primeira falange e por vezes a face próximocranial da tibia (Dyson 2007).

5. Tratamento

O tratamento de lesões de tendão causadas por sobre uso é um importante desafio para os veterinários, donos e treinadores. Nos últimos anos, houve uma crescente sensibilização para a detecção dos primeiros sinais de lesão e um melhoramento das técnicas de diagnóstico e tratamento, mesmo assim a incidência desta patologia permanece elevada (Robinson & Sprayberry 2009 a).

Tradicionalmente o tratamento baseia-se na abordagem clínica e cirúrgica, com a finalidade de diminuir a inflamação e prevenir mais danos no tendão, libertando a tensão do tendão danificado e aumentando a vascularização na lesão. Contudo, houve poucos avanços médicos que diminuíssem o risco de recorrência ou que melhorassem o prognóstico quanto à recuperação total (Robinson & Sprayberry 2009 a).

A terapia anti-inflamatória é crítica para a redução do dano tecidual que ocorre após a lesão, a administração de anti-inflamatórios não esteróides é recomendada nos primeiros 1 a 10 dias, dependendo da severidade da lesão. A duração do tratamento deve ser

minimizada pois a maioria dos anti-inflamatórios não esteróides têm efeitos prejudiciais na cicatrização da ferida. As doses iniciais devem ser altas, mas devem ser reduzidas para a dose mínima efectiva e descontinuados assim que possível. Os anti-inflamatórios tópicos também podem ser usados em conjunto, de forma a diminuir a dose e como tal o risco de toxicidade da terapia sistémica (Robinson & Sprayberry 2009 a).

Um pilar importante do tratamento da tendinite é a terapia com frio, que pode incluir todas ou uma combinação de gelo, unidades terapêuticas comerciais de frio ou duches de água fria. Colocar o cavalo com o membro afectado em água fria é a melhor forma de transferir calor do interior deste e arrefecer as estruturas mais internas. As unidades comerciais variam na sua eficácia, as mais recentes combinam ciclos de compressão, que promovem a drenagem linfática, com a circulação de água fria, otimizando o arrefecimento dos tecidos mais internos (Robinson & Sprayberry 2009 a).

A colocação de ligadura é importante na fase aguda da lesão para controlar o edema e providenciar suporte e deve ser trocada no mínimo diariamente para permitir a reaplicação da terapia de frio (Robinson & Sprayberry 2009 a).

O controlo do exercício é fundamental para a recuperação, os cavalos devem ser numa fase inicial sujeitos a descanso total com aumentos de exercício cuidadosamente controlados, determinados pela avaliação clínica e ecográfica da lesão. Natação e terapia com oxigénio hiperbárico são potenciais terapias adjuntas (Robinson & Sprayberry 2009 a).

5.1 Terapias regenerativas

O Principal desafio do tratamento das tendinites está relacionado com o período necessário para a reparação tecidual que, em associação com as actuais terapias, pode prolongar-se por meses ou mesmo anos (Meireles *et al* 2010).

Devido às actuais limitações dos tratamentos correntes, tem havido na última década um crescente interesse pelo uso de terapias biológicas, que visam melhorar o prognóstico das lesões tendinosas (Robinson & Sprayberry 2009 b).

As terapias regenerativas podem ser consideradas uma estratégia para a reparação, substituição e reforço de forma biológica do tecido danificado (Sutter 2007). Os seus principais objectivos são promover a regeneração em vez da reparação do tendão, e recriar uma matriz o mais próxima possível da existente num tendão saudável. Quanto maior for a semelhança estrutural, bioquímica e biomecânica entre o tecido regenerado e o tecido normal, maior a probabilidade do tendão suportar actividade atlética rigorosa (Clegg 2008).

Actualmente existem várias opções de tratamento regenerativo, cuja maioria dos seus fundamentos foram extrapolados de outras espécies (*in vivo*), de estudos *in vitro* e teoria (Clegg 2008). Estas opções terapêuticas podem ser divididas em duas categorias. A

primeira é a administração de factores de crescimento ou substâncias que os contenham, directamente na lesão, na tentativa de promover uma reparação mais fisiológica, como o plasma rico em plaquetas, o factor transformador de crescimento β_1 e o factor de crescimento similar à insulina tipo I (Clegg 2008; Fortier 2008). A segunda consiste na administração de células no local da lesão, com o intuito de levar à sua diferenciação ou da população residente, em células com um fenótipo mais relevante para a regeneração do tendão. São exemplo disso as células estaminais embrionárias e as células estaminais adultas (Clegg 2008; Ribitsch 2010). Dentro das células estaminais adultas existem várias fontes, a medula óssea, o sangue periférico, o cordão umbilical, o tecido adiposo, os tecidos mesenquimatosos sólidos, a membrana sinovial, o ligamento periodontal e a pele (Ribitsch 2010).

5.1.1 Plasma Rico em Plaquetas (PRP)



Fig. 1 - Obtenção de PRP (cedido por *Hippiatrica*).

As plaquetas desenvolvem um papel importante na cicatrização de tecidos pois secretam factores de crescimento e outras moléculas intervenientes neste processo (Ramirez 2006).

O uso de PRP foi pela primeira vez reportado em 1997 por Whittman e seus colaboradores, para a estimulação da regeneração tecidual em cirurgias orais (Sutter 2007).

O PRP contém diversos factores de crescimento que são importantes para a restauração do tecido devido ao seu efeito mitogénico, quimiotático e neovascular (Sutter 2007). Os factores de crescimento são proteínas que regulam o metabolismo celular, que além do seu efeito anabólico, regulam ainda o catabolismo e as citoquinas da degradação, como as interleucinas e metaloproteínases da matriz (Fortier 2009).

A administração intralesional é a via mais comum de aplicação de factores de crescimento e células estaminais, e tem como objectivo minimizar o dano nos tecidos subjacentes à lesão e melhorar a precisão da colocação da suspensão celular. A ecografia é usada em simultâneo para auxiliar a deposição no local, obtendo-se uma imagem transversal com o transdutor e agulha posicionados perpendicularmente, consegue-se uma localização precisa da lesão. O volume a administrar é subjectivo e depende do tamanho da lesão e do volume de suspensão disponível. O objectivo nas lesões agudas é preencher o defeito da melhor forma possível, sem separar as fibras o que causaria um dano adicional. Nas lesões mais crónicas este objectivo é mais difícil de alcançar e muitas vezes o PRP tem de ser injectado sobre pressão (Sutter 2007).

As injeções de PRP não devem ser administradas antes do dia 10-14 após a lesão. Até lá deve ser ministrado tratamento de suporte como descanso, terapia com frio, anti-inflamatórios não esteróides e ligadura compressiva. Este intervalo de tempo permite a organização da lesão, facilitando a determinação da extensão e do local da mesma (Sutter 2007).

No exame de revisão, realiza-se avaliação ecográfica da lesão e do grau de dor. Se o cavalo não tem uma melhoria de pelo menos 50% na dor, e o tendão não tem um progresso de pelo menos 50% nas secções transversal e longitudinal, então administra-se uma segunda injeção de PRP (Fortier 2009).

Apesar da terapia aplicada ao cavalo, um controlo rigoroso do exercício com a realização de ecografias regulares é indispensável (Sutter 2007). Fortier *et al* (2009) propôs o seguinte programa de treino na fase de reabilitação:

- Dia 0-14 – Descanso em Boxe, administração de PRP
- Dia 14-30 – Descanso em Boxe com passeio a passo, exame ecográfico dia 30
- Dia 30-90 – Passo montado. Dois a três períodos de trote por semana, ecografia no dia 60 e 90
- Dia 120-150 – Adicionar períodos de galope leve todas as semanas
- Dia 150-180 – Aumentar períodos de galope. Ecografia de revisão no dia 180
- Dia 180-240 – Galopes condicionados.

O prognóstico de retorno à função atlética é variável e depende primariamente do grau de lesão, mas também da idade do cavalo, da conformação e do fim a que este se destina (Fortier 2009).

5.1.1.1 Activação Plaquetária

A capacidade de libertação de factores de crescimento pelas plaquetas torna-as numa fonte natural que pode ser usada como terapêutica para acelerar processos de cura (Anitua *et al* 2004).

A exposição das plaquetas, num tecido danificado, a agentes fisiológicos (trombina, tromboxano, colagénio, adenosina difosfato, factor activador de plaquetas, serotonina e epinefrina) leva à sua alteração morfológica (Maia *et al* 2009), a transformações internas, à sua desgranulação, à formação de coágulo e a retracção (Ramirez 2006).

A expressão cinética é diferente para cada tipo de grânulo existente nas plaquetas, primeiro há a desgranulação dos grânulos α . Estes grânulos contêm várias moléculas como citoquinas e factores de crescimento, que são importantes para todas as funções plaquetárias, como a formação de trombo, a modulação inflamatória e a síntese da matriz

extracelular, entre outras. Os grânulos α contêm principalmente sete factores de crescimento implicados na reparação tecidual: o factor de crescimento derivado das plaquetas (PDGF); o factor transformador de crescimento β_1 e β_2 (TGF- $\beta_{1/2}$); o factor de crescimento de fibroblastos (FGF); o factor de crescimento epidermal (EGF); o factor de crescimento do endotélio vascular (VEGF); o factor de crescimento similar á insulina tipo 1 (IGF-I) e factor de crescimento de hepatócitos (HGF) (Ramirez 2006).

PDGF – É um poderoso quimiotático e estimulante da proliferação celular. Estimula a angiogénese e regula a expressão da MMP's e do seu inibidor natural (TIMP's) na fase tardia da remodelação. Produz proliferação fibroblástica, migração epitelial, extensiva vascularização e infiltração de neutrófilos (Ramirez 2006).

TGF- $\beta_{1/2}$ – são os factores de crescimento mais representativos nas plaquetas. São moléculas pleiotrópicas que podem estimular ou inibir a proliferação, diferenciação, motilidade, adesão ou morte celular, dependendo do estado de desenvolvimento e do tipo das mesmas. Tem um papel importante na produção da MEC uma vez que regula a expressão do colagénio fibrilhar e da fibronectina (Ramirez 2006).

EGF – Induz a proliferação, diferenciação e motilidade celular- É altamente expresso na margem das lesões promovendo a re-epitelização (Ramirez 2006).

VEGF – Promove a vascularização tecidual, facilitando a chegada de células inflamatórias e reparativas (Ramirez 2006).

FGF – Induz a proliferação de fibroblastos, tem poderosas propriedades angiogénicas e juntamente com o TGF- β controla a deposição da MEC (Ramirez 2006).

IGF-I – Estimula a diferenciação e a síntese da MEC (Ramirez 2006).

HGF – Péptido com poderosos efeitos angiogénicos (Ramirez 2006).

Secundariamente são activados os grânulos densos, que contêm ATP, ADP, cálcio, fósforo e serotonina. O ADP induz a migração plaquetária e em combinação com a serotonina produz contracção das artérias lesionadas. Por último, os grânulos lisossomais libertam as suas enzimas hidrolíticas e proteolíticas (Ramirez 2006).

5.1.1.2 Obtenção do PRP

Concentrados de plaquetas podem ser obtidos por três métodos gerais: Tubos estéreis (manual); *buffy coat* (semi-manual) e aférese (automático). As vantagens do método manual são o seu baixo custo e os requisitos técnicos mínimos (Monteiro 2008). Contudo requer um maneio e preparação totalmente assépticos, de forma a evitar contaminação bacteriana. Das três, esta técnica, é a que obtém menor concentração de plaquetas (Ramirez 2006).

O sistema de aférese requer alta tecnologia e pessoal experiente, não sendo por isso uma técnica aplicável a pequenas clínicas. A quantidade de sangue necessária em comparação com outros métodos é elevada (>450 ml), mas é um método com baixo risco de contaminação (Ramirez 2006).

Na técnica de *buffy-coat* obtemos elevadas concentrações de plaquetas com baixo risco de contaminação, requerendo menor tecnologia que a aférese. Ambas as técnicas resultam numa elevada concentração de leucócitos (Ramirez 2006).

Os métodos de obtenção visam separar o sangue em plasma, *buffy coat*, e fracção de células vermelhas. Dependendo do método usado obtêm-se diferentes concentrações de plaquetas, de células brancas, de células vermelhas e de factores de crescimento (Sutter 2007).

Maia *et al* (2009) usaram o seguinte método manual para obtenção do PRP – retiraram 81 ml de sangue da jugular de cada cavalo com 18 tubos vacutainer com 3,8% de citrato de sódio. Os tubos foram centrifugados durante cinco minutos a 120g, e em seguida rejeitou-se 1,5ml de plasma da superfície de forma a obter maior concentração de PRP na segunda centrifugação. Do plasma obtido na segunda centrifugação, 20ml foram colocados em dois tubos secos estéreis de 10ml e posteriormente centrifugados durante cinco minutos a 473g. Após este processo o plasma ficou dividido em duas fases, um sobrenadante líquido (plasma pobre em plaquetas) e o restante, o PRP. O plasma pobre em plaquetas foi descartado e 2,5ml de PRP reservados num tubo sem anti-coagulante, com adição de 125µmol de solução de cloreto de cálcio (0.0125mol/L) para activação plaquetária. Colocou-se na estufa a 22°C durante duas horas para estimular a desgranulação das plaquetas. Por fim realizaram uma nova centrifugação, a 1,720g durante oito minutos, para obtenção de um PRP homogéneo.

Uma vez que o PRP é activado há uma libertação inicial de factores de crescimento pré-sintetizados, que se inicia dez minutos após a formação do coágulo. Aproximadamente 95% destes factores são libertados na hora seguinte e após esta libertação inicial as plaquetas continuam a síntese e secreção de proteínas durante cinco a dez dias, ou durante a sua duração de vida (Sutter 2007).

Estudos *in vitro* mostram que existe uma correlação positiva entre a concentração de plaquetas e a de factores de crescimento e que, adicionalmente, a concentração de plaquetas está altamente correlacionada com a expressão da MEC. Contudo, como os factores de crescimento ligam-se a receptores das células, quando estes se encontram ocupados são interiorizados pela célula evitando crescimento e proliferação celular descontrolado. Portanto, uma vez que a população de receptores de factores de

crescimento esteja saturada, a adição de mais factores de crescimento não oferece benefício adicional (Fortier 2009).

Actualmente ainda não se sabe qual a concentração ideal de PRP para o tratamento de tendinites (Fortier 2009), mas pesquisas clínicas e científicas sugerem que uma concentração de plaquetas quatro a cinco vezes superior aos valores fisiológicos é a desejável (Sutter 2007). Segundo Anitua *et al* 2004, (citado por Maia *et al* 2009) concentrações superiores a 300 000 plaquetas/ μ L são suficientes para a preparação do PRP. A maximização da concentração de plaquetas, pretendida pelos métodos de obtenção de PRP, leva também a um aumento da concentração de leucócitos (Sutter 2007), que está altamente correlacionada com um aumento de mediadores inflamatórios como as MMP's (Fortier 2009). A concentração de leucócitos deve ser a mínima possível de forma a maximizar a síntese da matriz e minimizar a inflamação após a administração (Fortier 2009).

O PRP pode ser congelado a -20°C durante 6 meses sem perder a actividade dos factores de crescimento, contudo, congelamentos e descongelamentos sucessivos levam a perda da actividade das proteínas (Fortier 2009).

5.1.1.3 Efeitos do PRP no tendão

Depois da lesão tendinosa a síntese de colagénio tipo III aumenta e este forma ligações interfibrilares irregulares de forma a contribuir para uma estabilidade inicial, enquanto o colagénio tipo I aumenta gradualmente para restaurar a arquitectura normal do tendão. O tecido fibroso originado após uma lesão de tendão é composto por colagénio tipo III anormalmente alto e por um padrão de alinhamento das fibras desorganizado e não linear. As características biomecânicas pobres deste tecido cicatricial e a baixa taxa de reparação são responsáveis pela grande reincidência de tendinite. O uso de PRP resulta numa diminuição de colagénio tipo III face a um aumento do tipo I, o que é benéfico para a reparação do tendão (Fortier 2009).

Num estudo realizado por Maia *et al* em que se avaliou histologicamente o TFDS, após uma tendinopatia induzida por colagenase, mostrou que os tendões tratados com PRP mostravam, 36 dias depois do tratamento, melhor organização e uniformidade dos tecidos que o grupo controle.

Outro estudo realizado em 72 cavalos de desporto com lesão no TFDS, tratados com injecções repetidas de PRP, mostrou que o retorno à performance foi de 75,7-79,5% versus 40-50% relatados, e que a percentagem de reincidência foi 20-24% menor do que a do grupo controle (43-93%) (Abelanett & Prades 2009). Meirelles *et al* (2010) num estudo com uma única injecção de PRP em cinco equinos obteve, duas semanas após injecção, redução da claudicação, edema, sensibilidade e do calor local. Três semanas depois do

tratamento, na avaliação ecográfica, dois dos equinos, com menor grau de lesão inicial, apresentavam melhoria na ecogenicidade e paralelismo das fibras tendíneas. Outros dois animais, com lesão mais grave, apresentaram resultados semelhantes, cinco semanas após o tratamento.

Bosch *et al* (2009) usou um método de análise computadorizada de imagens de ecografia de lesões de TDFS após tratamento com PRP. Este método permitiu detectar diferenças significativas entre os grupos (tratados com PRP e placebo) nas diferentes fases de reparação. Na fase final, nos animais tratados, 80% dos pixels mostravam correcto alinhamento das fibras comparando com 60% do grupo placebo.

5.1.2 Células Estaminais

A maioria dos tecidos possuem uma subpopulação de células precursoras, que são usadas para repor as perdas celulares por renovação natural ou dano tecidual. O local exacto destas células no tendão não é conhecido, mas residem mais provavelmente no endotendão, entre os fascículos de colagénio e a vasculatura adjacente. Apesar de ser possivelmente verdade para um tendão jovem em desenvolvimento, ainda não foi provado que exista num tendão adulto tal população celular. Isto pode explicar o porquê da componente de reparação do tendão ser tão limitada (Richardson *et al* 2007).

As células estaminais são células indiferenciadas que têm a capacidade de se auto renovar e diferenciarem em linhagens celulares específicas (Robinson e Sprayberry 2009 b).

O tratamento de tecidos lesionados com células estaminais consiste em aplicar as células na lesão, onde estas se vão enxertar, e diferenciar em fibroblastos específicos do tecido, que por sua vez produzem uma matriz apropriada. Contudo, esta teoria básica da sua diferenciação *in vivo* é uma excessiva simplificação e provavelmente tem em conta apenas uma parte da interacção que ocorre entre as células e o tecido danificado (Sutter 2007).

Com base no tecido de origem, as células estaminais podem ser classificadas em dois tipos: células estaminais embrionárias e células estaminais adultas. As células estaminais embrionárias derivam da massa de celular indiferenciada da pré-implantação do blastocisto, são totipotentes, ou seja, capazes de se tornarem qualquer tipo de célula e assim capazes de criar um organismo inteiro. As células estaminais adultas incluem as hematopoiéticas e as mesenquimatosas e podem ser isoladas a partir de tecidos com origem na mesoderme, como: medula óssea, músculo e tecido adiposo. As hematopoiéticas produzem a descendência das células sanguíneas da linha linfóide e mielóide. As células estaminais mesenquimatosas (MSC's) têm capacidade de diferenciação em tipos celulares

dos tecidos da mesoderme, tais como: osso; músculo; cartilagem; tecido adiposo; tendão e ligamento (Robinson e Sprayberry 2009 b).

As células estaminais têm um enorme potencial de acelerar e promover a cicatrização tecidual e as MSC's são actualmente usadas para tratar lesões na cartilagem e tendão de equinos (Paris & Stout 2010).

5.1.2.1 Células estaminais embrionárias

Estas células oferecem um grande potencial por serem totipotentes, mas com a grande desvantagem de serem obrigatoriamente de utilização alogénicas, apesar de terem grande tolerância imunológica, e de estarem associadas ao risco de formação de teratoma (Richardson *et al* 2007). Por este motivo, estas células não são passíveis de serem usadas em transplante directo. Contudo, encontram-se já descritas as condições de cultura para a diferenciação directa de células estaminais humanas e de ratos em cartilagem e tendão (Paris & Stout 2010).

5.1.2.2 Células Mesenquimatosas

O transplante de MSC's em vários tecidos esqueléticos danificados mostrou a sua capacidade de promover a reparação dos mesmos (Richardson *et al* 2007).

No tendão estas células promovem a sua reparação através de dois mecanismos: a diferenciação em células produtoras da MEC e pela produção de factores de crescimento e citocinas que fazem recrutamento de células estaminais endógenas e têm efeitos anabólicos nas células recentemente recrutadas, nas células maduras já existentes e nas células estaminais implantadas (Robinson e Sprayberry 2009 b).

Outro mecanismo adicional das células estaminais é o seu comportamento de 'homing', que é a sua capacidade de migrar para os tecidos lesionados após administração intravenosa, intralesional ou perilesional. Isto deve-se ao sinal químico das citocinas libertadas no local da inflamação, que guia a migração das células estaminais (Robinson e Sprayberry 2009 b).

Estudos sobre a cultura de MSC's, em matrizes 2D e 3D, mostram que estas podem ser induzidas a sintetizar matrizes com algumas das características da MEC do tendão. Contudo, a demonstração da diferenciação em tenócitos tem sido dificultada pela ausência de um marcador definitivo. Os tenócitos são descritos como tendo morfologia de fibroblastos, logo não podem ser identificados apenas pela aparência. O colagénio tipo I é a primeira proteína sintetizada por estas células, mas estas características também não os distinguem dos fibroblastos capazes de produzir tecidos conjuntivos. A síntese de outras

proteínas, como a tenomodulina, é mais específica de tendão, contudo, não é totalmente exclusiva deste (Richardson *et al* 2007).

A expansão *ex vivo* é um método de obtenção de um grande número de células estaminais para implantação no tecido. Na Europa a empresa Vet-cell® providencia este serviço (Anexo 3). Contudo, o uso de células estaminais manipuladas medicamente envolve desvantagens, o meio de cultura base contém soro de bovino, que pode originar uma reacção imune devido às proteínas estranhas. Além disso, as células por norma perdem multipotência e a capacidade de auto renovação e “*homing*” (Sutter 2007).

Existem outras opções de tratamento com células estaminais que previnem as desvantagens da manipulação médica. Pode-se isolar a fracção estromal de medula óssea ou tecido adiposo com mínima manipulação, obtendo-se uma população celular heterogénea, que contém não só um concentrado de células progenitoras, mas também outros tipos celulares, com benefício adicional na reparação tecidual (Sutter 2007).

O aspirado concentrado de medula óssea é uma opção relativamente nova, que usa a tecnologia de obtenção de PRP. A densidade das células nucleadas, que inclui as células progenitoras, permitem-nas serem capturadas no *buffy coat* junto com as plaquetas. Teoricamente, esta terapia alia os benefícios do PRP com os das células estaminais (Sutter 2007).

Foram implantadas MSC's em defeitos cirúrgicos de tendões em múltiplas experiências *in vivo* com resultados positivos. Segundo um estudo de Young *et al* (1998, citado por Richardson *et al* 2007) a implantação de MSC's, semeadas numa estrutura biodegradável, num defeito de 1cm no centro do tendão de Aquiles de um rato, levou a regeneração com formação de um tecido tipo tendão ao fim de 12 semanas (Richardson *et al* 2007).

A regeneração tecidual requer quatro elementos sinérgicos: uma estrutura para acomodar as células, promover protecção e nutrição; um conjunto apropriado de factores anabólicos que encorajem a formação da MEC; um ambiente mecânico apropriado que forneça sinais organizacionais e uma fonte de células. Estudos demonstraram que a implantação de células autólogas com um esqueleto leva a uma regeneração tendinosa com melhores características histológicas e força biomecânica do que um esqueleto acelular isolado (Richardson *et al* 2007).

Apesar de existirem vários locais de recolha de células estaminais em cavalos, o uso clínico é limitado essencialmente a duas fontes, a medula óssea e o tecido adiposo, devido á fácil recuperação à mínima morbidade do dador e à fácil recolha (Richardson *et al* 2007).

5.1.2.2.1 Células Estaminais Derivadas do Tecido Adiposo

O tecido adiposo é uma fonte alternativa promissora de células estaminais adultas, com um fenótipo similar às isoladas de aspirados de medula óssea. O tecido adiposo tem a mesma origem mesenquimatosa que a medula óssea e o seu estroma de suporte pode ser facilmente digerido para obter a sua fracção celular (Robinson & Sprayberry 2009 b).

Esta fracção celular tem recebido uma crescente atenção por parte dos investigadores devido à sua relativa abundância, fácil aquisição e alta capacidade proliferativa com grande potencial de diferenciação em varias linhas celulares (Carvalho *et al* 2009). Possui uma população heterogénea que inclui células epiteliais, endoteliais, pré-adipócitos, e algumas células progenitoras (Carvalho *et al* 2009). A fracção total de células estaminais estima-se ser de 1 a 3% do total de células nucleadas e este valor é 100 a 300 vezes superior ao encontrado na medula óssea (Robinson & Sprayberry 2009 b).

A colheita do tecido adiposo pode ser feita na região dorsal dos músculos glúteos e na base da cauda, sob sedação e anestesia local em 'L' invertido. Realiza-se uma incisão de 10cm de comprimento paralela á coluna vertebral permitindo visualizar ao tecido adiposo entre a pele e a musculatura. Colhe-se aproximadamente 5ml de tecido e coloca-se num frasco cónico contendo o meio Roswell Park Memorial Institute – 1640 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) até a amostra ficar submersa. A amostra é posteriormente submetida a sucessivas lavagens com solução tamponada de fosfato salino (PBS) em tubos Falcon estéreis. Para isolar as células a matriz extracelular é submetida a separação mecânica com lâmina de bisturi nº15 e depois digerida com colagenase I 0,02% a 37°C durante 12 horas. Posteriormente, a solução é centrifugada a 260g durante 10 minutos e o sobrenadante é aspirado e homogenizado para posterior centrifugação. As células desta fracção são cultivadas em meio Dulbecco's Eagles modificado com soro fetal bovino (Carvalho *et al* 2009).

A implantação das células faz-se após diluição das mesmas em soro autólogo obtido por recolha de sangue na jugular e armazenado em tubo sem anti-coagulante. A administração deve ser ecoguiada, depositando-se as células com uma agulha de 21G no centro da lesão (Carvalho *et al* 2011).

Um estudo realizado por Carvalho *et al* (2011) mostra uma melhoria significativa na histologia das lesões tendinosas induzidas por colagenase em oito éguas tratadas com células estaminais derivadas do tecido adiposo. As fibras do tendão apresentam maior organização e menor infiltrado inflamatório e a análise imunohistoquímica mostra um aumento da expressão de colagénio tipo I, em relação ao grupo controle.

Outro estudo conduzido pela Universidade de Cornell, usando o tratamento comercial da Vet-Stem ®, mostra também uma melhoria histológica significativa em

tendinites induzidas por colagenase, 6 semanas depois do tratamento com células estaminais derivadas de tecido adiposo, em relação ao grupo controle (Sutter 2007).

5.1.2.2.2 Células Estaminais Derivadas da Medula Óssea

O aspirado de medula óssea é historicamente a fonte mais popular de MSC's no cavalo (Robinson & Sprayberry 2009 b).

A medula óssea contém células aderentes com morfologia tipo fibroblasto, que crescem em colónias e têm a capacidade para se diferenciarem em células que se assemelham a osso e cartilagem. Estas células têm ainda capacidade de se manterem em cultura durante 20-30 duplicações de população sem perderem a capacidade de diferenciação, o que evidencia as suas características de células estaminais (Croft & Przyborski 2004).

O estroma da medula óssea possui uma mistura de vários tipos de células e células progenitoras em vários estados de diferenciação, incluindo fibroblastos, adipócitos e células osteogénicas. As MSC's são isoladas do aspirado de medula óssea por adesão preferencial ao tecido plástico da cultura, ou por centrifugação diferencial para obter a fracção nucleada (Croft & Przyborski 2004).

O rendimento celular do aspirado de medula óssea é baixo (0.001 a 0.01% de células), resultando na necessidade de expansão *in vitro* (Robinson & Sprayberry 2009 b). As condições requeridas para tenogénese *in vitro* são pouco descritas e normalmente são injectadas MSC's directamente na lesão, depois de expansão em meio de cultura semelhante ao descrito acima para o tecido adiposo, onde as células aderem e proliferam formando aglomerados de células tipo fibroblastos (Paris & Start 2010; Raheja *et al* 2011; Krampera *et al* 2006).

Para a reconstrução de qualquer tipo de tecido não são apenas necessárias células estaminais, mas sim uma interacção entre as células e o esqueleto usado, a adesão celular à superfície da matriz, a proliferação, maturação e diferenciação das mesmas e a produção de matriz extracelular (Krampera *et al* 2006).

Um estudo mostrou que várias concentrações de MSC's (1×10^6 , 4×10^6 , 8×10^6 células/ml) em gel de colagénio tipo I melhoraram a reparação tendínea, mas sem uma relação dose-efeito e com formação de osso ectópico em 30% dos casos. Similarmente, noutro estudo, foram implantadas MSC's em compostos de colagénio (4×10^6 células/ml) em defeitos no tendão de Aquiles de rato, resultando numa melhoria biomecânica, arquitectural e funcional do tendão (Krampera *et al* 2006).

Vários estudos mostram alternativas para otimizar a diferenciação das MSC's em tendão, por exemplo o uso de alguns factores de crescimento exógenos, implicados na

formação de tendão, a substituição do gel colagénio por PGLA, ou a diminuição de vinte vezes a relação colagénio/MSC's, o que atenua a formação de osso ectópico e melhora as características biomecânicas e histológicas do tendão (Krampera *et al* 2006).

Para usar esta terapia a medula óssea é recolhida do esterno (ou tuberosidade coxal), transferida para um laboratório para cultura e expansão das MSC's durante três semanas e devolvida ao veterinário (10×10^6 - 50×10^6 células, dependendo da extensão da lesão) para implantação no tendão danificado (Richardson *et al* 2007).

Crovace *et al* (2010) realizou um estudo em que fez avaliação histológica e imunohistoquímica de tendão, após tendinite induzida com colagenase e tratamento com MSC's derivadas da medula óssea contra grupo placebo. Como resultados, obteve uma maior expressão de colagénio tipo I, com as suas fibras longitudinalmente orientadas, e maior expressão de COMP (proteína oligomérica da matriz da cartilagem), uma proteína abundante no tendão cujo nível de expressão está relacionado com a orientação fisiológica das fibras deste.

III. Casos clínicos

1. Caso clínico nº 1

O primeiro caso clínico refere-se a uma égua de 7 anos de idade que realiza provas de Pólo. Apresentou-se pela primeira vez no *Hospital de Referencia La Equina* aproximadamente três semanas antes desta visita, mostrando no exame estático uma distensão e aumento de temperatura nos tendões flexores do membro anterior esquerdo, com dor á palpação profunda. No exame dinâmico (trote em piso duro, trote e galope em piso mole) apresentava uma claudicação de 1/5 do membro anterior esquerdo. Realizou-se ecografia músculo-esquelética ao membro afectado (Fig. 2 e 3) e foi diagnosticada uma lesão de tendinite aguda no tendão flexor digital superficial 20 a 24cm distal ao osso acessório do carpo.

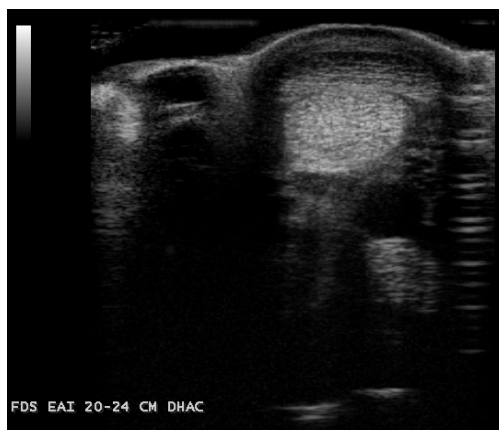


Fig. 2 – Imagem ecográfica transversal da lesão do TFDS do membro anterior esquerdo, antes do tratamento com células estaminais (cedida por *Hospital de Referencia la Equina*).

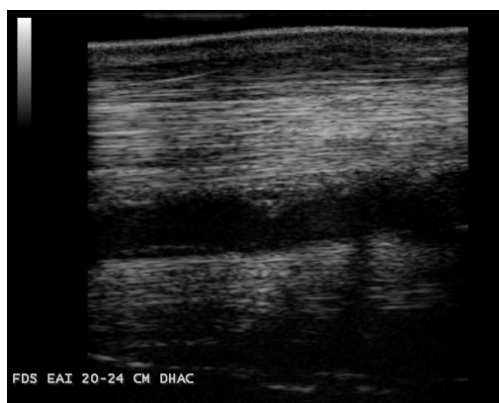


Fig. 3 – Imagem ecográfica longitudinal da lesão do TFDS do membro anterior esquerdo, antes do tratamento com células estaminais (cedida por *Hospital de Referencia la Equina*).

Foi recolhido aspirado de medula óssea, segundo o protocolo usado pelo Hospital, em anexo (Anexo 4), e enviado para a empresa Vet-Cell® para cultivo. Durante o intervalo até implantação das células foi recomendado manter a égua solta na pastagem. Nesta nova consulta, foram implantadas as células estaminais cultivadas, segundo o protocolo do Hospital, também em anexo (Anexo 5). Manteve-se a égua ligada durante os dois dias seguintes. Recomendou-se consulta de seguimento para revisão ecográfica, um mês depois, mantendo até essa data a égua em repouso na boxe, com caminhadas diárias a passo durante 30 minutos. Um mês depois a égua apresentou-se de novo no Hospital para revisão ecográfica (Fig. 4 e 5). A partir desta data, manteve o trabalho a passo e introduziu-se 10 minutos diários de trote durante dois meses, altura do novo seguimento.

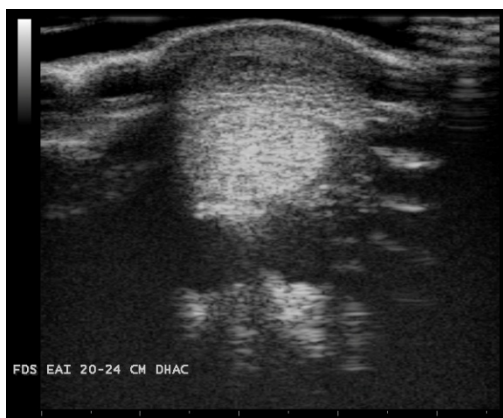


Fig. 4 – Imagem ecográfica transversal da lesão do TFDS do membro anterior esquerdo, um mês depois do tratamento com célula estaminais (cedida por *Hospital de Referencia la Equina*).



Fig. 5 – Imagem ecográfica longitudinal da lesão do TFDS do membro anterior esquerdo, um mês depois do tratamento com célula estaminais (cedida por *Hospital de Referencia la Equina*).

2. Caso clínico nº 2

Este caso clínico refere-se a cavalo, castrado com 7 anos de idade, da raça Holstein, com aptidão de obstáculos. Apresentou-se à clínica *Hippiátrica* com um aumento de volume na região dos tendões flexores do membro anterior direito, sem dor á palpação. No exame dinâmico, a trote em piso duro e trote e galope em piso mole, não apresentou claudicação. Realizou-se ecografia músculo-esquelética do membro anterior direito (Fig. 6).

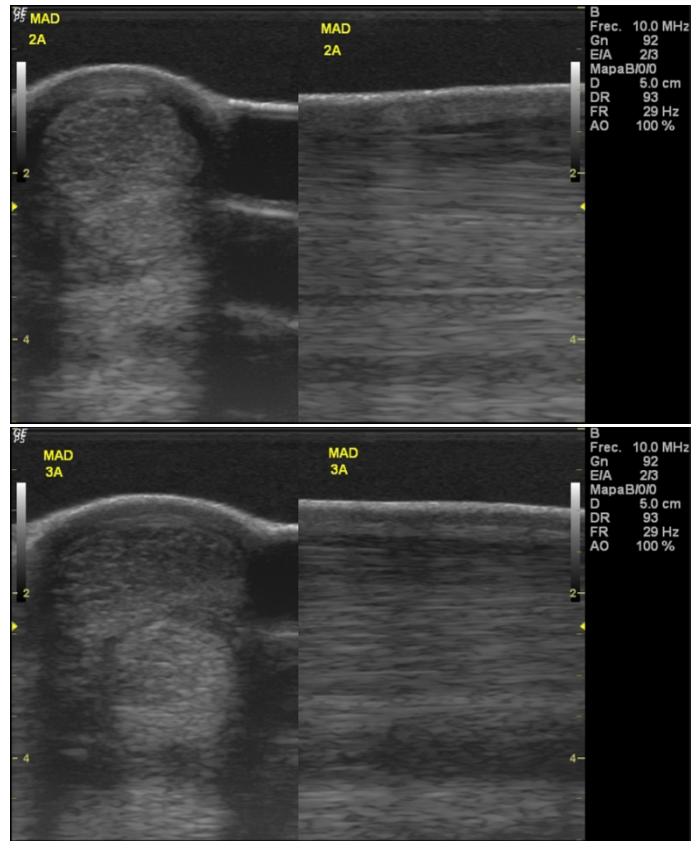


Fig. 6 – Imagens ecográficas transversais e longitudinais da lesão (2A e 3 A) do TFDS do membro anterior direito, antes do tratamento com PRP (cedida por *Hippiatrica*).

Foi diagnosticada uma lesão no tendão flexor digital superficial que se estendia da região 2A a 3B, O cavalo foi encaminhado para cirurgia para realizar “Splitting” do tendão flexor digital superficial do membro anterior direito e infiltração de factores de crescimento autólogos (PRP). O PRP foi obtido e processado de acordo com o protocolo da clínica *Hippiatrica* (Anexo 6). O equino manteve-se internado durante 5 dias com troca de ligadura dia sim, dia não, em repouso absoluto nos três primeiros dias. No quarto dia iniciou caminhada à mão, a passo, durante 15 minutos, uma vez ao dia. Como tratamento médico foi-lhe administrada Fenilbutazona IV (Antipyranal® na dose de 4.4mg/Kg/BID) durante 3 dias, foi também administrado profilaticamente Gentamicina IV (Genta-ject® na dose de 6.6mg/Kg/SID) e Cefquinoma IM (Cobactan® na dose de 1mg/Kg/SID), ambos durante 5 dias. O cavalo teve alta clínica após estes cinco dias, devendo cumprir o plano de reabilitação proposto pela clínica (Anexo 7). Um mês depois, foi sujeito a nova avaliação ecográfica (Fig. 7).

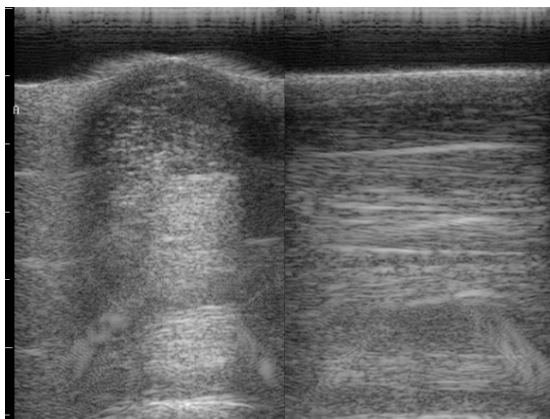


Fig. 7 – Imagens ecográficas transversal e longitudinal (2A) da lesão do TFDS do membro anterior direito, um mês depois do tratamento com PRP (cedida por *Hippiatrica*).

3. Discussão

O presente relatório pretendeu ser uma compilação sucinta dos principais temas referentes a tendinites e seu diagnóstico assim como o uso de terapias regenerativas no respectivo tratamento.

Os meios de diagnóstico imagiológico de tendinite são variados, mas a ecografia é sem dúvida o método de eleição, sendo por isso alvo de escolha para descrição mais pormenorizada. A escolha da descrição da cintigrafia, apesar de não ser um meio de diagnóstico comum em Portugal, deveu-se ao facto do meu estágio no Hospital de Referencia la Equina me ter proporcionado a oportunidade de a ver empregue no diagnóstico de tendinites.

O tratamento de tendinites com terapias regenerativas oferece inúmeras possibilidades. Entre estas possibilidades, a minha opção recaiu por descrever as terapias com células estaminais, em especial as de origem mesenquimatosa, e com PRP, pelo facto de serem as mais utilizadas em equinos, e as que acompanhei durante o meu estágio.

Nos dois casos clínicos descritos, o diagnóstico obtido foi o mais correcto. Praticamente todos os procedimentos efectuados na resolução dos casos clínicos mencionados estão descritos na bibliografia como sendo os que se devem executar, no sentido de controlar, tratar e resolver os problemas encontrados. A excepção refere-se ao segundo caso clínico, onde se realizou *splitting* do TFDS antes da administração do PRP. Esta opção foi tomada pelo facto de se tratar de uma lesão de carácter de crónico, não estando no entanto descrita na bibliografia referente à aplicação de PRP.

Os meios auxiliares de diagnóstico existentes, devidamente complementados pelos exames clínicos estático e dinâmico prévios, foram suficientes para poder diagnosticar os casos clínicos referidos e, posteriormente, tratar os animais.

Assim, e uma vez estabelecido o diagnóstico, trataram-se os animais com as respectivas técnicas de terapia regenerativa. Foram utilizados ainda no segundo caso AINE's e antibióticos profilaticamente, pois o procedimento de *splitting* pode ser doloroso e acarretar riscos de infecção, apesar da assépsia cuidadosa e do uso de material esterilizado. Os tratamentos implementados correspondem aos encontrados na bibliografia.

Finalmente, após todos estes procedimentos diagnósticos e terapêuticos, o "feedback" obtido foi bastante favorável no primeiro caso, tendo o animal apresentado melhorias significativas no exame de seguimento posterior. Tal facto, confirma que as avaliações e conclusões que iam sendo feitas ao longo do processo diagnóstico estavam correctas, não havendo motivos para suspeitar de que outras patologias de maior gravidade estivessem presentes, pois caso contrário, outros sintomas clínicos mais preocupantes teriam surgido e a evolução não teria sido favorável. No segundo caso, a avaliação seguinte do animal não obteve os resultados esperados, provavelmente, não por falha da terapêutica instituída, mas sim porque não houve cumprimento do plano de reabilitação estabelecido.

IV. Conclusão

A tendinite em equinos é uma patologia muito comum, com uma alta taxa de incidência, levando a um crescente interesse no desenvolvimento de terapias eficazes no seu tratamento. As terapias regenerativas parecem uma boa alternativa, devido à sua capacidade de gerarem um tecido com características mais semelhantes às do tecido original, e por isso mais funcional. Contudo, actualmente os resultados deste tratamento ainda não são claros, devido essencialmente á extrapolação de resultados de outras espécies, à ausência de estudos que comprovem os seus resultados a longo prazo, à falta de controlos adequados e a um baixo conhecimento das características específicas dos tenócitos e do processo de reparação tendinosa. Actualmente existem inúmeros estudos a decorrer, que certamente virão a colmatar estas falhas.

V. Bibliografia

Abellonet I, Prades M (2009), "Repeated Intralesional Platelet Rich Plasma (PRP) Injection Evaluated in 72 Sport Horses with Superficial Flexor Tendon Injuries Improves Clinical Scores and Return to Performance", **Proceedings of the 11th International Congress of the World Equine Veterinary Association**

Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden A (2004), "Autologous Platelets as a Source of Proteins for Healing and Tissue Regeneration", **Thromb Haemost**, 4-15

Archer D C, Cotton J C, Boswell J C (2007 a), 'Non-skeletal Scintigraphy of the Horse: Indications and Validity', **The Veterinary Journal** 173, 45 – 56

Archer D C, Cotton J C, Voute L C, Clegg P D (2007 b), 'Skeletal Scintigraphy in the Horse: Current Indications and Validity as a Diagnostic Test', **The Veterinary Journal** 173, 31 – 44

Bosch G, Weeren P, Barneveld A, Schie H (2009), "Computerised Analysis of Standardized Ultrasonographic Images to Monitor the Repair of Surgically Created Core Lesions in Equine Superficial Digital Flexor Tendons Following Treatment with Intratendinous Platelet Rich Plasma or Placebo", **The Veterinary Journal** 187, 92-98

Carvalho A, Alves A, Golim M, Moroz A, Hussni C, Oliveira P, Deffune E (2009), "Isolation and Immunophenotypic Characterization of Mesenchymal Stem Cells Derived from Equine Species Adipose Tissue", **Veterinary Immunology and Immunopathology** 132, 303-306

Carvalho A, Alves A, Oliveira P, Álvarez L, Amorim R, Hussni C, Deffune E (2011), "Use of Adipose Tissue – Derived Mesenchymal Stem Cells for Experimental Tendinitis Therapy in Equines", **Journal of Equine Veterinary Science** 31, 26-34

Cissel J M (2009), '***In Vitro* Equine Flexor Tendonitis: New Model Development and Therapeutic Investigation**', Thesis for the degree of Master of Science, Blacksburg, Virginia

Clegg P (2008), "Biological Therapies for Treatment of Tendon and Ligament Injuries", **Proceedings of the 47th British Equine Veterinary Association Congress BEVA**

Croft A P, Przyborski S A (2004), "Mesenchymal Stem Cells From the Bone Marrow Stroma: Basic Biology and Potential for Cell Therapy", **Current Anaesthesia & Critical Care** 15, 410-417

Crovace A, Lacitignola L, Rossi G, Francioso E (2009), "Histological and Immunohistochemical Evaluation of Autologous Cultured Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells and Bone Marrow Mononucleated Cells in Collagenase – Induced Tendinitis of Equine Superficial Digital flexor Tendon", **Veterinary Medicine International** ,1-10

Dahlgren L A (2007), 'Pathobiology of Tendon and Ligament Injuries', **Clinical Techniques in Equine Practice**, 168 – 173

Dowling B A, Dart A J (2005), 'Mechanical and Functional Properties of the Equine Superficial Digital Flexor Tendon', **The Veterinary Journal** 170, 184–192

Dyson S (2007), 'Nuclear Scintigraphy: Uses and limitations', **The Veterinary Journal** 173, 12 – 13

Dyson SJ, Pilsworth RC, Twardock AR, Martinelli MJ (2003 a), 'Basic Principles of Equine Scintigraphy', **Equine scintigraphy**, 1º Ed, Equine Veterinary Journal Lda, 17-24

Dyson SJ, Pilsworth RC, Twardock AR, Martinelli MJ (2003 b), 'Patient Preparation', **Equine scintigraphy**, 1º Ed, Equine Veterinary Journal Lda, 69-71

Dyson SJ, Pilsworth RC, Twardock AR, Martinelli MJ (2003 c), 'Orthopaedic Imaging', **Equine scintigraphy**, 1º Ed, Equine Veterinary Journal Lda, 83-90

Farrow C S (2006), 'Ligaments and Tendons of the Metacarpal and Metatarsal Regions', **Veterinary Diagnostic Imaging the Horse**, 1º Ed, Mosby Inc, 305-324

Filho RPPF, Fernandes CG, Martins RADT (2009), "Treatment of Tendinitis in Polo Ponies Using Platelet Rich Plasma (PRP): case report", **Proceedings of the 11th International Congress of the World Equine Veterinary Association**

Fortier L A, Smith R K W (2008), 'Regenerative Medicine for Tendinous and Ligamentous Injuries of Sport Horses', **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice** 24, 191 – 201

Fortier LA (2009), "Medical Therapies for Tendonitis", **Proceedings of the 11th International Congress of the World Equine Veterinary Association**

Georg R, Maria C, Gisela A, Bianca C (2010,) "Autologous Conditioned Plasma as Therapy of Tendon and Ligament Lesions in Seven Horses", **Journal of Veterinary Science** 11, 173-175

Gillis C (2007), "Ultrasonography for Monitoring Healing and Rehabilitation", **Clinical Techniques in Equine Practice** 6, 174-178

Gray P (1994), 'Lameness Related to Burse, Sheaths, Tendons and Ligaments', **Lameness**, 1º Ed, J. A. Allen & Company Limited, 127-136

Krampera M, Pizzolo G, Aprili G, Franchini M (2006), "Mesenchymal Stem Cells for Bone, Cartilage, Tendon and Skeletal Muscle Repair", **Bone** 39, 678-683

Lin T W, Cardenas L, Soslowsky L J (2004), 'Biomechanics of Tendon Injury and Repair', **Journal of Biomechanics** 37, 865 – 877

Maia L, Souza MV, Júnior JIR, Oliveira AC, Alves GES, Benjamin LA, Silva YFRS, Zandim DM, Moreira JCL (2009), "Platelet-rich Plasma in the Treatment of Induced Tendinopathy in Horses: Histologic Evaluation", **Journal of Equine Veterinary Science** 8, 619-626

Meirelles MG, Paganela JC, Dos Santos CA, Amaral LA, Nogueira CEW (2010), "Utilização de Plasma Rico em Plaquetas (PRP) no Tratamento de Tendinite em Equinos", **XII ENPOS 2010**

Monteiro S (2008), "Wound Cicatrisation and Platelet Rich Plasma", **Proceedings of the European Society of Veterinary Orthopaedics and Traumatology 2008**, 256-260

Paris D, Stout T (2010), "Equine Embryos and Embryonic Stem Cells: Defining Reliable Markers of Pluripotency", **Theriogenology** 74, 516-524

Raheja L. F, Galuppo L. D, Lepore J. B, Dowd J. P, Tablin F, Yellowley C. E (2011), "Treatment of Bilateral Medial Femoral Condyle Articular Cartilage Fissures in Horse Using Bone Marrow – derived Multipotent Mesenchymal Stromal Cells", **Journal of Equine Veterinary Science** 31, 147,154

Ramirez J, (2006), '**Use of Autologous Platelet Concentrates for the Treatment of Musculoskeletal Injuries in the Horse**', tese de Doutorado, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Autónoma de Barcelona.

Rantanen N W, McKinnon A O (1998 a), 'Diagnostic Ultrasound: Applications in the Equine Limb', **Equine Diagnostic ultrasonography**, 1ºEd, Williams & Wilkins, 103-117

Rantanen N W, McKinnon A O (1998 b), 'The Superficial Digital Flexor Tendon', **Equine Diagnostic ultrasonography**, 1ºEd, Williams & Wilkins, 289-398

Richardson L. E, Dudhia J, Clegg P. D, Smith R (2007), "Stem Cells in Veterinary Medicine – Attempts at Regenerating Equine Tendon After Injury", **Trends in Biotechnology** 9, 409-416

Robinson N E, Sprayberry K A (2009 a), 'Management of Tendon Injuries', **Current Therapy in Equine Medicine**, 6º Ed, Saunders Elsevier, 518-523

Robinson N E, Sprayberry K A (2009 b), 'Stem Cell Therapy', **Current Therapy in Equine Medicine**, 6° Ed, Saunders Elsevier, 908-911

Rose, R J, Hodgson, D R (2000), 'Diagnostic Ultrasound', **Manual of Equine Practice**, 2° Ed., USA: Saunders, 95-185

Sharma P, Maffulli N (2005), 'Basic Biology of Tendon Injury and Healing', **Surgeon**, 309-316

Stashak T S (2004 a), 'Enfermedades Y Problemas de los Tendones, Los Ligamentos Y las Vainas Tendinosas', **Adams: claudicación en el Caballo**, 5° Ed, Inter-Médica, 627-657

Stashak T S (2004 b), 'Examen de las claudicaciones', **Adams: claudicación en el Caballo**, 5° Ed, Inter-Médica, 123-130

Sutter WW (2007), "Autologous Cell-based Therapy for Tendon and Ligament Injuries", **Clinical Techniques in Equine Practice** 6, 198-208

Violini S, Ranelli P, Pisani L, Gorni C, Mariani P (2008), "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 Biology** , 1-10

Wang J H C (2006), 'Mechanobiology of Tendon', **Journal of Biomechanics** 39, 1563 – 1582

VI. Anexos

Anexo 1

Casuística

A tabela seguinte mostra os casos clínicos que acompanhei durante o período de estágio referente às áreas de Medicina Interna e Cirurgia de Equinos, durante o período que estive no *Hospital de Referencia La Equina* (tabela I) e na *Hippiatrica*.

Casos Clínicos	Nº de ocorrências no <i>Hospital de Referencia la Equina</i>	Nº de ocorrência na clínica <i>Hippiatrica</i>
Respiratório		
Hemiplégia Laringea	2	-
Doença pulmonar obstrutiva crónica	-	2
Pneumonia bacteriana	3	-
Digestivo		
Insuficiência hepática	1	-
Hérnia inguinal	2	-
Diarreia em poldros	2	-
Extracção dentária	1	-
Cólicas:		
Impactação na flexura pélvica	1	-
Deslocamento cecal	-	1
Músculo-esquelético		
Osteocondrose/artroscopias	16/4	2/2
Fractura de segunda falange	-	1
Abcesso sub-solar	1	-
Rabdomiólise	-	1
Formigueiro	1	1
Laminite	1	-
Sinovite neonatal	2	-
Tendinite/tenoscopia	1/-	3/1
Exostose II/IV metacarpo	2	1
Gato	2	-
Exame de compra e venda/ aprovação reprodutor	14	1
Reprodutor		
Neoplasia testicular	-	1
Criptorquidido	2	-

Tabela I- Casuística do *Hospital de Referencia la Equina* e da clínica *Hippiatrica*.

Casuística Observada Durante o Estágio Curricular

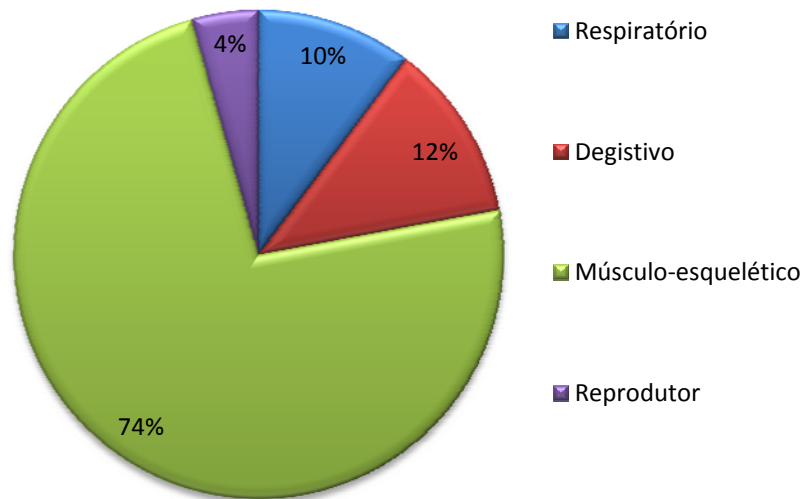


Gráfico 1 – Percentagem de casuística observada durante o estágio curricular no Hospital de *Referencia la Equina* e na Clínica *Hippiatrica*

Anexo 2

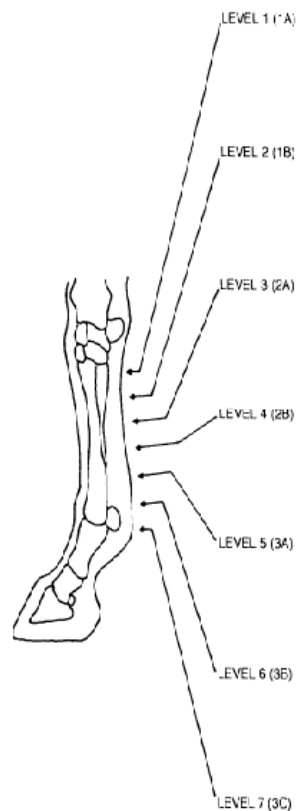


Fig. 1 - Esquema de classificação das zonas ecográficas do membro anterior (Rose & Hodgson, 2000).

Anexo 3

The form is titled "VetCell MS-EQ SAMPLE SUBMISSION FORM". It includes a "VetCell Case Reference" field. The "Patient details" section contains fields for "Registered Name", "Sex", "Age", "Breed", and "Use". The "Structures & Limbs affected" and "Date of Injury" fields are present, along with a "Previous Injury (Yes/No)" field. A section for "Details of medication administered in the past 14 days" includes a text area and a note: "Use of any antibiotics within 14 days of aspiration together with any corticosteroids increases and should be avoided". The "Extent of Injury" section features a diagram of a horse's lower leg and hoof, with text: "Where appropriate indicate length of injury and cross-sectional area of lesion at worst point." Below the diagram is a "Signature of veterinary surgeon" field and a "Date" field. The "Volume of Cells Required (please tick)" section has five radio button options: "2 x 1ml (10m cells) - Standard", "4 x 1ml (20m cells)", "6 x 1ml (30m cells)", "8 x 1ml (40m cells)", and "10 x 1ml (50m cells)". The "Comments/Special requests" section has a text area and a checkbox: "The owner has given consent for any samples obtained in lieu of fee (insert and detachable page as shown full)". The "Delivery Address (if different)" section includes fields for "Name", "Address", and "Telephone No.". The "VetCell" logo is in the top left.

Fig. 2 - Formulário de envio de aspirado de medula óssea (cedido por *Hospital de Referencia La Equina*)

Anexo 4

Protocolo de aspiração de medula óssea (cedido pelo *Hospital de Referencia La Equina*)

Material necessário:

- ✓ 1 x caixa isotérmica
- ✓ 2 x bolsas acumuladoras, 1 congelada por 24 horas e outra descongelada. A congelada deve ser retirada do frio 30 minutos antes de colocá-la na caixa
- ✓ 1 x agulha de Jamshidi 13 G Referência TJC3513
- ✓ 1 x pano de campo
- ✓ 2 x seringas de 5ml
- ✓ 2 x seringas de 20ml
- ✓ 2 x contentores de plástico estéreis(>15ml, <30ml) -ex: Copo de urina

- ✓ 2 x vacutainers azuis 5ml (citrato sódico)
- ✓ 2 x agulhas 21G
- ✓ 1 x No. 11 lâmina de bisturi
- ✓ Compressas estéreis
- ✓ 10 ml de mepivacaina
- ✓ Sedação

Procedimento:

- Carregar 2 x 5ml de mepivacaina.
- Carregar 2 x seringas de 20ml com 7,500 UI de heparina sódica (5,000iu/ml).
- Rotular os contentores de plástico com A e B e o nome do cavalo.
- Sedar e imobilizar o cavalo.
- Tosquiar o esterno
- Identificar ecograficamente os espaços interesternebrais
- Preparar assepticamente o esterno
- Injectar de profundo a superficial 4 ml de mepivacaina em cada espaço, e 1 ml subcutâneo
- Repetir um último passo antiséptico e limpar com álcool
- Introduzir a agulha de Jamshidi no espaço craneal até que se introduza na medula
- Retirar 10.5ml de aspirado com uma seringa de 20 ml e transferir para o contentor A.
- Retirar 3.5ml de aspirado com uma seringa de 5 ml e transferir para o primeiro vacutainer
- Inserir a agulha de Jamshidi no espaço caudal eleito
- Retirar 10.5ml de aspirado com a seringa de 20 ml e transferir para o contentor B.
- Retirar 3.5ml de aspirado com a outra seringa de 5 ml e transferir ao segundo vacutainer
- Mover devagar os contentores e vacutainer, e introduzi-los numa bolsa com fecho hermético com algumas compressas como absorventes.
- Introduzir os contentores na caixa isotérmica

Anexo 5

Serviço VetCell

Implantação de células mesenquimatosas (cedido por *Hospital de Referencia La Equina*)

Material necessário:

- ✓ 1 x pano de campo estéril
- ✓ 2 x seringas de 2ml
- ✓ 2 x seringas de 5ml
- ✓ 1 x luvas de palpar estéreis
- ✓ Um par de luvas estéreis
- ✓ 1 x gel estéril
- ✓ 2 x agulhas de 20G
- ✓ Compressas estéreis
- ✓ Penicilina-gentamicina para três dias
- ✓ Ligadura de Robert Jones
- ✓ 40 ml de mepivacaina
- ✓ Sedação

Processo:

- Encher 2 x seringas de 2ml com 1ml de células, em cada uma.
- Sedar e imobilizar o cavalo.
- Tosquiar o membro
- Identificar a lesão para implantação.
- Anestesia por baixo do tarso ou carpo, com um anel suplementar proximalmente à lesão.
- Preparar membro esterilmente
- Inserir o transdutor do ecógrafo numa luva estéril com gel estéril dentro e fora
- Guiar a agulha de 20G com o ecógrafo até à lesão
- Injectar em 1-3 sítios dependendo da lesão. As mais crónicas necessitam mais sítios. Começar proximalmente .
- Ligar o membro imediatamente.
- Administrar penicilina-gentamicina durante 3 dias
- Instruir o proprietário do plano de exercício

Anexo 6

Protocolo de Obtenção e administração de PRP (cedido pela *Hippiatrica*)

Materiais:

- 12 Tubos de Citrato (Tampa Azul)
- 2 Tubos de Soro (secos) (Tampa Vermelha)
- 1 Suporte para tubos
- 1 Pinça / porta agulhas
- 2 Seringas de 20 ml
- 1 Seringa de 10 ml
- 1 Seringa de 2/2,5 ml
- 1 Butterfly 19G
- 2 Agulhas 18G 1 ½
- 2 Agulhas 21G 2 – 2 ½ (comprida)
- 1 Agulha 25G 5/8 (para tendão) ou
- 1 Agulha 21G 1 ½ (para articulação)
- Spray de solução de álcool e clorhexidina.
- Luvas estéreis
- Cloreto de Cálcio 0.025 mmol/l
- Tosquiadora eléctrica
- Centrífuga MLW – T30
- Material para desinfeção cirúrgica (compressas, clorhexidina sabão, clorhexidina solução e álcool)
- Sedativos (Detomidina/Xilazina e Buthorfanol)

Método

- Pulverizar ambiente, superfícies e paciente com o Spray anti-moscas
- Tosquiar e fazer desinfecção cirúrgica sobre a veia jugular esquerda no seu terço superior
- Tosquiar a zona a infiltrar
- Preparar uma mesa com um campo asséptico. Acomodar os tubos no suporte para tubos e colocá-lo sobre a mesa
- Pulverizá-los com a solução de álcool e clorhexidina
- Um assistente realiza a venipunção com o Butterfly 19G tendo o cuidado de entregar o extremo estéril do tubo ao Médico que, usando luvas estéreis, colherá 40 ml de sangue em 2 seringas estéreis de 20 ml
- Colocar uma agulha 18G em cada seringa e encher os 12 Tubos de Citrato (4 ml Tampa Azul) deixando que o vácuo actue
- Centrifugar os tubos a 120g (1000 rpm) x 5 min (usar rotor exterior)
- Retirar os tubos da centrífuga, acomodar os tubos no suporte para tubos e pulverizá-los novamente com a solução de álcool e clorhexidina.
- Usando luvas estéreis, retirar as tampas dos tubos e extrair o 50% inferior do sobrenadante (*PC-A*) de cada tubo, usando a seringa estéril de 10 ml com agulha comprida.
Agitar levemente com movimentos circulares a superfície do buffy coat.
- Transferir os 10 ml (aprox.) de *PC-A* obtido para os 2 Tubos de Soro (secos) (5/10 ml Tampa Vermelha) deixando que o vácuo actue.
- Proceder à sedação do paciente e fazer desinfecção cirúrgica sobre a zona a infiltrar.
- Centrifugar a 240g (1500 rpm) x 5 min (usar rotor exterior).
- Usando luvas estéreis, retirar os tubos da centrífuga, acomodar os tubos no suporte para tubos e pulverizá-los novamente com a solução de álcool e clorhexidina.
- Pulverizar o frasco de Cloruro de Cálcio com a solução de álcool e clorhexidina.
- Carregar 0,002 ml (*só o cone da agulha*) de Cloruro de Cálcio na seringa estéril de 2/2,5 ml
- Retirar as tampas dos tubos e extrair 1 ml do fundo (*PC-C com pellet*) de cada tubo, usando a seringa de 2/2,5 ml com agulha comprida.
- Substituir a agulha comprida pela agulha de infiltração (Agulha 25G / Agulha 21G 1 ½).
- Um assistente posiciona, sem tocar na área desinfectada, o membro a infiltrar.
- Infiltrar imediatamente o tendão ou articulação afectada.
- Aplicar uma ligadura.
- Adequar um plano de reabilitação ao paciente.

Anexo 7

Plano de Reabilitação do Paciente após tratamento com PRP (Cedido pela *Hippiatrica*)

Semanas:

1: Caminhar a passo por 15 minutos á mão, de manhã e de tarde. CONTROLO ECOGRÁFICO

2: Caminhar a passo por 30 minutos montado.

3: Caminhar a passo por 30 minutos montado, seguido de uma sessão de 10 minutos de: 3 minutos Passo; 1 minuto trote; finalizar com 25 minutos a passo.

4: Caminhar a passo por 30 minutos montado, seguido de uma sessão de 15 minutos de: 3 minutos Passo; 1 minuto trote; finalizar com 20 minutos a passo.

5: Caminhar a passo por 20 minutos montado, seguido de uma sessão de 25 minutos de: 3 minutos de passo; 1 minuto trote; finalizar com 20 minutos a passo.

6: Caminhar a passo por 15 minutos montado, seguido de uma sessão de 30 minutos de: 5 minutos de passo; 3 minutos trote e 1 minuto galope; finalizar com 20 minutos a passo.

7: Caminhar a passo por 15 minutos montado, seguido de uma sessão de 40 minutos de: 5 minutos de passo; 3 minutos trote e 1 minuto galope; finalizar com 15 minutos a passo.

8: Caminhar a passo por 15 minutos montado, seguido de uma sessão de 40 minutos de: 2 minutos de passo; 2 minutos trote e 2 minutos galope; finalizar com 15 minutos a passo.