

U. PORTO



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

Relatório Final de Estágio
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**APLICAÇÃO DE CÉLULAS ESTAMINAIS COM ORIGEM NO TECIDO
ADIPOSO NO TRATAMENTO DE LESÕES ORTOPÉDICAS EM
EQUINOS**

André Daniel Fernandes Rafeiro

Orientador: Dr. Tiago de Melo Silva Ramos Pereira

Co-Orientadores: Dr. Manuel Torrealba

Dr. Wilson Roberto Fernandes

Porto 2012

U. PORTO



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

Relatório Final de Estágio
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**APLICAÇÃO DE CÉLULAS ESTAMINAIS COM ORIGEM NO TECIDO
ADIPOSO NO TRATAMENTO DE LESÕES ORTOPÉDICAS EM
EQUINOS**

André Daniel Fernandes Rafeiro

Orientador: Dr. Tiago de Melo Silva Ramos Pereira

Co-Orientadores: Dr. Manuel Torrealba

Dr. Wilson Roberto Fernandes

Porto 2012

Resumo

O presente relatório final de estágio do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária representa o culminar de um estágio realizado durante dezasseis semanas nas áreas de Clínica Ambulatória, Medicina Interna e Cirurgia de equinos.

A primeira parte do meu estágio foi realizada na Clínica *Hippiatrica Equine Medical Center*, onde tive a oportunidade de auxiliar em diversas cirurgias, principalmente ortopédicas, e participar em alguns procedimentos clínicos. Tive ainda a possibilidade de promover a prestação de cuidados nos animais internados (aperfeiçoando técnicas de administração e colheita de amostras) e auxílio na realização e interpretação de exames complementares de diagnóstico. Além disso, acompanhei a realização de consultas clínicas em ambulatório que consistiram principalmente em exames de diagnóstico de claudicação e subsequente tratamento, exames de ato de compra, dentisteria e tratamentos profiláticos (vacinações, desparasitações).

Os últimos dois meses de estágio foram realizados no Hospital de Equinos da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnica - Universidade de São Paulo, Brasil (FMVZ-USP). Durante este período tive a oportunidade de auxiliar os médicos veterinários residentes na avaliação clínica dos animais, na realização de exames complementares de diagnóstico, na execução de variados procedimentos clínicos, bem como, realizar o acompanhamento dos animais internados. Sendo um hospital com bastante casuística, tive a oportunidade de contactar com as mais variadas patologias que me permitiram uma complementação prática da aprendizagem obtida anteriormente.

Este relatório tem como finalidade englobar dois aspetos distintos. Descrever brevemente as atividades desenvolvidas ao longo das dezasseis semanas de estágio, através da exposição da casuística encontrada e a elaboração de uma revisão bibliográfica, tendo como tema a aplicação das terapias regenerativas no tratamento de lesões músculo-esqueléticas. A escolha deste tema surgiu pelo facto de durante o meu estágio na Clínica Hippiatrica ter a oportunidade de acompanhar a aplicação deste tipo de terapias, muito em foco na atualidade, no tratamento de patologias do sistema músculo-esquelético, as quais representam grande parte da casuística da prática clínica, apresentando também elevadas taxas de recidivas com a utilização de terapias convencionais.

Casuística

CASOS CLÍNICOS	Nº DE OCORRÊNCIAS
1. Sistema Músculo-esquelético	
Osteomielite	2
Lombalgia	1
Artrite	2
Desmite ligamento suspensor	2
Fraturas:	
➤ Primeira falange (P1)	1
➤ Rádio	1
➤ Tíbia	1
Laminite crónica	2
Laceração traumática de tecidos moles	3
Osteíte séptica da 3ª falange	1
Exungulação	1
Tendinites:	
➤ Tendinite tendão gastrocnémio	1
➤ Tendinite TFDP	1
➤ Tendinite TFDS	4
Sesamoidite	2
Síndrome Navicular	2
Calcificação das cartilagens alares	1
Reabsorção de P3	1
Laminite aguda	1
Deformidades membros anteriores	1
Osteocondrose/osteocondrite dissecante	8
Osteodistrofia	2
Desmite ligamento sesamoideo obliquo	1
Perfuração traumática da parede costal	1
Lesão do menisco	2
Abcesso do casco	2
Tenosinovite crónica	1
Fragmento tarso	1
Abcesso parede costal	1
Artropatia com erosão da cartilagem	1
Fragmento da articulação IFD	1
2. Sistema génito-urinário	
Mastite	3
Cistite	1
Criptorquidismo	5
Seminoma	1
Orquite	1
Parálise do pénis	1
Urolitíase vesical	1
Orquiectomia eletiva	2

CASOS CLÍNICOS	Nº DE OCORRÊNCIAS
3. Sistema Digestivo	
Diarreia crónica	3
Prolapso rectal	1
Cólica - impactação gástrica/colite/flexura pélvica	6
Cólica - resolução cirúrgica	6
Insuficiência hepática	5
Cólica - hernial escrotal	1
Fístula dentária	1
Hérnia inguinal	2
Fratura dentária	2
4. Sistema Respiratório	
Pleurisia/Broncopneumonia	1
Sinusite	1
Abcessos pulmonares	1
Hemiplegia laríngea	1
DDPM	1
Colapso laríngeo	1
Bronquite crónica	1
Pleuropneumonia por corpo estranho	2
Pneumonia	2
Traqueíte	1
Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica	2
5. Oftalmologia	
Glaucoma	1
Uveíte	1
Úlcera da córnea	1
Laceração da córnea	1
6. Dermatologia	
Epidermólise bolhosa	1
Sarcóide	1
Hiperplasia da ranilha	1
7. Sistema Nervoso	
Tétano	1
Mieloencefalite protozoária equina (Sarcocystis neurona)	5
8. Outros	
Otite Crónica	2
Hematoma etmoidal	1
Babesiose	3
TOTAL DE OBSERVAÇÕES	129

Tabela 1 - Casuística das patologias encontradas durante o período de estágio

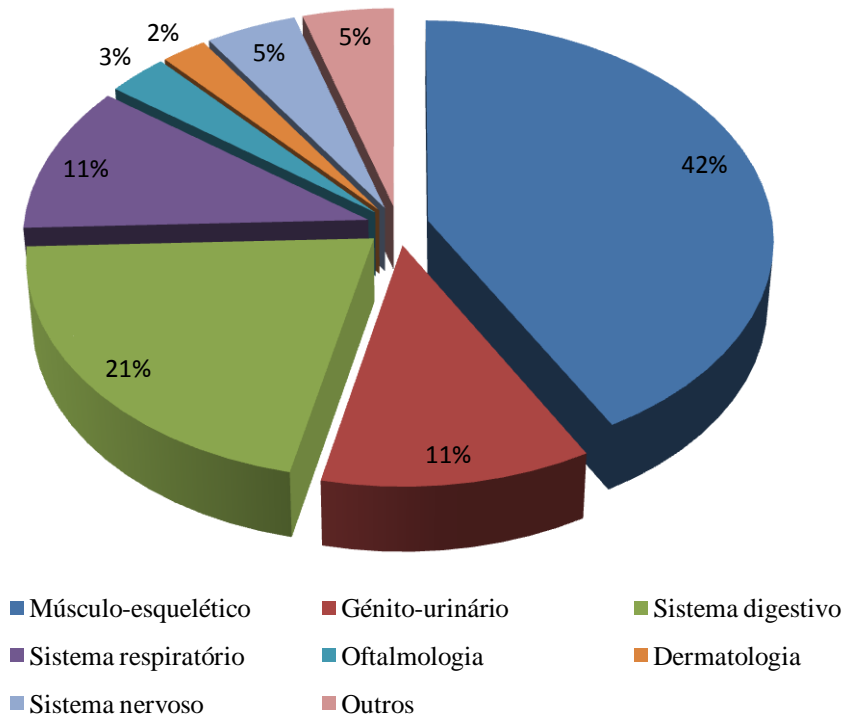


Gráfico 1 - Distribuição da casuística por sistema do organismo

Agradecimentos

A elaboração deste relatório e todo o meu percurso académico tiveram como parte integrante um conjunto muito especial de indivíduos, os quais merecem o meu mais sincero agradecimento:

Ao meu orientador, Professor Tiago de Melo Silva Ramos Pereira pela sua total disponibilidade e orientação prestada na elaboração deste trabalho.

Ao meu co-orientador, Dr. Manuel Torrealba que pelo seu profissionalismo, experiência, competência, amizade e espírito de equipa, me permitiu uma aprendizagem de qualidade durante o meu período de estágio na Clínica Hippiátrica.

Ao meu co-orientador, Professor Doutor Wilson Roberto Fernandes, pelo apoio, disponibilidade e partilha de conhecimentos durante o meu estágio no Hospital de Equinos da USP.

À Dra. Ana Ferreira, pela extraordinária capacidade para ensinar, pelos conhecimentos que me transmitiu, pela alegria contagiante com que trabalha e pela amizade estabelecida.

À Professora Carla Belli e Professora Raquel Baccarin pelos ensinamentos e por estarem sempre disponíveis para esclarecer as minhas dúvidas.

A todos os pós-graduandos, residentes e grupo clínico do hospital de equinos da USP pela simpática, boa disposição e por me terem recebido tão bem, com quem tive oportunidade de aprender.

Aos meus colegas de estágio Eva, Maaïke, Irene, Lúcia, Patrick, Eduarda, e Marta, e todos aqueles que deixei de referir, pelo companheirismo, partilha de trabalho e momentos divertidos que foram sem dúvida bons tempos passados juntos.

Aos meus amigos que me acompanharam ao longo destes anos de estudos pela paciência, companheirismo e dedicação.

Ao Luís e ao Fernando que estão sempre prontos para me ajudar, pela amizade e momentos de descontração proporcionados.

Aos meus avós pela motivação, compreensão e força com que sempre me acompanharam.

Aos meus irmãos por toda a dedicação, incentivo e apoio incondicional.

Aos meus pais, a quem dedico este trabalho, pelo carinho, força, amizade e acima de tudo pelo grande esforço que fizeram para a realização deste curso e assim tornar real o meu sonho. São sem dúvida eles que merecem o maior agradecimento.

MUITO OBRIGADO

Lista de abreviaturas

HSCs – células estaminais hematopoiéticas
ES – células embrionárias
iPS – células estaminais pluripotentes induzidas
MSCs – células estaminais mesenquimais
CD – cluster of differentiation
FGF2 – fator de crescimento de fibroblastos 2
BMP – proteína morfogénica óssea
ALP – fosfatase alcalina
IBMX – isobutilmetilxantina
GDF – fator de crescimento e diferenciação
COMP – proteína oligomérica da matriz da cartilagem
TNF – fator de necrose tumoral
IL – interleucina
TGF – fator transformador de crescimento
GAG – glicosaminoglicanos
PBS – solução tamponada de fosfato salino
ADN – ácido desoxirribonucleico
MMP – metaloproteinases da matriz
MAE – membro anterior esquerdo
BWP – Belgisch Warmbloed Paard
TFDP – tendão flexor digital profundo
MAD – membro anterior direito
MPD – membro posterior direito
IFD – interfalângica distal
FTR – femorotibiorotuliana
RM – Ressonância Magnética
BSP – bone sialic protein

Índice Geral

Resumo	iii
Casuística	iv
Agradecimentos	vii
Lista de abreviaturas	viii
Introdução	1
I. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
1. Células estaminais mesenquimais – Origens e Características	2
2. Diferenciação <i>in vitro</i> de MSCs	4
3. Propriedades imunomodulatórias e imunogenicidade das MSCs	7
4. Fontes de células estaminais mesenquimais	8
4.1 Células estaminais mesenquimais com origem na medula óssea.....	8
4.2 Células estaminais mesenquimais com origem no tecido adiposo.....	10
4.2.1 Isolamento e cultura <i>in vitro</i> de células estaminais derivadas do tecido adiposo	11
5. Principais aplicações clínicas em medicina de equinos	11
5.1 Aplicação em lesões de tendão	12
5.2 Aplicação em lesões articulares	13
II. CASOS CLÍNICOS	16
Caso Clínico nº 1	16
História Clínica	16
Exames Complementares e Diagnóstico	16
Tratamento	17
Acompanhamento	18
Caso Clínico nº 2	20
História Clínica	20
Exames Complementares e Diagnóstico	21
Tratamento	23
Acompanhamento	23
Discussão	24
Conclusão	25
III. BIBLIOGRAFIA	26
IV. ANEXOS	33

Introdução

Hoje em dia, a performance desportiva tornou-se no objetivo central de toda a seleção e criação de cavalos. É neste confronto, entre a natureza e a procura incessante por um ideal, que muitas vezes o cavalo surge como uma vítima dos fatores ambientais, do maneio e da seleção, o que poderá levar a alguns desequilíbrios do seu sistema músculo-esquelético (Rossdale 1999). Alterações a este nível são extremamente importantes para os equinos atletas em todos os tipos de desporto e representam grande parte de toda a clínica equina.

A patologia articular tem sido relatada como sendo a maior causa de claudicação em equinos e é estimada em 42% - 60% (Frisbie 2005) dos casos de claudicação podendo ocorrer através de doenças de desenvolvimento (ex. osteocondrose), lesões agudas (ex. lesões focais da cartilagem) e doenças crónicas adquiridas. O resultado final é muitas vezes o desenvolvimento de osteoartrite, uma doença articular caracterizada por uma perda progressiva da função da matriz da cartilagem, sinovite e uma reação óssea subcondral variável (Brehm *et al.* 2012). Estas patologias estão associadas a mau desempenho atlético e retirada precoce da vida ativa, tendo um impacto económico negativo (Poll & Meagher 1990). A natureza relativamente avascular e hipóxica do tecido cartilágneo, para além das características não proliferativas dos condrócitos maduros, muitas vezes resulta num mau prognóstico para a recuperação completa da lesão (Buckwalter & Mankiin 1998).

A tendinite é outra importante causa de claudicação e de diminuição do desempenho em cavalos atletas devido à sua elevada incidência, período de recuperação prolongado e alta taxa de recidivas (Barreira *et al.* 2008). Após lesão do tendão, o tecido cicatricial que substitui o danificado pode resultar na redução da performance e aumento substancial do risco de uma nova lesão apesar do grande número de tratamentos convencionais existentes. (Butler *et al.* 2008). As recidivas estão relacionadas com a não regeneração de tecido lesionado do tendão e na produção de uma matriz de fibras de colagénio que são de menor diâmetro e de qualidade inferior, exibindo um número reduzido de ligações cruzadas em comparação com o tecido normal (Woo *et al.* 1999). Deste modo, as terapias celulares que promovem a regeneração do tecido lesionado devem produzir uma redução da taxa de recidivas em comparação com aquelas que promovem a formação de tecido cicatricial (Guest 2008).

O uso de terapias celulares para a regeneração de tecidos em lesões músculo-esqueléticas está a ganhar cada vez mais importância como tratamento de eleição na prática equina. As células estaminais têm um potencial terapêutico significativo devido à sua capacidade para regular a inflamação, promover a regeneração dos tecidos e prevenir a formação de cicatriz, tendo como

objetivo restaurar a arquitetura estrutural e função biomecânica normais nos tecidos lesionados (Fortier & Smith 2008) com pouca capacidade regenerativa, tal como o tendão, ligamentos, meniscos e cartilagem (Stocum 2006). Embora a capacidade destas novas terapias para restaurar as propriedades mecânicas e estruturais do tecido original seja discutível, existem cada vez mais evidências científicas que suportam a sua aplicação para melhorar a cicatrização de lesões tendinosas e articulares (Gutierrez-Nibeyro 2011).

As terapias regenerativas que utilizam células estaminais mesenquimais têm mostrado resultados promissores em vários trabalhos publicados (Carvalho *et al.* 2011). Em casos de lesões músculo-esqueléticas, a maioria das pesquisas têm-se centrado principalmente no potencial terapêutico das células estaminais derivadas a partir da medula óssea e do tecido adiposo embora outros estudos indicam a possibilidade de outras fontes (Koch 2009). A fonte mais abundante e acessível de células estaminais é o tecido adiposo (Gimble *et al.* 2003), o que justifica o interesse crescente da utilização desta fonte no desenvolvimento de terapias celulares.

I. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Células estaminais mesenquimais – Origens e Características

O termo células estaminais abrange uma ampla variedade de tipos de células, incluindo células estaminais hematopoiéticas (HSCs), células estaminais embrionárias (ES), células estaminais pluripotentes induzidas (iPS) e células estaminais mesenquimais (MSCs). Estes tipos de células diferem na sua plasticidade, tecido de origem e utilizações terapêuticas (Borjesson & Peroni 2011).

As células estaminais mesenquimais podem ser isoladas e expandidas com uma eficiência elevada e induzidas para se diferenciar em várias linhagens celulares sob condições de cultura *in vitro* específicas (Barry & Murphy 2004), sendo essa capacidade de diferenciação um componente integrante do seu fenótipo (Stewart & Stewart 2011).

As células estaminais mesenquimais são células multipotentes, indiferenciadas e isoladas a partir de tecidos mesenquimais adultos, com a capacidade para se diferenciarem em linhagens mesodérmicas como osso, cartilagem, gordura, e tecido muscular (Agung *et al.* 2006). Devido à sua multipotencialidade e capacidade de autorrenovação, as células estaminais mesenquimais podem representar unidades de regeneração ativa de tecidos danificados.

Este tipo de células participa na regeneração dos tecidos por dois mecanismos distintos, contribuem diretamente na reparação tecidual por terem a capacidade de se diferenciar em

fenótipos celulares específicos e na produção de proteínas bioativas que desempenham igual importância para a direta diferenciação e produção de matriz dos tecidos. Esses fatores incluem vários fatores de crescimento, fatores anti-apoptóticos e agentes quimiotáticos que têm efeitos benéficos sobre a dinâmica celular local, pois produzem efeitos anabolizantes, estimulam a angiogênese, contribuem para a estimulação e recrutamento adicional de células estaminais para o local da lesão (Ribitsch *et al.* 2010), inibindo simultaneamente a inflamação e consequentemente a formação de fibrose (Stewart & Stewart 2011).

Não existe nenhum marcador de superfície específico que defina as células estaminais mesenquimais (Fortier 2005). Deste modo, várias características são combinadas para proceder à sua identificação, como por exemplo, a sua propriedade de aderir ao plástico *in vitro*; a combinação de expressão positiva de CD105, CD90, e CD73 em mais do que 95% das células em cultura e expressão negativa para marcadores de outras populações celulares hematopoiéticas incluindo CD34, CD45, CD14 (Nixon *et al.* 2012), e a capacidade para se diferenciarem em osteoblastos, adipócitos e condrócitos *in vitro* (Dominici *et al.* 2006). No entanto, apesar de expressão positiva destes marcadores, muitas culturas de células estaminais mesenquimais não são fenotipicamente homogêneas.

Para as células estaminais mesenquimais equinas derivadas da medula óssea foi determinado um conjunto de marcadores de superfície que permitem a sua identificação através da expressão de CD44, CD29 e CD90 e a ausência de marcadores hematopoiéticos (CD45 e CD14), endoteliais (endoglin, CD34 e fator VIII-related antigen) e epiteliais (pan cytokeration) (Arnhold *et al.* 2007; Radcliffe *et al.* 2010). Contudo, o conjunto de marcadores identificados para MSCs equinas derivadas do tecido adiposo não foi idêntico (Braun *et al.* 2010; Raabe *et al.* 2011). Isto pode ser devido ao facto de existirem restrições no estabelecimento de um conjunto de marcadores de superfície suficiente para pacientes veterinários devido à indisponibilidade de anticorpos espécie-específicos (Brehm 2012).

Embora as células estaminais tenham uma capacidade de divisão celular considerável, esta não é ilimitada. A este respeito, as células estaminais mesenquimais diferem das células estaminais embrionárias. As células estaminais adultas *in vivo* estão num estado quase de repouso, apresentando reduzida divisão celular. A expansão de células estaminais mesenquimais *in vitro* constitui um aumento marcado na sua proliferação, o que pode resultar na perda do seu potencial replicativo uma vez que estas células têm uma capacidade finita de duplicação, e entrarem na fase de senescência replicativa. No entanto, a capacidade e a taxa de proliferação destas células parece variar consoante as fontes de tecidos celulares e entre as diferentes

localizações anatômicas do mesmo tecido (Mochizuki 2006). A senescência replicativa das células estaminais mesenquimais está associada com a perda de multipotencialidade, afetando a capacidade destas atuarem nos locais de lesão e inflamação (Stolzing 2006). Este fenômeno é crítico para aplicações que requerem extensa expansão *ex vivo* das células estaminais antes do reimplante no local de lesão. No entanto, o início e os efeitos de senescência replicativa podem ser anulados pela expansão das células estaminais mesenquimais na presença do fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF2), condições de cultura hipóxica que também aceleram a proliferação destas células, e a expansão em meio de cultura com baixa concentração de glicose que reduz a apoptose das células estaminais mesenquimais e aumenta a formação e tamanho das colônias (Stewart & Stewart 2011).

O processo pelo qual as células estaminais mesenquimais se tornam comprometidas ou destinadas a uma certa linhagem específica ainda é pouco compreendido. No entanto, são conhecidos alguns fatores de transcrição teciduais. Nas células estaminais, o processo de proliferação, comprometimento e diferenciação terminal para uma linhagem celular específica é regulado pela complexa rede de interação molecular, que envolve moduladores da transcrição genética, fatores de transcrição, proteínas quinases, fatores de crescimento e recetores celulares (Yarak & Okamoto 2010).

2. Diferenciação *in vitro* de MSCs

A diferenciação celular refere-se a modificações na expressão de genes e do metabolismo que constituem uma alteração no fenótipo (forma da célula, potencial de membrana, e atividade metabólica). A capacidade de diferenciação em várias linhagens celulares é um dos critérios mínimos das MSCs definidos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular. As três linhagens de diferenciação das células estaminais mesenquimais melhor caracterizadas e destinadas à aplicação músculo-esquelética são as linhagens condrogénica, osteogénica e adipogénica (Taylor & Clegg 2011).

A diferenciação osteogénica requer um meio de cultura em monocamada contendo soro suplementado com β -glicerofosfato, dexametasona e ácido ascórbico. A proteína morfogenética óssea (BMP) pode ser adicionada ao meio de cultura para acelerar a diferenciação osteogénica e aumentar a mineralização da matriz. O fenótipo osteogénico é identificado por pesquisa da deposição de matriz mineralizada (coloração Von Kossa, alizarina), pelo aumento da atividade da fosfatase alcalina (ALP), e pela identificação de genes específicos de osteoblastos, tais como Runx2, Osterix, osteopontin, osteonectin e BSP (Stewart & Stewart 2011).

A diferenciação condrogénica requer um sistema de cultura tridimensional. As células estaminais mesenquimais são cultivadas em meio de cultura isento de soro suplementado com ácido ascórbico, insulina, transferrina e selénio e tratadas com fator de crescimento- β ou BMPs. O fenótipo condrogénico é identificado através da produção e deposição do colagénio tipo II (enzyme-linked immunosorbent assay) e glicosaminoglicanos sulfatados (ligação ao azul dimetilmetileno) ou através da identificação de agrecan (western blotting), coloração matriz para glicosaminoglicanos sulfatados (Azul alcian, azul de toluidina, ou safranina) análise imunohistoquímica de colágeno tipo II, e pelo perfil de genes específicos de condrócitos, tais como Sox 9, collagen type II e agrecan (Stewart & Stewart 2011).

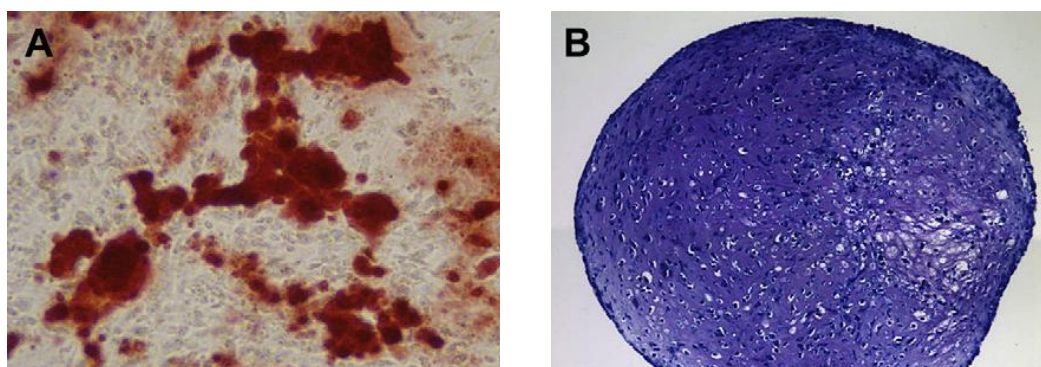


Figura 1 – Diferenciação *in vitro* de células estaminais mesenquimais. Diferenciação osteogénica (A) e diferenciação condrogénica (B) (Stewart & Stewart)

Para a diferenciação adipogénica, as células são incubadas em monocamada num meio de cultura com 10% de soro, suplementado com dexametasona, isobutilmetilxantina (IBMX) e insulina. A IBMX sensibiliza as células à insulina permitindo esta última estimular a síntese de lípidos e a acumulação destes dentro de vacúolos intracelulares. A diferenciação adipogénica é avaliada pela coloração dos vacúolos com óleo red-O e pela regulação positiva do fator de transcrição específico dos adipócitos, PPAR γ (Stewart & Stewart 2011).

A diferenciação das células estaminais mesenquimais ao longo da linhagem tenogénica está menos estabelecida, uma vez que os marcadores específicos do fenótipo não estão bem definidos. No entanto, a diferenciação tenogénica pode ser induzida em meios de cultura com soro suplementado com fator de crescimento e diferenciação 5 (GDF-5) ou GDF-7/BMP-12 (Stewart & Stewart 2011).

Estudos *in vitro* de MSCs em matrizes bidimensionais (2D) e tridimensionais (3D) mostram que estas podem ser induzidas a sintetizar matrizes com algumas das características da matriz extracelular do tendão (Alves *et al.* 2011).

As células estaminais equinas têm capacidade para sintetizar uma matriz abundante e muito bem estruturada quando cultivadas *in vitro* sobre estímulos apropriados. No entanto, a demonstração da diferenciação em tenócitos tem sido dificultada pela ausência de um estímulo tenogénico efetivo e um marcador fenotípico definitivo. Os tenócitos são descritos como tendo morfologia de fibroblastos, não podendo 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 da proteína oligomérica da matriz de cartilagem (COMP) pode ser produzida pela matriz extracelular mas também não é específico para tendão, embora a COMP tenha uma distribuição restrita em tecidos primariamente concebidos para suportar carga (por exemplo, cartilagem, tendão, e fibrocartilagem). A síntese de outras proteínas, como a tenomodulina, é mais específica de tendão, contudo, não é totalmente exclusiva deste (Richardson *et al.* 2007; Alves *et al.* 2011).

Um estudo realizado por Taylor *et al.* (2009) sugeriu um painel de genes marcadores, que são, em combinação, característicos para tecidos de tendão adultos. Os marcadores são COL1A2, scleraxis e tenascin-C, onde a baixa expressão deste último e elevada expressão dos anteriores permite distinguir o tecido do tendão de osso ou cartilagem.

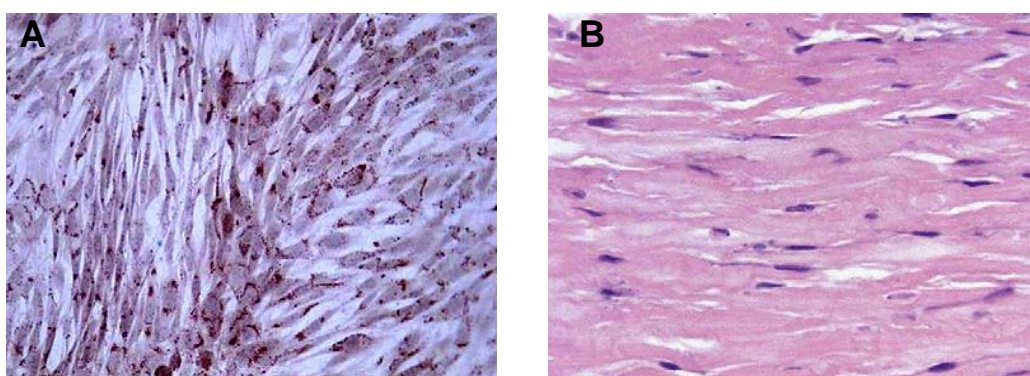


Figura 2 – Diferenciação *in vitro* de células estaminais mesenquimais. Diferenciação adipogénica (A) e diferenciação tenogénica (B) (Stewart & Stewart)

3. Propriedades imunomodulatórias e imunogenicidade das MSCs

A avaliação terapêutica das células estaminais mesenquimais pode ser baseada não apenas na sua contribuição para a restauração da arquitetura dos tecidos danificados, mas também na sua capacidade comprovada de modular a resposta inflamatória (Borjesson & Peroni 2011). Estas células apresentam efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores potentes através de interações celulares e/ou libertação de mediadores inflamatórios e moléculas de adesão para o local da inflamação, tendo a capacidade de inibir a formação de tecido cicatricial, inibir a apoptose, aumentar a angiogénese, e estimular as células estaminais intrínsecas para regenerar o tecido lesionado (Borjesson & Peroni 2011). Para conseguir isso, as células estaminais mesenquimais interagem com quase todas as células do sistema imunitário, incluindo os linfócitos B, células T, células natural killer, células dendríticas, macrófagos/monócitos e neutrófilos (Peroni & Borjesson 2011). No entanto a capacidade imunomoduladora das células estaminais mesenquimais é dependente de vários fatores, como a ativação MSCs, o tecido de origem das MSCs, dose de MSCs aplicada, tempo decorrido entre a lesão e a aplicação de MSCs e o contacto das MSCs com células do sistema imunitário (Peroni & Borjesson 2011).

Richardson *et al.* (2007) propôs que o momento ideal para implantar as células estaminais é após a fase inflamatória inicial, antes da formação de tecido fibroso. Foi colocada a hipótese de que a presença de tecido fibroso maduro dentro do tendão torna o implante mais difícil e reduz os benefícios da terapia celular por causa da sua persistência.

As células estaminais mesenquimais não secretam proteínas imunomoduladoras se não forem ativadas (Peroni & Borjesson 2011). *In vitro*, as células T individualmente, ou em conjunto com as citocinas, tais como o interferão-alfa ou o fator de necrose tumoral (TNF), são usadas para ativar as células estaminais mesenquimais. *In vivo*, as células estaminais mesenquimais aplicadas intralesionalmente vão ser ativadas pela reação inflamatória existente no local, razão pela qual é importante compreender o meio inflamatório onde estas células vão ser aplicadas (Peroni & Borjesson 2011). Nas lesões agudas as células estaminais mesenquimais são ativadas pela interleucina (IL) -6, IL-1, ou TNF-alfa, no entanto, nas lesões crónicas ou reações inflamatórias imuno-mediadas são as células T ou interferão-gama os responsáveis pela ativação destas células (Peroni & Borjesson 2011).

Os efeitos inibitórios das células estaminais mesenquimais sobre as células inflamatórias são dependentes da quantidade de células aplicadas no local da lesão. As células estaminais mesenquimais agem sobre as células T não estimuladas, impedindo a sua ativação. No entanto, quando ocorre uma estimulação prévia das células T, as células estaminais mesenquimais

reduzem os níveis de expressão dos seus marcadores de ativação (Peroni & Borjesson 2011). Alguns estudos demonstraram que doses elevadas de MSCs possuem atividade imunossupressora, contudo, terapias com baixas doses de células estaminais mesenquimais podem ser imunoestimulatórias (Sun *et al.* 2010) ou falhar na inibição da proliferação dos linfócitos (Najar *et al.* 2010).

Pacini *et al.* (2007) constatou com base nas suas investigações que um número inferior a 1×10^6 células aplicadas no tratamento de lesões tendinosas era insuficiente para provocar a regeneração do tendão. A dose ideal de células estaminais mesenquimais para qualquer lesão equina é claramente uma importante área de estudo, e a dupla capacidade destas células, para manter ou suprimir a proliferação de células T deve ser considerada no contexto da aplicação clínica (Najar *et al.* 2009).

4. Fontes de células estaminais mesenquimais

Após a identificação de diversos tecidos como fontes de MSCs, várias investigações têm-se centrado na pesquisa de fontes de maior acessibilidade de obtenção das células estaminais mesenquimais e com maior potencial para aplicações clínicas (Brehm *et al.* 2012).

As células estaminais mesenquimais são multipotentes e podem ser obtidas e expandidas a partir de quase todos os tipos de tecidos, no entanto, a ênfase em cavalos tem sido a utilização de células estaminais com origem na medula óssea e tecido adiposo (Borjesson & Peroni 2011). Embora em menor extensão, os tecidos placentários (sangue do cordão umbilical e tecidos do cordão umbilical), tecido sinovial, músculo e tendão são outras das fontes usadas (Ribitsch *et al.* 2010).

4.1 Células estaminais mesenquimais com origem na medula óssea

O isolamento de células estaminais mesenquimais derivadas da medula óssea, também conhecidas como células estromais da medula tem sido descrito em várias espécies de animais (Giovannini *et al.* 2008). O compartimento estromal da medula óssea foi o primeiro local reportado por conter células progenitoras multipotentes. Por esta razão, a medula óssea é a fonte de células estaminais mesenquimais melhor investigada em relação às características destas células (Brehm *et al.* 2012).

A medula óssea contém uma população de células-tronco hematopoiéticas, a partir da qual derivam as componentes celulares do sangue, e uma subpopulação de células multipotentes, as células estaminais mesenquimais. Estas células representam uma pequena fração da população

total de células nucleadas na medula óssea de seres humanos, e apenas 0,001% a 0,01% de células mononucleares isoladas a partir de um gradiente de densidade Ficoll do aspirado da medula óssea são células estaminais mesenquimais e pensa-se que em equinos esta percentagem seja semelhante (Fortier & Travis 2011). Vidal *et al.* (2006) citado por Brehm *et al.* (2012) reportou a frequência de 1 MSCs em 4.200 células totais nucleadas da medula óssea de equinos. As células estaminais derivadas da medula óssea têm mostrado ser multipotentes. Além da autorreplacação e aderência ao plástico *in vitro*, são capazes de exibir diferenciação osteogénica, adipogénica e condrogénica quando estimuladas por fatores de diferenciação específicos.

Kisiday *et al.* (2008) reportou um elevado potencial condrogénico das MSCs equinas derivadas da medula óssea na presença de fator transformador de crescimento $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) em comparação às MSCs derivadas do tecido adiposo. Em contraste, Berg *et al.* (2009) comparou as MSCs provenientes do sangue do cordão umbilical e verificou que o potencial condrogénico das MSCs da medula óssea era inferior (Brehm *et al.* 2012). Um estudo *in vitro* realizado por Vidal *et al.* (2008) demonstrou também que as células estaminais mesenquimais derivadas da medula óssea apresentavam um potencial condrogénico superior comparativamente às células estaminais derivadas do tecido adiposo na presença de fatores de diferenciação, uma vez que se verificou a deposição de glicosaminoglicanos (GAG) e a síntese de colagénio tipo II mais precocemente nas células estaminais derivadas da medula óssea.

Em cavalos, estas células são rotineiramente isoladas do aspirado medular sendo recolhidas a partir da tuberosidade coxal ou do esterno (Ribitsch *et al.* 2010). Um estudo recente conduzido por Kasashima *et al.* (2011) determinou que a quinta estérnebra é o local mais seguro para aspiração destas células, além disso, este estudo também demonstrou que os primeiros 5 ml do aspirado são mais enriquecidos em células estaminais mesenquimais. Na prática, volumes únicos de 10 a 20 ml de aspirado medular são provavelmente adequados (Stewart & Stewart 2011).

A maior desvantagem das MSCs derivadas da medula óssea consiste no seu processo de colheita bastante invasivo associado com o risco de complicações, como hemorragia, infeção, pneumotórax ou pneumopericárdio (Durando *et al.* 2006; Vidal *et al.* 2007; Giovannini *et al.* 2008; Brehm *et al.* 2012).

As opiniões a respeito da qualidade da medula óssea como fonte de células estaminais mesenquimais são controversas, uma vez que parece haver diferenças significativas na eficácia destas células entre as diferentes espécies. No entanto, uma das suas vantagens é o facto de possuírem a capacidade de se multiplicarem e se manterem em cultura por longos períodos de tempo sem perderem o seu potencial de diferenciação.

4.2 Células estaminais mesenquimais com origem no tecido adiposo

O tecido adiposo constitui uma fonte alternativa extremamente atraente de células estaminais mesenquimais em comparação com a medula óssea. Estas células têm 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 várias linhas celulares (Carvalho *et al.* 2009).

A investigação desenvolvida nesta área tem revelado que o nicho destas células é susceptível de estar localizado na região perivascular, como acontece em outras fontes (Stewart & Stewart 2011), uma vez que a quantidade de células estaminais obtidas a partir de tecido adiposo, e particularmente em equinos, está correlacionada com a densidade vascular (da Silva Meirelles *et al.* 2008).

Em análises comparativas das células estaminais mesenquimais, as células com origem no tecido adiposo, no estroma da medula óssea ou no cordão umbilical, não demonstraram diferenças quanto à sua morfologia e ao fenótipo imunológico. Contudo, a frequência de células estaminais mesenquimais no tecido adiposo excede a frequência destas células no estroma medular (De Ugarte *et al.* 2003), o que também foi constatado por Dahlgren (2009), que relatou sobre a frequência mais elevada de células estaminais no tecido adiposo em comparação com a medula óssea (2% vs 0,002%). Além disso, é clinicamente relevante o número de células estaminais que podem ser obtidas a partir desta fonte, uma vez que elas possuem maior taxa de proliferação celular do que as obtidas através da medula óssea (Yarak *et al.* 2010).

Recentemente, McCarthy *et al.* (2011) comparou o potencial condrogénico de células estaminais mesenquimais com origem no tecido adiposo e na medula óssea e demonstrou que a indução condrogénica das células estaminais derivadas da medula óssea resultou numa cartilagem hipertrófica sendo considerado desvantajosa para o processo de reparação da cartilagem, podendo predispor a mineralização. Desta forma, o potencial condrogénico das células estaminais derivadas do tecido adiposo, segundo este autor, pode ser considerado superior ao da medula óssea na produção de cartilagem capaz de reparação funcional. Além disso, os condrócitos diferenciados a partir de células estaminais do tecido adiposo têm a capacidade de se dividir e produzir mais células numa taxa mais rápida, mantendo o seu fenótipo quando expandidas em cultura.

As MSCs derivadas do tecido adiposo parecem exibir um maior potencial de diferenciação e menor senescência replicativa em comparação com as MSCs de outras fontes (Wagner *et al.* 2005; Colleoni *et al.* 2009; Vidal *et al.* 2011; Brehm *et al.* 2012). Vários estudos reportam um

bom potencial de diferenciação em linhagens celulares mesodérmicas (Jeziarska-Wozniak *et al.* 2010; Martinell *et al.* 2010; Brehm *et al.* 2012), no entanto, outros autores observaram um potencial osteogénico e condrogénico limitado em MSCs equinas (Yoshimura *et al.* 2007; Vidal *et al.* 2008; Brehm *et al.* 2012). O tecido adiposo pode ser colhido a partir de vários locais em equinos, incluindo a região inguinal, esternal, e região dos glúteos. O local mais comumente utilizado é a área sobre os músculos glúteos dorsais, na base da cauda, sendo a zona de maior acessibilidade de obtenção e que pode fornecer quantidades significativas deste tecido (Alves *et al.* 2011).

4.2.1 Isolamento e cultura *in vitro* de células estaminais derivadas do tecido adiposo

Em laboratório, o tecido adiposo é submetido a trituração, lavagem, sendo posteriormente agitado com um volume igual de solução tamponada de fosfato salino (PBS) para promover a separação em duas fases. A fase inferior é descartada contendo as células hematopoiéticas em suspensão em PBS. O tecido adiposo é digerido num volume igual de solução de PBS contendo 1% de colagenase e 0.1% de albumina sérica bovina a 37° C durante 50 minutos. Para completar a separação de células estaminais mesenquimais dos adipócitos, a amostra é agitada vigorosamente e centrifugada a 260 g durante 5 minutos. O sobrenadante é eliminado e o sedimento celular que inclui as células estaminais mesenquimais é cultivado em meios com DMEM-Ham's F12 contendo 10% de soro fetal bovino (FBS) e penicilina/estreptomicina (Taylor & Clegg 2011).

A adição de fator de crescimento de fibroblastos tem demonstrado aumentar a taxa de proliferação das MSCs equinas derivadas do tecido adiposo e da medula óssea, mantendo o seu potencial de diferenciação (Taylor & Clegg 2011).

5. Principais aplicações clínicas em medicina de equinos

A terapia celular com células estaminais em medicina de equinos está gradualmente a tornar-se uma realidade clínica. As células estaminais mesenquimais são utilizadas para o tratamento de lesões agudas e crónicas, principalmente ortopédicas, incluindo tendinopatias, lesões ligamentares, fraturas, laminites, e doenças articulares, como quistos ósseos subcondrais, defeitos da cartilagem e lesões de menisco (Borjesson & Peroni 2011). No entanto, a maioria dos estudos clínicos publicados aborda o uso de terapias com células estaminais mesenquimais, principalmente no tratamento de lesões de tendões, ligamentos e doenças articulares.

5.1 Aplicação em lesões de tendão

Em equinos, os trabalhos experimentais desenvolvidos nesta área tem-se focado principalmente na utilização de células estaminais mesenquimais no tratamento de lesões tendinosas induzidas por colagenase, mas também em lesões de ocorrência natural (Alves *et al.* 2011).

Pacini *et al.* (2007) citado por Ribitsch *et al.* (2010) relatou uma taxa de sucesso de 90%, após tratamento de lesões de tendão flexor digital superficial com células estaminais mesenquimais em 10 cavalos de corrida, mostrando que os cavalos tratados voltaram ao seu nível de competição prévio sem reincidência de lesão num período de 2 anos, enquanto que no grupo controlo não tratado com células estaminais mesenquimais, ocorreram novas lesões em todos os cavalos após um tempo médio de 7 meses.

Um estudo realizado por Smith *et al.* (2009) revelou resultados significativos na aplicação de 1×10^7 células estaminais mesenquimais derivadas da medula óssea no tratamento de quatro cavalos com lesão do tendão flexor digital superficial, os quais, apresentaram uma maior elasticidade e uma área transversal menor dos tendões, em comparação com o grupo controlo. Histologicamente os tendões tratados apresentaram um aumento da densidade das fibras do tendão, aumento da organização das fibras de colagénio e uma redução da vascularização, comparável a outros locais do tendão que não tinham sofrido lesão, além disso a fluorescência do colagénio foi mais elevada e o conteúdo de ADN significativamente inferior em relação ao grupo não tratado.

Leppanen *et al.* (2009) mostrou resultados positivos após a aplicação de células estaminais derivadas do tecido adiposo no tratamento de lesões ligamentares e de tendão, uma vez que melhorias significativas foram observadas na ecogenicidade e alinhamento das fibras durante o acompanhamento ecográfico após o tratamento.

Um estudo realizado por Carvalho *et al.* (2011) relatou também melhorias evidentes na histologia das lesões tendinosas induzidas por colagenase em oito éguas tratadas com células estaminais derivadas do tecido adiposo. As fibras do tendão apresentam melhor organização e menor infiltrado inflamatório em relação ao grupo controlo. A análise imunohistoquímica não mostra diferença significativa da expressão de colagénio tipo I nos tendões tratados em relação aos não tratados, no entanto, verificou-se uma redução na formação de colagénio tipo III nos tendões que receberam tratamento.

Crovace *et al.* (2010) realizou um estudo em que fez avaliação histológica e imunohistoquímica de tendão, após tendinite induzida com colagenase e aplicação de tratamento

com células estaminais mesenquimais derivadas da medula óssea, em comparação com um grupo controle. Como resultados, obteve uma maior expressão de colagénio tipo I, com as suas fibras orientadas longitudinalmente, e maior expressão de COMP, uma proteína abundante no tendão cujo nível de expressão está relacionado com a orientação fisiológica das fibras deste, evidenciando que o grupo tratado apresentou uma melhoria na organização/alinhamento das suas fibras.

Estes dados sugerem benefício real na aplicação de células estaminais mesenquimais como forma de tratamento deste tipo de lesões. A sobrevivência das células implantadas durante um longo período de tempo é conhecida por ser baixa, no entanto, a maioria das células aplicadas parece participar na tenogênese e na regeneração do tendão (Satija *et al.* 2009).

Segundo Nixon *et al.* (2012) torna-se cada vez mais evidente que o papel principal das células estaminais mesenquimais aplicadas para a regeneração de tendão e, possivelmente, na maioria das aplicações para a regeneração do tecido conjuntivo, está nos seus efeitos indiretos sobre a homeostasia dos tecidos, os quais incluem efeitos tróficos anabolizantes através da atividade parácrina e autócrina, efeitos anti-inflamatórios diretos das células, quimiotaxia de células estaminais adicionais para o tendão bem como um efeito anti-apoptótico significativo.

O tratamento do tendão através da aplicação de MSCs provoca um aumento no número de células progenitoras no tecido do tendão, melhorando assim o potencial para a regeneração. As propriedades imunomoduladoras de MSCs traduzem-se em efeitos anti-inflamatórios *in vivo* e numerosos estudos tem demonstrado que a administração exógena de MSCs atenua a inflamação e promove a regeneração de tecido lesionado (Carvalho *et al.* 2011). Os resultados clínicos após aplicação de células estaminais mesenquimais são favoráveis, uma vez que as taxas de reincidência de lesão utilizando este tipo de terapias são inferiores às taxas observadas utilizando tratamentos convencionais, as quais variam entre os 23% e os 80% (Brehm *et al.* 2012).

5.2 Aplicação em lesões articulares

Devido à capacidade de diferenciação condrogénica por parte das células estaminais mesenquimais, grande parte das investigações nesta área tem-se focado na utilização deste tipo de terapias regenerativas para o tratamento de lesões articulares.

Os defeitos focais da cartilagem são alvo de engenharia de tecidos. Idealmente, o uso de matrizes em combinação com células estaminais mesenquimais expandidas em laboratório ou diferenciadas condrogenicamente *in vitro*, e aplicadas no local da lesão, transformam-se em

cartilagem hialina com boa integração na cartilagem circundante e na placa óssea subcondral (Brehm *et al.* 2012).

Em modelos equinos, o impacto da aplicação de células estaminais mesenquimais na recuperação de defeitos osteocondrais foi estudado por Wilke *et al.* (2007), onde a utilização de células estaminais mesenquimais autólogas integradas numa matriz de fibrina melhorou a reparação precoce do defeito ósseo subcondral/espessura total da cartilagem da articulação femoropatelar. No entanto, 8 meses após o tratamento, no que diz respeito à presença de colagénio tipo II e proteoglicanos no tecido regenerativo, não se verificaram diferenças significativas em relação ao grupo controlo (aplicação de MSCs sem matriz de fibrina) (Brehm *et al.* 2012).

Em contraste aos casos de defeito focal da cartilagem, a osteoartrite é caracterizada por lesões mais abrangentes da superfície articular. Deste modo, a aplicação destas células diretamente no interior da cavidade articular constitui uma outra abordagem para o uso de células estaminais mesenquimais em articulações (Brehm *et al.* 2012).

Frisbie *et al.* (2009) ao induzir osteoartrite num equino por fragmentação osteocondral verificou que ocorreu uma redução significativa dos níveis de prostaglandina E₂ no fluido sinovial em resposta ao tratamento com células estaminais mesenquimais derivadas da medula óssea quando aplicadas no interior da articulação. Contudo, este efeito não foi observado no tratamento com células estaminais derivadas do tecido adiposo. Num estudo realizado por Raheja *et al.* (2011) verificou-se melhorias após a aplicação de células estaminais mesenquimais derivadas da medula óssea no tratamento de lesões da cartilagem articular no condilo femoral medial e no ligamento cruzado cranial. A avaliação artroscópica da articulação 4 meses após o tratamento inicial com células estaminais revelou um marcado aplanamento da superfície articular, redução da profundidade dos defeitos articulares e uma melhoria significativa na integridade do ligamento cruzado cranial.

Segundo Agung (2006) e Coleman *et al.* (2010), as células estaminais mesenquimais, na ausência de outros substratos, são capazes de aderir às superfícies da cartilagem articular. No entanto, vários estudos que utilizam marcadores celulares têm mostrado que, após aplicação intra-lesional, estas células localizam-se preferencialmente nos tecidos moles intra-articulares com pouca ou nenhuma aderência das células aplicadas na superfície articular e pouca ou nenhuma retenção dentro dos defeitos da cartilagem (Koga *et al.* 2008). Com base nestes resultados, os benefícios da aplicação intra-articular de células estaminais mesenquimais sobre a

cartilagem articular são provavelmente mediados por fatores solúveis ou por efeitos primários sobre outros tecidos articulares (Frisbie & Stewart 2011).

Embora a terapia intra-articular com células estaminais mesenquimais seja considerada controversa, a sua utilização pode ser suportado por uma pesquisa realizada em caprinos com osteoartrite (Murphy *et al.* 2003). Tal estudo demonstrou que as articulações tratadas com 10^6 células estaminais derivadas da medula óssea apresentavam regeneração acentuada em lesões experimentalmente induzidas que envolveram a ressecção do ligamento cruzado anterior e completa remoção do menisco medial. Além disso, verificou-se uma diminuição da degeneração da cartilagem articular, da remodelação osteofítica e da esclerose do osso subcondral em comparação com as articulações de controlo.

Sob condições inflamatórias intra-articulares, as células estaminais mesenquimais inibem a ativação dos linfócitos T e a secreção de citocinas e estimulam a secreção de interleucinas, reduzindo consequentemente a lesão do tecido articular. Além disso, estudos *in vitro* indicam que, em condições inflamatórias, as células estaminais mesenquimais antagonizam efetivamente a atividade das metaloproteinases (MMP) pela secreção de inibidores destas proteínas (Frisbie & Stewart 2011).

Ferris *et al.* (2009) referenciado por Brehm *et al.* (2012) obteve uma taxa de 73% de recuperação de lesões da cartilagem articular em 40 equinos, os quais voltaram ao seu nível atlético após tratamento intra-articular com 10^6 células estaminais mesenquimais derivadas da medula óssea combinadas com ácido hialurónico.

A aplicação de células estaminais expandidas *in vitro* diretamente no interior das articulações é atualmente a forma mais exequível e, por conseguinte, o modo de aplicação mais comum destas células na prática clínica (Brehm *et al.* 2012).

II. CASOS CLÍNICOS

Caso Clínico nº 1

História Clínica

O primeiro caso clínico refere-se a uma égua de 8 anos de idade, raça BWP, sendo um animal de saltos de obstáculos de competição. O animal foi apresentado à consulta no dia 21 de Outubro de 2011 devido a uma queixa do proprietário que relatou uma inflamação no membro anterior esquerdo (MAE). O exame físico apresentava-se normal. No exame estático, o MAE apresentava-se com inflamação na região dos tendões flexores, com dor à palpação profunda. No exame dinâmico não apresentava claudicação evidente.

Exames Complementares e Diagnóstico

Como exame complementar foi realizado um estudo ecográfico músculo-esquelético (Fig. 3) do membro afetado, no qual se observou uma zona hipoecogénica no tendão flexor digital profundo (TFDP) na zona 2A do MAE. Foi assim identificada a origem da dor presente na palpação, tendinite aguda do TFDP, na zona 2 A.

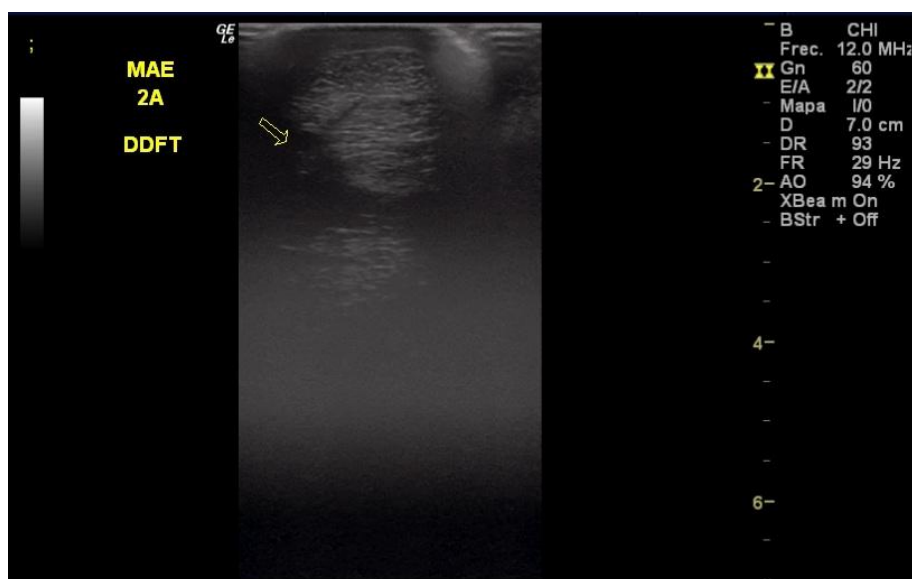


Figura 3 – Imagem ecográfica transversal da lesão do tendão flexor digital profundo do membro anterior esquerdo na zona 2A, realizada no dia 21 de Outubro de 2011 (cedido por Hippiatrica)

Tratamento

Não foi administrada qualquer medicação anti-inflamatória, tendo sido recomendada a realização de crioterapia, passeios diários à mão e a aplicação de ligaduras de descanso.

Foi agendada a cirurgia para recolha de tecido adiposo para obtenção de células estaminais mesenquimais para proceder ao tratamento da lesão utilizando as terapias regenerativas.

No dia 26 de Outubro de 2011 o animal apresentou-se na Clínica Hippiatrica para proceder à recolha de tecido adiposo da base da cauda (Fig. 4). A recolha do tecido adiposo foi realizada segundo o protocolo utilizado na clínica (Anexo I), seguindo as instruções da empresa FAT STEM® para a obtenção da amostra (Anexo II).

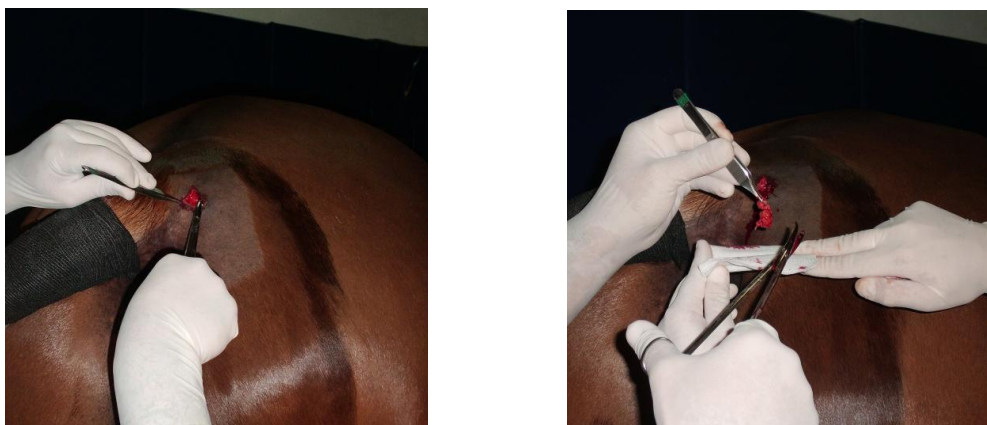


Fig.4 – Recolha da amostra (cedido por Hippiatrica)

A amostra foi transferida para um tubo estéril fornecido pelo kit Fat-Stem® e de seguida procedeu-se à recolha de 200ml de sangue periférico obtido por cateterização da jugular para uma bolsa fornecida no mesmo kit (Anexo VI) (Fig.5).



Fig. 5 – Material biológico enviado para laboratório (cedido por Hippiatrica)

As amostras foram devidamente acondicionadas segundo as instruções fornecidas e enviadas para a empresa Fat Stem® para obtenção e cultivo das células estaminais (Anexo II). Durante o período entre a recolha e a implantação das células estaminais foi recomendada a continuação da mesma terapia e maneio indicados na primeira consulta.

No dia 11 de Novembro de 2011, quinze dias após a recolha da amostra, as células estaminais isoladas e expandidas em laboratório, foram enviadas à Clínica Hippiatrica em 2 frascos com cerca de 1 ml cada. Este isolado de células estaminais, contendo mais de 30×10^6 células foi aplicado intralesionalmente, segundo as instruções fornecidas pela empresa Fat Stem® (Anexo II). De seguida foi aplicada uma ligadura coesiva e algodão no membro, mantendo-o ligado durante os 2 primeiros dias, e foi recomendado o repouso do animal na boxe durante os 15 dias seguintes à aplicação do tratamento.

Acompanhamento

O primeiro controlo ecográfico foi realizado no dia 18 de Novembro de 2011, no qual se observou, na secção transversal, uma redução da ecogeneidade na superfície medial do TFDP. Na secção longitudinal verificou-se uma diminuição da ecogeneidade com alguma desorganização das fibras tendinosas (Fig. 6 e 7).

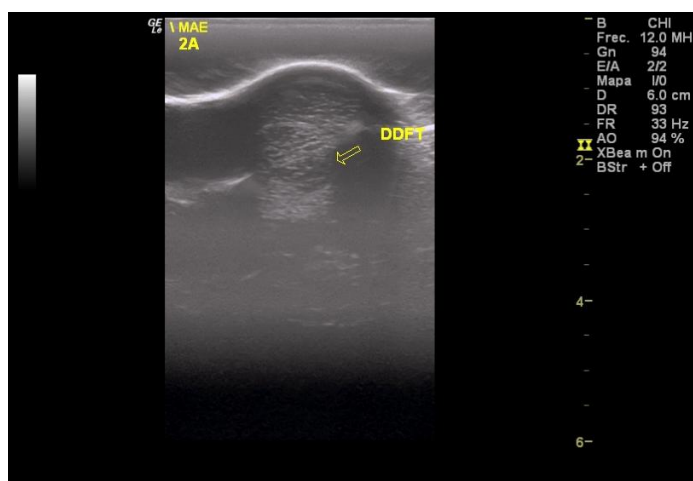


Fig. 6 - Imagem ecográfica transversal da lesão do TFDP do MAE na zona 2A, realizada 8 dias após o tratamento com células estaminais (cedido por Hippiatrica)

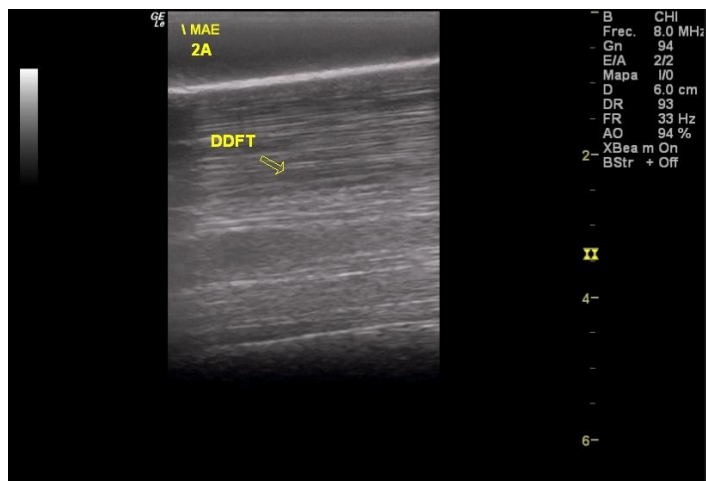


Fig. 7 - Imagem ecográfica longitudinal da lesão do TFDP do MAE na zona 2A, realizada 8 dias após o tratamento com células estaminais (cedido por Hippiatrica)

Após o período de repouso na boxe foi instituído um plano de reabilitação cujo modelo geral se encontra em anexo (Anexo III).

O segundo controlo ecográfico foi realizado no dia 01 de Dezembro de 2011, no qual se observou a presença de uma zona ligeiramente hipoecogénica mas com aumento da ecogenicidade no local da lesão relativamente ao controlo anterior. Verificou-se também um preenchimento no local da lesão com aumento da reorganização das fibras tendinosas (Fig. 8 e 9).

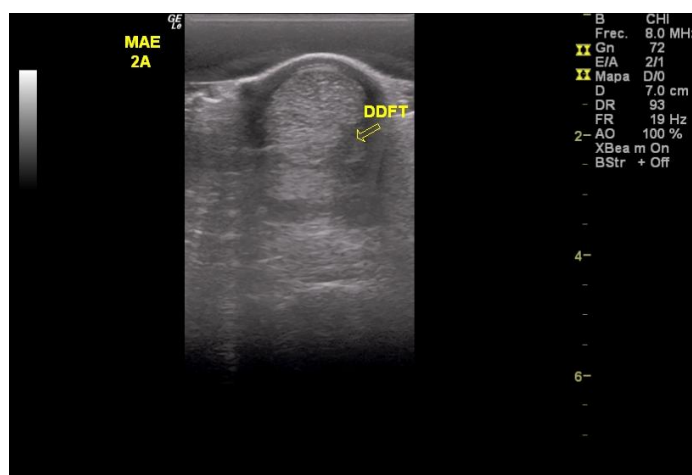


Fig. 8 - Imagem ecográfica transversal da lesão do TFDP do MAE na zona 2A, realizada 30 dias após o tratamento com células estaminais (cedido por Hippiatrica)

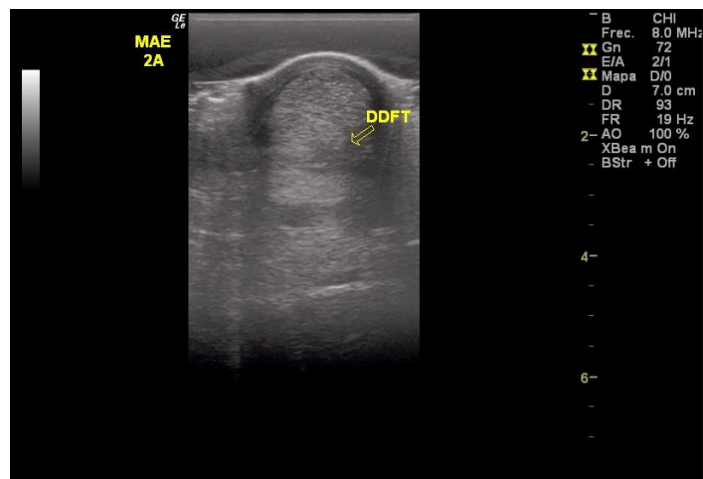


Fig. 9 - Imagem ecográfica transversal da lesão do TFDP do MAE na zona 2A, realizada 30 dias após o tratamento com células estaminais (cedido por Hippiatrica)

Apesar de não terem sido feitos mais controlos ecográficos, a égua apresenta-se clinicamente recuperada, após o plano de reabilitação e voltou ao mesmo nível de trabalho que realizava antes da ocorrência da lesão, tendo já retomado a sua atividade desportiva.

Caso Clínico nº 2

História Clínica

Este caso clínico diz respeito a um garanhão com 11 anos de idade, da raça Holstein, com aptidão de saltos, apresentando-se à consulta com claudicação do membro anterior direito (MAD) e membro posterior direito (MPD). Este animal apresentava história de claudicação recorrente do MAD e do MPD, e o proprietário relata terem sido realizados vários tratamentos intra-articulares com cortico-esteroides da articulação interfalângica distal (IFD) do MAD e a articulação fémuro-tibial lateral e medial do MPD anteriormente. No entanto, segundo o proprietário, na última aplicação o animal já não respondeu ao tratamento.

O exame físico do animal apresentava-se sem alterações. O exame estático não apresentou quaisquer anomalias. No exame dinâmico observou-se uma claudicação de 2/5 (AAEP) do membro anterior direito. Na realização dos testes de flexão observou-se uma resposta positiva na flexão da articulação interfalângica distal do MAD e na flexão da articulação femurotibiorotuliana (FTR) do MPD. Mediante os resultados obtidos até então, optou-se por fazer os bloqueios anestésicos peri-neurais com mepivacaína (mepivacaína, Braun), apresentando uma resposta positiva de 100% no bloqueio abaxial do MAD.

Exames Complementares e Diagnóstico

Para diagnosticar as causas de claudicação foram realizados os seguintes exames complementares:

Avaliação radiográfica da extremidade distal do MAD. Na projeção dorso-palmar 45 graus observou-se um aumento dos canais vasculares do osso navicular. (Fig. 10 A).

Avaliação radiográfica da articulação FTR do MPD nas projeções latero-medial e caudo-cranial da articulação, nas quais não foi observado nenhuma lesão aparente (Fig. 10 B e C).



Fig. 10 – Imagem radiográfica da extremidade distal do MAD (A), e da articulação FTR (B e C) (cedido por Hippiatrica)

Com base nos achados radiográficos do MAD não foi possível obter um diagnóstico definitivo em relação à lesão da articulação interfalanga distal, tendo sido remetido para avaliação por RM (Ressonância Magnética) (Fig. 11).

Segundo relatório de RM observou-se uma erosão da parte medial da cartilagem da articulação IFD, tendo sido diagnosticado artropatia da articulação interfalanga distal do MAD com erosão da cartilagem (Anexo IV).

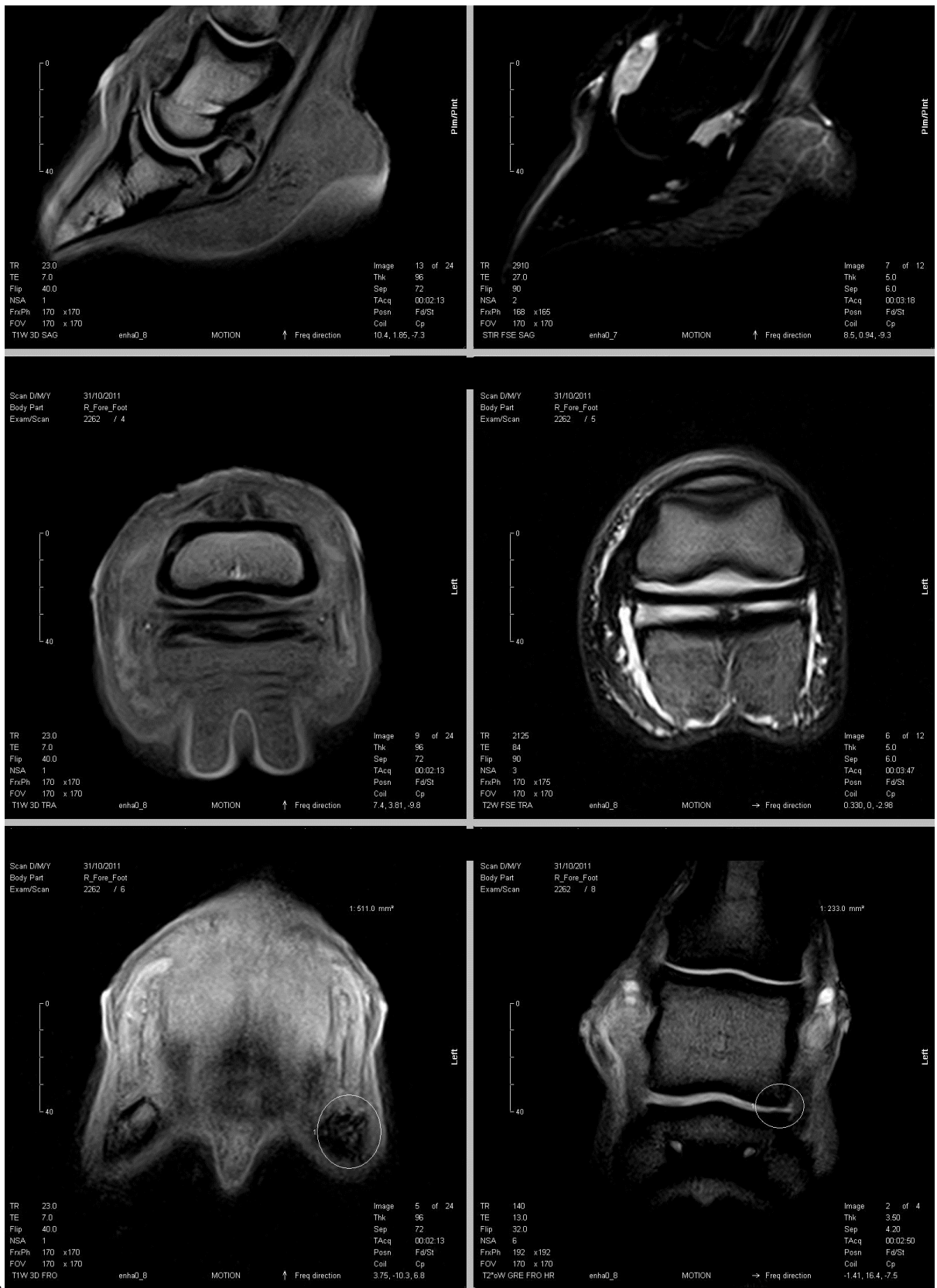


Fig. 11 – Imagem de RM da extremidade distal do MAD (cedido por Hippiatrica)

Tratamento

Segundo este diagnóstico o proprietário foi aconselhado pelo médico veterinário a fazer o tratamento desta articulação com células estaminais mesenquimais.

A recolha do tecido adiposo procedeu-se segundo o protocolo utilizado na clínica Hippiatrica (Anexo I), seguindo as instruções da empresa FAT STEM® para a obtenção da amostra (Anexo V). De seguida procedeu-se à recolha de sangue periférico como descrito no caso clínico anterior. As amostras foram devidamente acondicionadas e enviadas para laboratório segundo as indicações fornecidas pelo Kit (Anexos V e VI).

As células estaminais cultivadas e expandidas em laboratório foram enviadas ao clínico 15 dias após a recolha do tecido adiposo em 2 tubos com cerca de 1ml cada (Fig. 12). Nesta altura, o isolado de células estaminais contendo mais de 30×10^6 células foi aplicado no interior da articulação interfalângica distal por injeção intra-articular.



Fig. 12 – 2 Frascos com cerca de 1 ml cada contendo mais de 30×10^6 MSCs obtidas após 15 dias de cultura em expansão em laboratório (cedido por Hippiatrica)

Foi recomendado que o animal permanecesse na boxe durante os 15 dias seguintes à aplicação do tratamento. Após esse período foi instituído um plano de reabilitação do animal conforme o plano geral de reabilitação usado pela clínica Hippiatrica (Anexo III).

Acompanhamento

Não foram realizados controlos imagiológicos após a aplicação do tratamento intra-articular. No entanto, 5 meses após o tratamento, o animal encontrasse clinicamente recuperado sem apresentar claudicação. Segundo relatos do cavaleiro o animal voltou ao mesmo nível atlético que apresentava antes da ocorrência da lesão, tendo já entrado em competições.

Discussão

O presente relatório permitiu realizar uma revisão bibliográfica sucinta das terapias regenerativas utilizando células estaminais mesenquimais, no que diz respeito às suas características, bem como à sua aplicação no tratamento de lesões músculo-esqueléticas. Nos casos clínicos descritos, os meios auxiliares de diagnóstico utilizados foram essenciais para poder diagnosticar e posteriormente controlar a resposta ao tratamento.

O primeiro caso clínico apresentado trata-se de uma tendinite aguda no TFDP. Para além de o animal ter um elevado valor económico, os proprietários mostraram disponibilidade para investir no seu tratamento e por isso optou-se pela utilização deste tipo de terapias na tentativa de possibilitar uma regeneração completa da lesão e minimizar os riscos inerentes à formação de tecido cicatricial. Não foi aplicada nenhuma terapia anti-inflamatória uma vez que se tratava de uma lesão focal do tendão e porque a sua utilização deve ser ponderada quando se pretende realizar o tratamento com terapias regenerativas. O período entre o diagnóstico e a aplicação do tratamento intra-lesional foi de aproximadamente 3 semanas, o que vai de encontro ao proposto por Richardson *et al.* (2007) que indica que o período ótimo para a implantação das células estaminais seria após a fase inflamatória inicial mas antes da formação de tecido fibroso. Os controlos ecográficos permitiram observar um aumento da ecogeneidade do local da lesão com uma melhoria da reorganização das fibras tendinosas, constatando os resultados obtidos por Leppanen *et al.* (2009) após a aplicação de MSCs derivadas do tecido adiposo no tratamento de lesões de tendão.

No segundo caso clínico, a possibilidade da realização de RM permitiu a obtenção de um diagnóstico conclusivo da lesão na articulação interfalângica distal do MAD. Perante este diagnóstico, e tendo em conta o facto de se tratar de uma recidiva de lesão crónica, que segundo o proprietário do animal não respondeu ao tratamento com terapias convencionais, optou-se pelo tratamento com terapias regenerativas. Neste caso clínico não foram realizados controlos imagiológicos após a aplicação do tratamento. O meio de diagnóstico necessário para obter informações relativas à recuperação da cartilagem seria a realização de uma nova RM da extremidade distal do MAD, o que não foi possível devido ao seu elevado custo.

Os casos apresentados não demonstraram evidências conclusivas acerca do real valor terapêutico e das propriedades regenerativas das MSCs, são apenas casos meramente representativos da sua utilização na prática de medicina desportiva de equinos, em ambiente clínico. Contudo, os resultados observados nos dois casos clínicos são favoráveis e animadores em relação à aplicação deste tipo de terapias regenerativas. Apesar de não possuir imagens

diagnósticas que comprovem estes resultados, com base na avaliação clínica dos pacientes que apresentaram melhorias significativas, bem como na recuperação da performance atlética relatada pelos proprietários dos animais, é possível constatar estas evidências. No entanto, torna-se necessário o acompanhamento dos animais e a realização de controlos diagnósticos adequados que permitam comprovar a eficácia do tratamento na regeneração dos locais de lesão a longo prazo, essenciais para a creditação do sucesso terapêutico desta terapia.

Conclusão

As patologias músculo-esqueléticas pelo facto de apresentarem alta taxa de incidência bem como um prognóstico muitas vezes reduzido quando utilizados tratamentos convencionais, levaram a um crescente interesse por parte dos investigadores na tentativa de desenvolvimento de terapias eficazes na resolução dessas lesões. Deste modo, a utilização de células estaminais em medicina veterinária, para o tratamento de lesões agudas bem como de lesões crónicas está a tornar-se gradualmente numa prática clínica comum. As terapias regenerativas apresentam grande potencial como novas estratégias de tratamento para diversos tipos de lesões ortopédicas. No entanto, apesar de atualmente existirem resultados experimentais e clínicos promissores nesta área, seria fundamental a aposta em estudos prospectivos de grande escala para otimizar este tipo de terapias regenerativas com base em células estaminais de equinos.

III. BIBLIOGRAFIA

Agung M, Ochi M, Yanada S, Adachi N, Izuta Y, Yamasaki T, Toda K (2006) “Mobilization of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into the injured tissues after intraarticular injection and their contribution to tissue regeneration” **Knee Surgery Sports Traumatology Arthroscopy** 14, 1307-1314

Alves AGL, Stewart AA, Dudhia J, Kasashima Y, Goodship AE, Smith RKW (2011) “Cell-based Therapies for Tendon and Ligament Injuries” **Veterinary Clinics of North America Equine Practice** 27, 315-333

Arnhold SJ, Goletz I, Klein H, Stumpf G, Beluche LA, Rohde C, Addicks K, Litzke LF (2007) “Isolation and characterization of bone marrow-derived equine mesenchymal stem cells” **American Journal veterinary Research** 68, 1095-1105

Barreira APB, Alves ALG, Saito ME, Amorim RL, Kohayagawa A, Menarim BC (2008) “Autologous implant of bone marrow mononuclear cells as treatment of induced equine tendinitis” **International Journal Applied Research Veterinary Medicine** 6, 46-54

Barry FP, Murphy JM (2004) “Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization” **International Journal of Biochemistry Cell Biology** 36, 568-584

Berg L, Koch T, Heerkens T, Bessonov K, Thomsen P, Betts D (2009) “Chondrogenic potential of mesenchymal stromal cells derived from equine bone marrow and umbilical cord blood” **Vet Comp Orthop Traumatol** 22, 363-370

Borjesson DL, Peroni JF (2011) “The regenerative medicine laboratory: Facilitating stem cell therapy for equine disease” **Clin Lab Med** 31, 109-123

Braun J, Hack A, Weis-Klemm M, Conrad S, Treml S, Kohler K, Walliser U, Skutella T, Aicher WK (2010) “Evaluation of the osteogenic and chondrogenic differentiation capacities of equine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells” **American Journal Veterinary Research** 71, 1228-1236

Brehm W, Burk J, Delling U, Gittel C, Ribitsch I (2012) “Stem cell-based tissue engineering in veterinary orthopaedics” **Cell Tissue Research**

- Buckwalter JA, Mankin HJ (1998) "Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation" **Instruction Course Lectures** 47, 487-504
- Butler DL, Juncosa-Melvin N, Boivin GP (2008) "Functional tissue engineering for tendon repair: a multidisciplinary strategy using mesenchymal stem cells, bioscaffolds, and mechanical stimulation" **Journal of Orthopedic Research** 26, 1-9
- Carvalho AM, Alves AL, Oliveira PG, Álvarez LE, Amorim RL, Hussni CA, 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
- 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
- Coleman CM, Curtin C, Barry FP (2010) "Mesenchymal stem cells and osteoarthritis: Remedy or accomplice?" **Hum Gene Therapies** 21, 1239-1250
- 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 LA (2009) "Fat-derived mesenchymal stem cells for equine tendon repair" *In: World Conference on Regenerative Medicine, Regen Med Supplement* Vol 4, No 6
- da Silva Meirelles L, Sand TT, Harman RJ, Lennon DP, Caplan AI (2009) "MSC Frequency Correlates With Blood Vessel Density in Equine Adipose Tissue" **Tissue Engineering part A** 15, 221-229
- De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M (2003) "Comparison of multi lineage cells from human adipose tissue and bone marrow" **Cells Tissues Organs** 174, 101-109

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D (2006) “Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells” **The International Society for Cellular Therapy position statement, Cytotherapy** 8, 315-317

Ferris D, Frisbie DD, Kisiday J, McIlwraith CW, Hague B, Major M, Schneider R, Zubrod C, Watkins J, Kawcak C, Goodrich LR (2009) “Clinical evaluation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in naturally occurring joint disease” **Regenerative Medicine** 4, 16

Frisbie DD (2005) “Future directions in treatment of joint disease in horses” **Veterinary Clinics of North America Equine Practice** 21, 713-724

Frisbie DD, Kisiday JD, Kawcak CE, Werpy NM, McIlwraith CW (2009) “Evaluation of adipose-derived stromal vascular fraction or bone marrow-derived mesenchymal stem cells for treatment of osteoarthritis” **Journal Orthopaedics Research** 27, 1675-1680

Frisbie DD, Stewart MC (2011) “Cell-based Therapies for Equine Joint Disease” **Veterinary Clinics of North America Equine Practice** 27, 335-349

Fortier LA (2005) “Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications” **Vet Surg** 34, 415-423

Fortier LA, Travis AJ (2011) “Stem cells in veterinary medicine” **Stem Cell Research Therapy** 2, 9

Gimble JM, Guilak F (2003) “Adipose-derived adult stem cells: isolation characterization, and differentiation potential” **Cytotherapy** 5, 362-369

Giovannini S, Brehm W, Mainil-Varlet P, Nestic D (2008) “Multilineage differentiation potential of equine blood-derived fibroblast-like cells” **Differentiation** 2008 76, 118-129

Guest DJ, Smith MR, Allen WR (2008) “Monitoring the fate of autologous and allogeneic mesenchymal progenitor cells injected into the superficial digital flexor tendon of horses: preliminary study” **Equine Veterinary Journal** 40, 178-181

Gutierrez-Nibeyro SD (2011) “Commercial cell – based Therapies for Musculoskeletal injuries in horses” **Veterinary Clinics of North America** 27, 363-371

- Kasashima Y, Ueno T, Tomita A (2011) "Optimisation of bone marrow aspiration from the equine sternum for the safe recovery of mesenchymal stem cells" **Equine Veterinary Journal** 43, 288-294
- Kisiday JD, Kopesky PW, Evans CH, Grodzinsky AJ, McIlwraith CW, Frisbie DD (2008) "Evaluation of adult equine bone marrow- and adipose-derived progenitor cell chondrogenesis in hydrogel cultures" **Journal Orthopaedics Research** 26, 322-331
- Koch TG, Berg LC, Betts DH (2009) "Current and future regenerative medicine - Principles, concepts, and therapeutic use of stem cell therapy and tissue engineering in equine medicine" **Canadian Veterinary Journal** 50,155-165
- Koga H, Muneta T, Nagase T, Nimura A, Ju YJ, Mochizuki T, Sekiya I (2008) "Comparison of mesenchymal tissues-derived stem cells for in vivo chondrogenesis: suitable conditions for cell therapy of cartilage defects in rabbit" **Cell Tissue Research** 333, 207-215
- Leppanen M, Miettinen S, Makinen S, Wilpola P, Katiskalahti T, Heikkila P, Tulamo R-M (2009) "Management of equine tendon and ligament injuries with expanded autologous adipose-derived mesenchymal stem cells: a clinical study" *In: World Conference on Regenerative Medicine*, Regenerative Medicine Supplement Vol 4, No 6
- McCarthy HE, Bara JJ, Brakspear K, Singhrao SK, Archer CW (2011) "The comparison of equine articular cartilage progenitor cells and bone marrow-derived stromal cells as potential cell sources for cartilage repair in the horse" **The Veterinary Journal**
- Mochizuki T, Muneta T, Sakaguchi Y (2006) "Higher chondrogenic potential of fibrous synovium-and adipose synovium-derived cells compared with subcutaneous fat-derived cells" **Arthritis Rheum** 54, 843-853
- Murphy JM, Fink DJ, Hunziker EB, Barry FP (2003) "Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis" **Arthritis Rheumatism** 48, 3464-3474
- Najar M, Raicevic G, Boufker HI (2010) "Mesenchymal stromal cells use PGE2 to modulate activation and proliferation of lymphocyte subsets: combined comparison of adipose tissue, Wharton's Jelly and bone marrow sources" **Cellular Immunology** 264,171-179

- Najar M, Rouas R, Raicevic G (2009) “Mesenchymal stromal cells promote or suppress the proliferation of T lymphocytes from cord blood and peripheral blood: the importance of low cell ratio and role of interleukin-6” **Cytotherapy** 2009 11, 570-83
- Nixon AJ, Watts AE, Schnabel LV (2012) “Cell- and gene-based approaches to tendon regeneration” **Journal Shoulder Elbow Surgery** 21, 278-294
- Pacini S, Spinabella S, Trombi L, Fazzi R, Galimberti S, Dini F, Carlucci F, Petrini M (2007) “Suspension of bone marrow-derived undifferentiated mesenchymal stromal cells for repair of superficial digital flexor tendon in race horses” **Tissue Engineering** 13, 2949–2955
- Peroni JF, Borjesson DL (2011) “Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Activities of Stem Cells” **Veterinary Clinics of North America** 27, 351-362
- Poll RR, Meagher DM (1990) “Pathologic findings and pathogenesis of racetrack injuries” **Veterinary Clinics of North America** 6, 1-29
- Raabe O, Shell K, Wurtz A, Reich CM, Wenisch S, Arnhold S (2011) “Further insights into the characterization of equine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells” **Veterinary Research Communications** 35, 355-365
- Radcliffe CH, Flaminio MJ, Fortier LA (2010) “Temporal analysis of equine bone marrow aspirate during establishment of putative mesenchymal progenitor cell populations” **Stem Cells Dev** 19, 269-282
- Raheja LF, Galuppo LD, Bowers-Lepore J, Dowd JP, Tablin F, Yellowley CE (2011) “Treatment of Bilateral Medial Femoral Condyle Articular Cartilage Fissures in a Horse Using Bone Marrow-Derived Multipotent Mesenchymal Stromal Cells” **Journal of Equine Veterinary Science** 31, 147-154
- Ribitsch I, Burk J, Delling U, Geißler C, Gittel C, Julke H, Brehm W (2010) “Basic Science and Clinical Application of Stem Cells in Veterinary Medicine” **Adv Biochem Engineering/Biotechnology** 123, 219-263
- Richardson LE, Dudhia J, Clegg PD, Smith R (2007) “Stem cells in veterinary medicine – attempts at regenerating equine tendon after injury”, **Trends in Biotechnology** 9, 409-441

- Rossdale PD (1999) "Osteochondrosis and musculoskeletal development in the foal under the influence of exercise" **Equine Veterinary Journal Supplement** 31, 3
- Satija NK, Singh VK, Verma YK, Gupta P, Sharma S, Afrin F (2009) "Mesenchymal stem cell-based therapy: a new paradigm in regenerative medicine" **Journal Cell Mol Medicine** 13, 4385-4402
- Smith R, Young N, Dudhia J, Kasashima Y, Clegg PD, Goodship A (2009) "Effectiveness of bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells for naturally occurring tendinopathy in the horse" *In: World Conference on Regenerative Medicine*, Regen Medicine Supplement, Vol 4, No 6
- Stewart MC, Stewart AA (2011) "Mesenchymal Stem Cells: Characteristics, Sources, and Mechanisms of Action" **Veterinary Clinics of North America** 27, 243-261
- Stocum DL (2006) "Regeneration of musculoskeletal tissues" *In: Stocum DL, editor Regenerative biology and medicine*, Elsevier 221-249
- Stolzing A, Coleman N, Scutt A (2006) "Glucose-induced replicative senescence in mesenchymal stem cells" **Rejuvenation Research** 9, 31-35
- Sun B, Zhang X, Wang G (2010) "Regulation of suppressing and activating effects of mesenchymal stem cells on the encephalitogenic potential of MBP68-86- specific lymphocytes" **Journal Neuroimmunology** 226, 116-125
- Taylor SE, Clegg PD (2011) "Collection and Propagation Methods for Mesenchymal Stromal Cells" **Veterinary Clinics of North America Equine Practice** 27, 263-274
- Taylor SE, Vaughan-Thomas A, Clements DN, Pinchbeck G, Macrory LC, Smith RK, Clegg PD (2009) "Gene expression markers of tendon fibroblasts in normal and diseased tissue compared to monolayer and three dimensional culture systems" **BMC Musculoskeletal Disorders** 10, 27
- Vidal MA, Robinson SO, Lopez MJ, Paulsen DB, Borkhsenius O, Johnson JR, Moore RM, Gimble JM (2008) "Comparison of Chondrogenic Potential in Equine Mesenchymal Stromal Cells Derived from Adipose Tissue and Bone Marrow" **Veterinary Surgery** 37, 713-724

Woo SLY, Hildebrand K, Watanabe N, Fenwick JA, Papageorgiou CD, Wang JC (2008) “Tissue engineering of ligament and tendon healing” **Clinic Orthopaedics Related Research** 367, 312-323

Yarak S, Okamoto OK (2010) “Human adipose-derived stem cells: current challenges and clinical perspectives” **An Bras Dermatol** vol 85, No 5

IV. ANEXOS

Anexo I

Procedimento para recolha de tecido adiposo – Protocolo Clínica Hippiatrica


A região da base da cauda foi escolhida como o local de recolha de tecido adiposo. Os cavalos foram sedados com xilazina/butorfanol (0.5 mg/kg de xilazina (Xilagesic 20%, Calier) + 0.01mg/kg de butorfanol (Botomidol, Richter pharma)). Foi realizada tricotomia e desinfeção asséptica do local, seguida por infiltração da pele e tecido subcutâneo com um anestésico local, mepivacaína (mepivacaína, Braun), utilizando um bloqueio em linha. De seguida foi feita uma incisão de aproximadamente 5 cm paralela ao eixo da cauda, permitindo visualização de uma camada de tecido adiposo entre a pele e musculatura. Foi recolhido cerca de 30gr de tecido adiposo e armazenado num frasco de 50 ml estéril de tal modo que a amostra foi inteiramente submersa em NaCl 0.9%. A pele foi suturada com fio de PGA (Ácido poliglicólico nº1) com pontos simples.

Material utilizado:

- Kit básico de cirurgia
- Lâmina de bisturi nº 11
- Luvas estéreis
- kit comercial Fat Stem® - A complete regenerative solution for tendinopathy and ligament injuries (utilizado no caso clínico 1)
- Compressas estéreis
- Fio de sutura Ácido Poliglicólico nº1
- Omnifix® para proteção da ferida
- Kit comercial Fat Stem® - Kit for regeneration of subcondral defects in horses (utilizado no caso clínico 2)
- Algodão

Anexo II

Protocolo e instruções para recolha, acondicionamento e envio de amostras para laboratório

	FORM	
INSTRUCTIONS FOR USE PLATE-STEM		
Intended use:		
<p>Fat-Stem provides an efficient stem cell therapy product named "Plate-Stem" for the treatment of equine suspensory ligament injuries for horses using implantation of an autologous stem cell product. Plate-Stem combines the benefits of platelet-rich plasma with the regenerative effect of stem cells. Implants of stem cells into core suspensory branch lesions result in the formation of tissue organisationally similar to ligament structure which is a novel biological and clinical approach.</p>		
Collection of autologous horse material:		
<p>Fat-Stem provides a kit for the collection of horse material, blood and adipose tissue. The following steps have to be done by the vet after diagnosis:</p>		
<ol style="list-style-type: none">1. Send an e-mail to Fat-Stem (info@fat-stem.com) mentioning the date that the kit is ready in your vet practice. (before 10 am for a pick up the same day)2. After possible suppression of initial inflammatory reaction (using drugs, compression, cold therapy etc), a fat sample is taken at the tail basis (two tea spoons) under local anaesthetic and in aseptic sampling conditions. The fat tissue (20-30g) is transferred into a sterile tube which is available in the Fat-Stem kit.3. At the same time 200 ml blood is taken from the horse and collected in the blood bag provided in the kit.4. The blood and the fat biopsy are put into the kit separated by the blue gel pack and the ID form (horse identification) is filled in. Please stick the barcode label on the ID form, the blood bag and the fat tube. Keep the kit at room temperature.		
Injection of the therapeutical stem cell product after 15 days		
<p>The stem cell isolate (about 2 ml) will be shipped by Fat-Stem as an injectable suspension within 15 days after the sampling date. Under local anaesthesia and guided by ultrasonography the cells are injected into the lesion. A revalidation period of at least 6 months with controlled movements is essential and will improve the healing quality of the tendinopathy. Therefore subsequent echographies are advised to control the healing and to adapt the revalidation program.</p>		
FORM	Version 1	Page 1/1



ANIMAL IDENTIFICATION AND INFORMED CONSENT PLATE-STEM

1. Information about the horse (please print) :

Official Name:

sex F/M

Nick Name of the horse



Date of birth:

2. Intent of use:

- For autologous therapeutical use, the material will be limited to respectively the horse itself, as intended recipient(s).

3. Declaration:

- I declare that the purpose and the collection procedure and the purpose of further processing by Fat Stem have been clearly explained.
- Possible risks and benefits including medical and other concerns, have been explained.
- I confirm that I have been properly informed and that I received and clearly understood all the information given, and I declare I am satisfied for all the information given. In addition, I have received sufficient time to consider the information and I have had the opportunity to ask questions, to which I have received satisfying answers by my veterinary doctor or his authorized representative giving the information



Signature of the owner of the horse:

"I herewith give my informed consent for blood collection and fat biopsy."

Family Name:

Date signature (dd/mm/yyyy): //20

4. Declaration of the vet

Signature of the veterinarian doctor or authorised representative:

I declare that I apply Plate-Stem according to product specifications and accept that Fat-Stem is responsible for the product, but not for the therapy as such.

Dr.

Date signature(dd/mm/yyyy): //20

Signature or stamp: _____

Anexo III

Plano geral de reabilitação utilizado na Clínica Hippiatrica

Plano de Reabilitação

“NOME DO CAVALO”

Início:

Semanas:



1. Caminhar a passo por 30 min montado.
2. Caminhar a passo por 30 min montado, seguido de uma sessão de 10 min de : 3 min passo 1 min trote; finalizar com 25 min a passo.
3. Caminhar a passo por 30 min montado, seguido de uma sessão de 15 min de : 3 min passo 1 min trote; finalizar com 20 min a passo.
4. Caminhar a passo por 20 min montado, seguido de uma sessão de 25 min de : 3 min passo 1 min trote; finalizar com 20 min a passo.
5. Caminhar a passo por 15 min montado, seguido de uma sessão de 30 min de : 5 min passo 3 min trote e 1 min galope; finalizar com 20 min a passo.
6. Caminhar a passo por 15 min montado, seguido de uma sessão de 40 min de : 5 min passo 3 min trote e 1 min galope; finalizar com 15 min a passo.
7. Caminhar a passo por 15 min montado, seguido de uma sessão de 40 min de : 2 min passo 2 min trote e 2 min galope; finalizar com 15 min a passo.

Hippiatrica
Equine Medical Center

Anexo IV

Relatório de RMI



Moerbeke-Waas, 31-10-11

Spelonckvaart 46
B-9180 Moerbeke-Waas
tel + 32 9 346 76 18
fax + 32 9 346 71 99
mail : info@bosdreef.be
URL : www.bosdreef.be

History :

Request MRI RF foot/pastern.

Clinical exam :

MRI

Sequences: RF foot

- T1 GE sag, front, trans
- T2 FSE trans / T2* GE front
- STIR FSE sag, front

Remarks

- Thinning / erosion of the medial part of the cartilage of the DIP joint.
- hypointense signal intensity on all sequences in the medial palmar processes of the pedal bone.
- no significant DDFT, collateral ligament, nor navicular bone pathology.

Fetlock RF: T1 GE sag, front, trans / T2 FSE trans / STIR FSE front

Remarks

- minor bone densification in the subchondral bone of the dorsomedial part of the distal cannon bone.
- there's some diffuse increased STIR signal intensity in the midsagittal part of the proximal phalanx.

Conclusion :

- 1/ Arthropathy of the DIP joint RF. Cartilage erosions.
- 2/ Bruising of the medial palmar process of P3.
- 3/ Bone bruising of the proximal phalanx.
- 4/ Minor arthropathy of the fetlock joint.

Treatment :

See together with Dr. Torrealba.

Advise

- IRAP treatment DIP joint.
- Tildren via regional perfusion.
- Rolling shoes.

If you require any supplementary information, do not hesitate to contact us.
Thank you for referring this patient.

STEM	FORM	
INSTRUCTIONS FOR USE CHONDRO-STEM		
<p>Intended use</p> <p>Fat-Stem provides an efficient stem cell therapy product named "Chondro-Stem" for the treatment of focal osteochondral defects and subchondral lesions, cysts (in various joints) causing lameness in horses. Implantation of an autologous, adipose tissue stem cell-derived chondrogenic product improves manifestations of osteochondrosis: hyaline-like elastic, firm, translucent cartilage fills the peripheral area of the defect after 12 weeks. This type of hydrogel based implants is a novel biological and the injectable cell-seeded matrix should be delivered arthroscopically in the clinic. In case arthroscopy is not done/possible, an injection in the joint is advised.</p>		
<p>Collection of autologous horse material</p> <p>Fat-Stem provides a kit for the collection of horse blood and adipose tissue. The following steps have to be done by the vet after diagnosis:</p> <ol style="list-style-type: none">1. Send an e-mail to Fat-Stem (info@fat-stem.com) mentioning the date that the kit is ready in your vet practice. (one day up front or at least before 10 am for a pick up the same day)2. A fat sample is taken at the tail basis (two tea spoons) under local anaesthetic and in aseptic sampling conditions. The fat tissue (20-30g) is transferred into a sterile tube which is available in the Fat-Stem kit. <u>Keep the samples at 4-8°C.</u>3. At the same time 200 ml blood is taken from the horse and collected in the blood bag provided in the kit.4. The blood and the fat biopsy are put into the kit separated by the blue gel pack (frozen) and the ID form (horse identification) is filled in. Please stick the barcode label on the ID form on the blood bag and on the fat tube.		
FORM	Version 1	Page 1/1

Anexo VI

Kits comerciais disponíveis pela empresa Fat Stem® para o acondicionamento e envio de amostras para laboratório

