

PLASMA RICO EM PLAQUETAS E CÉLULAS TRONCO NO TRATAMENTO DE DESMOPATIA DOS LIGAMENTOS COLATERAIS DISTAIS EM EQUINO

(Platelet-rich plasma and stem cells in the treatment of desmopathy of the distal collateral ligaments in equine)

Beatriz d'Almeida Prazeres SILVA^{1*}, Lívia Freitas SOUSA¹, Emanuel Pinheiro de AZEVEDO², Gustavo Fernandes VIANA², José Ferreira NUNES³, Leonardo Tondello MARTINS¹, Natália Pereira Paiva FREITAS³

¹Universidade de Fortaleza, Av. Washington Soares, 1321. Edson Queiroz, Fortaleza, CE, CEP: 60.811-905; ²Médico Veterinário Autônomo; ³Universidade Estadual do Ceará. *Email: b.dalmeidaa@gmail.com

RESUMO

Os equinos são animais muito utilizados em eventos esportivos, sendo, desta forma, propensos a sofrer acidentes que podem levar a lesões articulares e ósseas. Na rotina clínica, artifícios como o uso de raio X e ultrassonografia são de grande importância para que o correto diagnóstico seja feito e a conduta clínica possa ser melhor planejada. Além disso, alguns biomateriais, como o plasma rico em plaquetas (PRP) e células-tronco mesenquimais (CTMs), têm se inserido nos protocolos terapêuticos, demonstrando grande efetividade no tratamento desse tipo de lesão, devido à grande quantidade de fatores de crescimento presentes em ambos os biomateriais. O PRP é um derivado sanguíneo, caracterizado pela alta concentração plaquetária. Foi produzido a partir de duas centrifugações, a primeira para separar o plasma das hemácias e a segunda para concentrar as plaquetas. As CTMs foram isoladas de tecido adiposo, cultivadas, transportadas e aplicadas de forma autóloga, assim como o PRP. No presente relato, um equino, fêmea, Brasileiro de Hipismo com 8 anos, foi diagnosticado com desmopatia nos ligamentos colaterais da articulação interfalângica distal e foi tratado com PRP e CTMs, de forma associada e sequencial. Foi encontrada uma melhora do quadro clínico, significativa, em comparação aos dados encontrados na literatura, demonstrando grande potencialidade do uso associado de PRP e CTMs no tratamento de lesões ligamentares.

Palavras-chave: Equino, PRP, CTMs, diagnóstico, tratamento.

ABSTRACT

Horses are animals widely used in sporting events and are therefore prone to accidents that can lead to joint and bone injuries. In the clinical routine, devices such as the use of X-ray and ultrasound are of great importance for the correct diagnosis to be made and the clinical conduct can be better planned. In addition, some biomaterials such as platelet-rich plasma (PRP) and mesenchymal stem cells (MSCs) have been included in the therapeutic protocols, demonstrating great effectiveness in the treatment of this type of injury due to the large amount of growth factors present in both biomaterials. PRP is a blood derivative, characterized by high platelet concentration. It is produced from two centrifugations, the first to separate plasma from red blood cells and the second to concentrate platelets. MSCs were isolated from adipose tissue, cultured, transported and applied autologously, as well as PRP. In the present report, an 8-year-old female Brazilian equestrian horse was diagnosed with desmopathy in the collateral ligaments of the distal interphalangeal joint and was treated with PRP and MSCs in an associated and sequential manner. A significant improvement in the clinical picture was found in comparison to the data found in the literature, demonstrating great potential of the associated use of PRP and MSCs in the treatment of ligament injuries.

Key words: Equine, PRP, MSCs, diagnosis, treatment.

INTRODUÇÃO

A terapia regenerativa está consolidada, nacional e internacionalmente, como alternativa de altíssimo valor para o tratamento clínico e cirúrgico, em múltiplas espécies

animais, com destaque para equinos e caninos (MALHOTRA *et al.*, 2013; BROECKX *et al.*, 2014; LAITINEN *et al.*, 2016; WAHL *et al.*, 2015; ZHOU *et al.*, 2016; ORSI *et al.*, 2017).

Na medicina equina, devido ao grande esforço físico exigido em competições, observa-se uma alta incidência de lesões tendíneas, ligamentares e articulares. A partir disso, o trabalho em excesso tem sido responsável por diversas patologias do sistema locomotor, devido à sobrecarga de estruturas anatômicas (PORTAL, 2016). A terapia regenerativa, mediante uso de células-tronco mesenquimais (CTMs) e plasma rico em plaquetas (PRP), tem ganhado destaque crescente no tratamento de de lesões em cavalos de alta performance (BROECKX *et al.*, 2014).

As CTMs se localizam na medula óssea e em outros locais, como o tecido adiposo. Na presença de um estímulo apropriado, elas se diferenciam, *in vivo* e *in vitro*, em adipócitos, condrócitos, osteoblastos, tenócitos, fibroblastos e miofibroblastos, além de sintetizar múltiplos fatores que promovem a regeneração e o remodelamento tecidual (BITTENCOURT *et al.*, 2016). Outro aspecto refere-se à capacidade de reconhecimento de moléculas teciduais quimiotáticas, tropismo e capacidade migratória, desta forma, as CTMs identificam, se direcionam e habitam tecidos alterados, lesionados, inflamados e/ou fibrosados (MELESHINA *et al.*, 2015).

O PRP é um bioproduto derivado do plasma sanguíneo, que possui alta concentração plaquetária, variando em cerca de 3 a 5 vezes acima do valor de referência para sangue total, nas diferentes espécies (BURNOUF, 2013). Interessantemente, na perspectiva do reparo tecidual envolvido na fisiologia do processo regenerativo e cicatricial, a ação de plaquetas é marcadamente influenciada pela ação de fatores de crescimento, como o fator β de crescimento transformador (TGF β), o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator de crescimento fibroblástico (FGF), entre outros, que auxiliam e favorecem a proliferação celular, a angiogênese e a formação de tecido de granulação (ANITUA, 2007).

É nesse amplo espectro funcional que reside o vasto potencial terapêutico das CTMs e do PRP, bem como sua aplicabilidade comercial para o segmento veterinário e biotecnológico (BITTENCOURT *et al.*, 2016). Até a atualidade, CTMs e PRP têm sido utilizados na terapia regenerativa de forma majoritariamente isolada, embora possa haver um efeito complementar se utilizados de forma associada, haja vista a mobilização simultânea de seus componentes, durante o processo regenerativo fisiológico (ANITUA, 2007). Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi relatar o uso de PRP e CTMs no tratamento de desmopatia dos ligamentos colaterais da articulação interfalângica distal em equino.

ATENDIMENTO AO PACIENTE

Foi atendido um equino, fêmea, da raça Brasileiro de Hipismo com 8 anos de idade, pesando 550kg, com histórico de claudicação aguda e súbita, grau IV no membro anterior esquerdo. Não foi administrada medicação, passando diretamente para o exame clínico. Durante o exame clínico, foi observado que o animal sentia bastante dor ao colocar o membro no solo, foi realizado o exame da pinça de casco, com resultado negativo. Foi observado também aumento de volume na região dos ligamentos colaterais. Ao teste de palpação houve muita reação, demonstrando dor intensa. Como o local de dor já havia sido identificado, não

foi necessário realizar testes de flexão e o animal foi encaminhado direto para o exame de raio x, sendo possível identificar a presença de osteófitos do aspecto dorsal das articulações interfalanganas proximais e distais, no aspecto palmar da segunda falange e na superfície articular do sesamóide distal.

Associada ao exame radiográfico, foi também realizada ultrassonografia da região da quartela, para avaliação dos ligamentos colaterais da articulação interfalangeana distal. Observou-se moderado (1,42cm) e importante (1,70cm) aumento de espessura e abaulamento de central a periférico do ligamento colateral lateral e medial da articulação interfalangeana distal, respectivamente (Fig. 01 e 02), assim como contornos irregulares, ecotexturas heterogêneas e moderada perda de paralelismo entre suas fibras ligamentares. Adicionalmente, foi visibilizada discreta e importante irregularidade da superfície óssea da 2ª falange, em topografia de êntese do ligamento colateral lateral e medial, respectivamente.



Figura 01: Imagem no plano transversal do LCM da articulação interfalângica distal, em região de êntese proximal (2ª falange), antes da aplicação de PRP e CTMs.

Obs.: O LCM mediu 1,70 cm de espessura. As setas amarelas indicam uma superfície óssea irregular da 2ª falange, sugerindo importante entesopatia.



Figura 02: Imagem no plano transversal do LCL da articulação interfalângica distal, em região de êntese proximal (2ª falange), antes da aplicação de PRP e CTMs.

Obs.: O LCL mediu 1,42 cm de espessura. A seta amarela indica uma discreta irregularidade da superfície óssea irregular da 2ª falange.

Dentre as impressões diagnósticas, pôde-se sugerir desmites crônicas dos ligamentos colaterais da articulação interfalangeana distal em região de êntese proximal (afecção mais

acentuada no ligamento colateral medial), moderada entesopatia da êntese proximal do ligamento colateral medial, e discreta desmopatia do ligamento sesamóide reto.

Após o diagnóstico, o animal foi encaminhado para o tratamento baseado no uso associado de PRP e CTMs:

(i) Produção de PRP: foram utilizados 10 tubos de sangue de 5mL, com anticoagulante citrato de sódio (BD Vacutainer®). Foi utilizado o sistema de processamento sanguíneo baseado no uso de duas centrifugações consecutivas (DHURAT *et al.*, 2014). O sangue total foi inicialmente aliquotado em dois tubos, de 50mL e 25mL cada. A primeira centrifugação, procedida para separar as hemácias do plasma sanguíneo, foi realizada a 720g, por 10 minutos, em temperatura de 15 °C. Em ambiente estéril, o plasma sanguíneo foi retirado e redistribuído em tubos de 50mL, para a segunda etapa de centrifugação, que foi executada a 2170g, por 20 minutos, em temperatura de 15 °C (Fig. 03). Após a segunda etapa, o plasma pobre em plaquetas, presente no sobrenadante, foi descartado e os 5mL finais de cada tubo foi armazenado em seringas de 5mL, colocado em caixa de transporte com gelo, aproximadamente a 15 °C, para transporte até a hípica e utilização imediata, ou seja, em média de 20 minutos após seu processamento.



Figura 03: Processamento e aplicação de PRP.

OBS.: (3a) Produto obtido após a primeira centrifugação para separação do plasma das células vermelhas; (3b) Plasma após a segunda centrifugação para separação do sobrenadante (plasma pobre em plaquetas) e PRP (5mL finais).

(ii) Preparo de CTMs isoladas de tecido adiposo: a coleta de tecido adiposo foi realizada a partir do próprio paciente para posterior aplicação autóloga. Durante o procedimento de coleta, o animal foi mantido em tronco de contenção, sedado por via intravenosa, com Detomidina (Agener União) 40µg/kg, e submetido à anestesia local, com 10mL de Lidocaína 2% (Hipolabor). A coleta de gordura foi realizada na região acima do músculo glúteo dorsal (base da cauda), conforme Carvalho *et al.* (2011). O material foi enviado ao laboratório sob refrigeração em caixas de isopor, para isolamento, cultivo e multiplicação celular.

O isolamento das CTMs foi realizado de acordo com Carvalho *et al.* (2011), com modificações. O tecido adiposo foi lavado com solução salina tamponada com fosfato (PBS - *phosphate-buffered saline*) adicionada de 1% de solução antibiótica/antimicótica (Sigma-

Aldrich, EUA), fragmentado com o uso de bisturi e submetido ao processo de digestão enzimática com colagenase tipo 1 (Invitrogen, USA), na concentração de 1mg/mL, a 37 °C por 60-90 minutos. O material digerido foi filtrado e centrifugado para concentração das CTMs. O processo de cultivo celular foi procedido em meio DMEM - *dulbecco minimal essential medium* (Gibco, EUA), adicionado de solução antibiótica/antimicótica 1% (Sigma-Aldrich, EUA) e soro fetal bovino 10% (Gibco, EUA), em incubadora a 37 °C com umidade saturada e 5% CO₂ até a terceira passagem. Antes da aplicação, as células foram tripsinizadas, o meio de cultivo foi descartado e as células passaram por banhos sucessivos com PBS, para eliminar vestígios do soro fetal bovino, que pode ser imunogênico. O tubo de 15mL, com o pellet de células, foi adicionado de 3mL de PBS, homogeneizado e centrifugado a 1200rpm, por 10 minutos, esse processo foi repetido mais duas vezes. As células foram armazenadas em uma caixa de isopor com gelo e transportadas até o local de aplicação.

(iii) aplicação de PRP e CTMs: Para a aplicação de PRP e CTMs, o animal foi mantido em brete de contenção e sedado por via intravenosa, com o uso de Detomidina (Agener União) 40µg/kg. O procedimento foi realizado após a delimitação da lesão por exame ultrassonográfico. Em seguida, foi realizada a tricotomia e antissepsia do local. Foram aplicados 3mL de PRP por via periligamentar, divididos em 0,2mL por ponto de aplicação, seguido por 2mL pela via intracapsular, na articulação interfalangeana distal, guiado por ultrassonografia (Fig. 04). O animal permaneceu em repouso e estabulado em baia após a aplicação de PRP.



Figura 04: Aplicação de PRP guiada por ultrassonografia.

Trinta dias após a aplicação de PRP, o animal foi submetido ao tratamento com CTMs, recebendo uma aplicação de aproximadamente 25×10^6 de células diluídas em 2,5mL de PBS. Para isso, 1,5mL foram aplicados por via perilesional, sendo divididos em pontos de aplicação de 0,2mL cada, e 1mL na articulação interfalangeana distal. O animal permaneceu em repouso por um período de quinze dias. Após esse prazo, foi iniciado um protocolo de reabilitação, com exercício controlado, durante trinta dias. Inicialmente, o equino realizou atividade puxado ao passo, durante 15 minutos, por dez dias. Em seguida, foi recomendado passo durante 15 minutos e 10 minutos de trote em guia realizada pelo tratador, durante dez

dias. Nos últimos dez dias, foi iniciado o passo montado por 10 minutos e passo ao trote por 10 minutos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O repouso e o exercício controlado são fundamentais na recuperação e tratamento de lesões nos ligamentos colaterais (LCs) da articulação interfalângica distal (IFD) e devem ser rigorosamente respeitados, de forma a permitir uma adequada cicatrização dos ligamentos. Este processo de cicatrização pode demorar cerca de cinco meses (TURNER e SAGE, 2002). Em relação ao tratamento, é indicado o uso de anti-inflamatórios sistêmicos, infiltrações articulares com ácido hialurônico e corticosteróides, no entanto, novas terapias intralesionais, baseadas no uso de PRP, CTMs, fatores de crescimento e outros produtos biológicos, têm sido relatadas com bastante frequência na clínica de equinos (RABBA *et al.*, 2011).

No presente estudo, sete dias após a aplicação de PRP, foi observado que o animal já apresentava melhora do quadro clínico, ausência de claudicação (grau 0) ao passo e maior intensidade ao colocar o membro no solo. Ao trote, ainda apresentava claudicação grau 2, porém, havia ausência de dor ao realizar pressão sobre a região referente ao ligamento colateral medial. Trinta dias após o tratamento com PRP, o animal passou por um novo exame físico e ultrassonográfico, onde foi observada uma melhora significativa, por meio da ausência de claudicação ao passo e moderada ao trote.

O efeito terapêutico do PRP está embasado no fato de que as plaquetas começam a secretar fatores de crescimento e outras moléculas bioativas cerca de 10 minutos após sua ativação e permanecem secretando-os por até sete dias (SENZEL *et al.*, 2009). Os diversos fatores e moléculas secretadas constituem peptídeos sinalizadores importantes na reparação tecidual, pois promovem diferenciação, quimiotaxia e indução de migração celular, além de promover a síntese de matriz extracelular (ANITUA *et al.*, 2004; EVERTS *et al.*, 2006). Clinicamente, os resultados deste trabalho estão de acordo com os relatos de Carmona *et al.* (2009), que descreveram resultados favoráveis ao uso de PRP no tratamento de casos de desmites e osteoartrites, obtendo melhora clínica no grau de claudicação (DL) e derrame articular (JE) em todos os animais tratados com concentrado de plaquetas autólogo do estudo.

Trinta dias após a aplicação de PRP, foi realizada a infiltração de CTMs. Esse intervalo de tempo foi necessário em virtude da indisponibilidade de CTMs para aplicação imediata, assim que o animal apresentou a lesão. Nesse sentido, foi primeiramente necessário realizar a coleta de tecido adiposo, o cultivo e a multiplicação celular em laboratório. O tratamento com CTMs foi baseado em resultados favoráveis reportados por diversos estudos que utilizaram esta abordagem no tratamento de lesões ortopédicas, tendinosas e ligamentares (RICHARDSON *et al.*, 2007; MONTEIRO *et al.*, 2008; NIXON *et al.*, 2008). Nesse sentido, tem sido demonstrado que CTMs produzem um conjunto diversificado de moléculas bioativas, muitas delas com papel imunomodulador (AGGARWAL e PITTENGER, 2005), assim como sintetizam múltiplos fatores que promovem a regeneração e o remodelamento tecidual (CAPLAN e CORREA, 2011), através de rotas bioquímicas que envolvem atividades como inibição da apoptose, estímulo da angiogênese, mitogênese e efeito antifibrótico (SORRELL *et al.*, 2009).

Quatro meses após a aplicação do PRP e três meses após a aplicação de CTMs, um novo exame ultrassonográfico foi realizado. Na avaliação ultrassonográfica, os ligamentos colaterais da articulação interfalangeana distal em região de êntese proximal (2^a falange) apresentaram contornos irregulares e ecotexturas moderadamente heterogêneas. O ligamento colateral medial e lateral apresentaram-se abaulados e medindo aproximadamente 1,65cm e 1,17cm de espessura, respectivamente. Adicionalmente, observou-se moderada irregularidade da superfície óssea em região de êntese proximal do ligamento colateral medial. Desse modo, comparando o exame ultrassonográfico anterior e após a aplicação de PRP e CTMs, podemos inferir que houve melhora da desmíte crônica e resolução do processo de reagudização verificado em ambos os ligamentos colaterais distais, uma vez que estes ligamentos apresentaram redução de suas respectivas espessuras, ecotexturas menos heterogêneas e ausência de perda de paralelismo entre suas fibras ligamentares. Além disso, verificou-se redução da irregularidade das superfícies ósseas da 2^a falange, em região de êntese do ligamento colateral medial, sugerindo também melhora do quadro de entesopatia do respectivo ligamento. Na êntese proximal do ligamento colateral lateral, não foi mais observada discreta irregularidade óssea.



Figura 04: Imagem no plano transversal do ligamento colateral medial (LCM) da articulação interfalângica distal, em região de êntese proximal (2^a falange), após aplicação de PRP e CTMs.

Obs.: O LCM mediu 1,65cm de espessura. A seta amarela indica uma discreta irregularidade da superfície óssea da 2^a falange.

Embora terapias com PRP e CTMs tenham se popularizado como importantes opções terapêuticas para a clínica e cirurgia animal, pode-se inferir que o seu efeito regenerativo, no tratamento de múltiplas lesões, poderia ser otimizado se forem usadas em associação (PITTENGER, 1999; BARBASH *et al.*, 2003; BIEBACK *et al.*, 2012; KANG *et al.*, 2012). Essa afirmativa está embasada no fato de haver complementaridade no que se refere à diversidade de fatores de crescimento secretados e efeitos exercidos através do uso terapêutico de PRP e CTMs. Exemplificando, CTMs apresentam um potente efeito imunomodulador quando comparado ao PRP, enquanto alguns fatores de crescimento, como o PDGF (*platelet-derived growth factor*), são fornecidos em concentração consideravelmente superior a partir do uso de PRP em comparação a CTMs (MEIRELLES *et al.*, 2008; KUSHIDA *et al.*, 2014). Ainda, o PRP oferece um microambiente favorável para proliferação

e diferenciação de CTMs, além de atrair populações de CTMs endógenas, acelerando o processo de regeneração tecidual (RUBIO *et al.*, 2005; YAMADA, 2011).

Baseado na escala definida pela *American Association of Equine Practitioners - AAEP* (SWANSON, 1984), o animal apresentava grau 4 (escala de 0-5) de claudicação, quando foi examinado pela primeira vez, e evoluiu para grau 1, após quatro meses de tratamento utilizando PRP e CTMs. Observou-se, neste caso, uma melhora clínica precoce, avaliada por meio da diminuição do grau de claudicação, acompanhada de um aumento da qualidade ligamentar analisado por ultrassonografia, quando comparado a quadros resultantes de tratamentos convencionais que não utilizam PRP e/ou CTMs. Os resultados favoráveis alcançados no presente estudo envolvendo o tratamento de lesão ligamentar corroboraram a potencialidade do uso de PRP e CTMs de forma associada.

CONCLUSÕES

Esse estudo demonstrou, por meio de avaliações clínicas e ultrassonográficas, que o uso de PRP e CTMs, de forma associada, resultou na recuperação precoce de um quadro de desmopatia dos ligamentos colaterais da articulação interfalangeana distal. Estudos posteriores direcionados à realização de ensaios clínicos em maior escala e incluindo análises histológicas mais detalhadas deverão ser realizados para investigar de forma mais ampla e profunda a eficácia alcançada com o uso associado de PRP e CTMs, no tratamento de lesões ligamentares.

REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, S.; PITTENGER, M.F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, v.105, n.4, p.1815-1822, 2005.
- ANITUA, E.; ANDIA, I.; ARDANZA, B.; NURDEN, P.; NURDEN, A.T. Autologous platelet source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thrombosis and Haemostasis*, v.91, n.1, p.4-15, 2004.
- ANITUA, E.; SÁNCHEZ, M.; ORIVE, G. The potential impact of the preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields. *Biomaterials*, v.28, n.31, p.4551-4560, 2007.
- BARBASH, I.M.; CHOURAQUI, P.; BARON, J.; FEINBERG, M.S.; ETZION, S.; TESSONE, A.; MILLER, L.; GUETTA, E.; ZIPORI, D.; KEDES, L. H.; KLONER, R.A.; LEOR, J. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: Feasibility, Cell Migration and Body Distribution. *Circulation*, v.108, n.7, p.863-868, 2003.
- BIEBACK, K.; WUCHTER, P.; BESSER, D.; FRANKE, W.; BECKER, M.; OTT, M.; PACHER, M.; MA, N.; STAMM, C.; KLUTER, H.; MULLER, A.; HO, A.D. Mesenchymal stromal cells (MSCs): science and fiction. *Journal of Molecular Medicine*, v.90, n.7, p.773-782, 2012.

BITTENCOURT, M.K.W.; BARROS, M.A.; MARTINS, J.F.P.; VASCONCELLOS, J.P.C.; MORAIS, B.P.; POMPEIA, C.; BITTENCOURT, M.D., EVANGELHO, K.S.; KERKIS, I.; WENCESLAU, C.V. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in dogs with keratoconjunctivitis sicca. *Cell medicine*, v.8, n.3, p.63-77, 2016.

BROECKX S.; ZIMMERMAN M.; CROCETTI S.; SULS, M.; MARIE, T.; FERGUSON, S.J.; CHIERS, K.; DUCHATEAU, L.; OBREGO-FRANCO, A.; WUERTZ, K.; SPAAS, J.H. Regenerative therapies for equine degenerative joint disease: a preliminary study. *PLoS One*, v.9, n.1, p.1-11, 2014.

BURNOUF, T.; GOUBRAN, H.A.; CHEN, T.M.; OU, K.L.; EL-EKIABY, M.; RADOSEVIC, M. Blood-derived biomaterials and platelet growthfactors in regenerative medicine. *Elsevier*, v.27, n.2, p.77-89, 2013.

CAPLAN, A.I.; CORREA, D. The MSC: an injury drugstore. *Cell stem cell*, v.9, n.1, p.11-15, 2011.

CARMONA, J.U.; LÓPEZA, C.; PRADESB, M. Uso de concentrados autólogos de plaquetas obtenidos mediante el método del tubo como tratamiento de artropatías en caballos. *Archivos de Medicina Veterinária*, v.41, n.2, p.175-179, 2009.

CARVALHO, A.M.; ALVES, A.L.G.; OLIVEIRA, P.G.G.; ALVAREZ, L.E.C.; LAUFER-AMORIM, R.; HUSSNI, C.A.; DEFFUNE, E. Use of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for experimental tendinitis therapy in equines. *Journal Equine Veterinary Science*. v.31, n.1, p.26–34, 2011.

DHURAT, R.; SUKESH, M.S. Principles and Methods of Preparation of Platelet-Rich Plasma: A Review and Author's Perspective. *Journal of Cutaneous And Aesthetic Surgery*, v.7, n.4, p.189-197. 2014.

EVERTS, P.A.; KNAPE, J.T.; WEIBRICH, G.; SCHONBERGER, J.P.; HOFFMANN, J.; OVERDEVEST, E.P.; BOX, H.A.; VAN ZUNDERT, A. Platelet-rich plasma and platelet gel: a review *Journal of Extra-Corporeal Technology*, v.38, n.2, p.174-187, 2006.

KANG, S.K.; SHIN, S.; KO, M.S.; JO, J.Y.; RA, J.C. Journey of mesenchymal stem cells for homing: strategies to enhance efficacy and safety of stem cell therapy. *Stem cells international*, v.2012, n.342968, p.1-11, 2012.

KUSHIDA, S.; KAKUDO, N.; MORIMOTO, N.; HARA, T.; OGAWA, T.; MITSUI, T.; KUSUMOTO, K. Platelet and growth factor concentrations in activated platelet-rich plasma: a comparison of seven commercial separation systems. *Journal of Artificial Organs*, v.17, n.2, p.186-192, 2014.

LAITINEN A.; OJA, S.; KILPINEN, L.; KAARTINEN, T.; MOLLER, J.; LAITINEN, S.; KORHONEN, M.; NYSTEDT, J. A robust and reproducible animal serum-free culture method for clinical-grade bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Cytotechnology*, v.68, n.4, p.891-906, 2016.

MALHOTRA, A.; PELLETIER, M.H.; YU, Y.; WALSH, W.R. Can platelet-rich plasma (PRP) improve bone healing? A comparison between the theory and experimental outcomes. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*. v.133, n.2, p.153-165, 2013.

MELESHINA A.V.; CHERKASOVA E.I.; SHIRMANOVA M.V.; KLEMENTIEVA N.V.; KISELEVA E.V.; SNOPOVA L.B.; PRODANETS N.N.; ZAGAYNOVA E.V. Influence of mesenchymal stem cells on metastasis development in mice in vivo. *Stem cell research & therapy*, v.6, n.1, p.15, 2015.

MEIRELLES, L.S.; CAPLAN A.I.; NARDI N.B. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, v.26, p.2287-2299, 2008.

MONTEIRO, B.S.; ARGÔLO-NETO, N.M.; DEL CARLO, R.J. Terapia celular em reparação óssea – aplicação clínica de células-tronco mesenquimais. *Ciência Veterinária nos Trópicos*, v.11, n.2, p.95-100, 2008.

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

ORSI, P.R.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; JUSTULIN JR, L.A.; KANENO, R.; GOLIM, M.A.; DOS SANTOS, D.C.; CREST, C.F.Z.; OBA, E.; MAIA, L.; BARRAVIERA, B.; FERREIRA JR, R.S. A unique heterologous fibrin sealant (HFS) as a candidate biological scaffold for mesenchymal stem cells in osteoporotic rats. *Stem Cell Research & Therapy*, v.8, n.1, p.1-14. 2017.

PITTENGER, M.F.; MACKAY, A.M.; BECK, S.C.; JAISWAL, R.K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J.D.; MOORMAN, M.A.; SIMONETTI, D.W.; CRAIG, S.; MARSHAK, D.R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, v.284, n.5411, p.143-147, 1999.

PORTAL, B.A.R. Disfunção sacroilíaca equina. 2016. 38p. (Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária). Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto, 2016.

RABBA, S.; BOLEN, G.; VERWILGHEN, D.; SALCICCIA, A.; BUSONI, V. Ultrasonographic findings in horses with foot pain but without radiographically detectable osseous abnormalities. *Veterinary Radiology Ultrasound*, v.52, p.95-102, 2011.

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

RUBIO, D.; GARCIA-CASTRO, J.; MARTÍN, M.C.; DE LA FUENTE, R.; CIGUDOSA, J.C.; LLOYD, A.C.; BERNAD, A. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Research*, v.65, n.8, p.3035–6682, 2005.

SENZEL, L.; GNATENKO, D.V.; BAHOU, W.F. The platelet proteome. *Current Opinion in Hematology*, p.329-333, 2009.

SORRELL, J.M.; ABER, M.A.; CAPLAN, A.I. Influence of adult mesenchymal stem cells on in vitro vascular formation. *Tissue Engineering Part A*, v.15, n.7, p.1751-1761, 2009.

SWANSON, T.D. Lameness grading system. In: Guide for Veterinary Service and Judging of Equestrian Events. American Association of Equine Practitioners. 3ª ed., Golden, CO, 1984. 24p.

TURNER, T.A.; SAGE, A.M. Desmitis of Distal Interphalangeal Collateral Ligaments: 22 Cases. Comunicação apresentada no 48th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners. Florida, EUA, p.343-346, 2002.

WAHL, E.A.; FIERRO, F.A.; PEAVY, T.R.; HOPFNER, U.; DYE, J.F.; MACHENS, H.G.; EGAÑA, J.T.; SCHENCK, T.L. In vitro evaluation of scaffolds for the delivery of mesenchymal stem cells to wounds. BioMed Research International, v.2015, p.1-14, 2015.

YAMADA A.L.M. Efeito do implante autólogo de plasma rico em plaquetas (PRP) e células tronco mesenquimais na reparação de lesões condrais articulares induzidas experimentalmente em equinos. 2011. 111p. (Dissertação de Mestrado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2011.

ZHOU, Y.; ZIMBER, M.; HUIHUA, Y.; NAUGHTON, G.K.; FERNAN, R.; LI, W.J. Effects of human fibroblast-derived extra cellular matrix on mesenchymal stem cells. Stem Cell Reviews and Reports, v.12, n.5, p.560-572, 2016.