



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

KATLEEN ARTHUR

**EFEITO COMBINADO DA APLICAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO E SELANTE DE
FIBRINA, NO PROCESSO DE REPARO DE TENDÃO CALCÂNEO DE
RATOS**

CAMPINAS

2016

KATLEEN ARTHUR

**EFEITO COMBINADO DA APLICAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO E SELANTE DE
FIBRINA, NO PROCESSO DE REPARO DE TENDÃO CALCÂNEO DE
RATOS**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do Título de Mestra em Biologia Celular e Estrutural, na área de Biologia Celular.

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE
À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA KATLEEN
ARTHUR E ORIENTADA PELO PROF. DR.
EDSON ROSA PIMENTEL

Orientador: Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel

Co-Orientadora: Profa. Dra. Andrea Aparecida de Aro

CAMPINAS

2016

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

Ar77e Arthur, Katleen, 1989-
Efeito combinado da aplicação de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo e selante de fibrina, no processo de reparo de tendão calcâneo de ratos / Katleen Arthur. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Edson Rosa Pimentel.
Coorientador: Andrea Aparecida de Aro.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Tendão calcâneo. 2. Células-tronco. 3. Selante de fibrina. 4. Regeneração (Biologia). 5. Colágeno. I. Pimentel, Edson Rosa, 1949-. II. Aro, Andrea Aparecida de, 1980-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: The combined effect of ADSCs and fibrin sealant in the repairing process of the Achilles tendon in rats

Palavras-chave em inglês:

Achilles tendon

Stem cells

Fibrin sealant

Regeneration (Biology)

Collagen

Área de concentração: Biologia Celular

Titulação: Mestra em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Edson Rosa Pimentel [Orientador]

Flávia da Ré Guerra

Cristiano Pedroso Vieira

Data de defesa: 11-08-2016

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 11 de agosto de 2016.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel (Orientador)

Profa. Dra. Flávia Da Ré Guerra

Prof. Dr. Cristiano Pedroso Vieira

Profa. Dra. Taize Machado Augusto

Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

DEDICATÓRIA

A meus pais Arnaldo e Rone, meu irmão Norbert e meu noivo Hélio, por me apoiarem e me incentivarem em todo momento. A meu orientador Prof. Edson, e minha coorientadora Andrea por me ensinarem a ter persistência, por me ajudarem e me aconselharem nos momentos mais difíceis, sempre me fazendo perceber que para tudo existe uma solução, basta ter calma e paciência.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel, por sua enorme paciência e bondade, por ter me aceitado como sua aluna, e ter contribuído grandemente para com o meu aprendizado e crescimento tanto científico como pessoal durante o mestrado. Uma pessoa de caráter admirável, sempre disposto a escutar e ajudar em todo o momento.

A Profa. Dra. Andrea Aparecida de Aro, por sua paciência e grande habilidade no entendimento científico. Por ter me ensinado e acompanhado durante todo o tempo do mestrado, sem medir esforços.

Ao meu amigo e colega de laboratório Luis Felipe Teodoro, por sempre me ajudar, pela companhia, amizade e pelo seu jeito único de ser, me incentivando a ir em frente, nos momentos mais difíceis.

Aos colegas de laboratório, pela amizade, auxílio e companhia fundamentais durante o mestrado.

Ao nosso técnico de laboratório Francisco Malatesta, pelo auxílio nos experimentos e pelo seu grande conhecimento em química, que foi muito útil.

Aos colaboradores professores e alunos, que nos ajudaram e nos concederam espaço para realizarmos nossos experimentos.

As instituições de fomento à pesquisa CAPES e FAPESP, sem as quais não seria possível realizar nosso trabalho.

RESUMO

O tendão calcâneo é um dos mais acometidos por lesão entre atletas e praticantes de atividades desportivas ocasionais. Devido à baixa capacidade regenerativa dos tendões após lesões, a morfologia tecidual dificilmente é recuperada integralmente, predispondo os tendões cicatrizados à recorrência de lesões. Com o objetivo de tornar o processo de reparo tendíneo mais eficiente, em nosso laboratório temos utilizado a aplicação de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (CTM). A utilização das CTM apresenta diversas vantagens devido à sua capacidade de diferenciação, coleta pouco invasiva e alto rendimento celular. A associação das CTM com *scaffolds* também representa uma alternativa para tratamento de lesões, pois mantém as células na região lesionada. O selante de fibrina derivado de peçonha de serpente, pode ser um recurso útil, devido à sua flexibilidade, diversidade de aplicações e baixo risco de transmitir doenças e de causar reações adversas, quando comparado aos selantes de fibrina convencionais. É biodegradável, possui capacidade adesiva, serve como *scaffold* e pode ser utilizado como um adjuvante em procedimentos de sutura convencionais.

Objetivo: Investigar o efeito combinado da aplicação das CTM e selante de fibrina no 21º dia do processo de cicatrização do tendão calcâneo de ratos. **Materiais e Métodos:** 90 ratos Lewis machos (120 dias) foram distribuídos em 5 grupos: normal (N); transeccionado (T); transeccionado tratado com selante de fibrina (SF); transeccionado tratado com CTM (CTM) e transeccionado tratado com CTM e selante de fibrina (CTM+SF). As técnicas utilizadas foram: imageamento *in vivo*; RT-PCR *array*; dosagem de hidroxiprolina; microscopia de polarização; testes biomecânicos; técnicas *in vitro* para diferenciação osteogênica, condrogênica e adipogênica das CTM, citometria de fluxo e análise da viabilidade celular.

Resultados: Na citometria de fluxo para caracterização das CTM na 5ª passagem foi observada marcação positiva para CD90 (90%) e CD105 (5%). Na diferenciação *in vitro*, as CTM foram diferenciadas em osteócitos, condrocitos e adipócitos. Em média, as CTM apresentaram viabilidade de 85.3% no momento da aplicação. Através do imageamento *in vivo* foi notada a permanência das CTM no tendão até o 14º dia no grupo CTM+SF. Na análise do RT-PCR *array*, maior expressão de tenomodulin foi observada no grupo CTM em relação ao grupo SF. Na dosagem de hidroxiprolina, maior concentração foi observada no grupo CTM em relação ao grupo N. Na análise em microscopia de polarização, maior birrefringência foi detectada no

grupo SF indicando maior organização dos feixes de colágeno, seguido do grupo CTM+SF. Menor índice apoptótico e marcante presença de colágeno III foram observados nos grupos SF e CTM+SF. Na biomecânica o valor de força máxima foi maior em tendões do grupo T em relação aos grupos CTM e CTM+SF. Em conclusão, nossos resultados mostraram que o selante de fibrina, assim como a sua associação com as CTM, foi mais efetivo na organização dos feixes de colágeno, na diminuição do índice apoptótico, no aumento de colágeno tipo III e na manutenção das CTM por um período maior na região lesionada do tendão.

Palavras-chave: tendão, células-tronco, selante de fibrina, reparo, morfologia, colágeno.

ABSTRACT

The Achilles tendon is one of the most affected by injury among athletes and casual sports activities. Due to the low regenerative capacity of tendons after injury, tissue morphology is hardly recovered, predisposing the healed tendons to the recurrence of injury. In order to make the tendon repair process more efficient, we have used the application of mesenchymal stem cells derived from adipose tissue (MSC). The use of the MSC has several advantages due to its ability to differentiate, to be minimally invasive for collecting and high cell yield. The association of the MSC with scaffolds is also an alternative for treatment of injuries, it keeps the cells in the injured area. Fibrin sealant derived from snake venom, can be a useful resource, because of its flexibility, range of applications and low risk of transmitting disease and of causing adverse reactions when compared to conventional fibrin sealants. It is biodegradable, has adhesiveness, and serves as a scaffold to be used as an adjunct to conventional suturing procedures. **Aims:** To investigate the combined effect of the application of MSC and fibrin sealant on 21th day of the calcaneus tendon healing process. **Materials and methods:** 90 male Lewis rats (120 days) were distributed in 5 groups: normal (N); transected (T); transected treated with fibrin sealant (FS); transected treated with MSC (CTM) and transected treated with MSC and fibrin sealant (CTM+SF). The techniques used were: *in vivo* imaging; RT-PCR array; hydroxyproline dosage; polarizing microscopy; Biomechanical tests; techniques for *in vitro* osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation of MSC, and flow cytometry analysis for cell viability. **Results:** In flow cytometry to characterize the MSC at 5th passage were observed positive markers for CD90 (90%) and CD105 (5%). *In vitro* differentiation, MSC were differentiated into osteocytes, chondrocytes and adipocytes. On average, MSC showed 85.3% viability at the time of application. Through the *in vivo* imaging was noted the persistence of MSC in the tendon until the 14th day at the CTM+SF group. In the analysis of RT-PCR array, most tenomodulin expression was observed in the CTM group compared to the SF group. The analysis of dosage of hydroxyproline, showed higher concentration in the CTM group compared to the N group. In polarization microscopy, a higher birefringence was detected in the SF group indicating greater organization of collagen bundles, followed by the CTM+SF group. Lower apoptotic index and strong presence of collagen III were observed in SF and CTM+SF groups. In biomechanics maximum strength value was higher in T group in relation to CTM and CTM+SF

groups. Our conclusion is that the fibrin sealant as well as its association with MSC, was more effective in the organization of collagen bundles in the reduction of the apoptotic index, increased the type III collagen and kept the MSC for longer period in the damaged region of the tendon.

Keywords: tendon, stem cells, fibrin sealant, repair, morphology, collagen.

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Características Bioquímicas e Estruturais do Tendão	13
1.2. Ocorrência de Lesões Tendíneas	17
1.3. Reparo Tendíneo	18
1.4. Células-Tronco Mesenquimais (CTM)	20
1.5. Associação de CTM com <i>Scaffolds</i>	21
2. OBJETIVOS	24
2.1. Objetivo Geral.....	24
2.2. Objetivos Específicos.....	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1. Grupos Experimentais	25
3.2. Protocolo de Transecção Parcial do Tendão Calcâneo	25
3.3. Extração e Cultura de CTM	26
3.4. Viabilidade Celular	27
3.5. <i>Scaffold</i> de Selante de Fibrina	27
3.6. Migração Celular.....	27
3.7. Ensaio Biomecânico	28
3.8. Dosagem de Hidroxiprolina.....	29
3.9. Preparo de Cortes em Congelação.....	30
3.10. Medidas de Birrefringência	30
3.11. Histomorfometria.....	31
3.12. Imunohistoquímica para Colágeno tipo III	31
3.13. Ensaio de TUNEL para Detecção de Apoptose	32
3.14. Imunofluorescência	33

3.15. RT-PCR array.....	33
3.16. Análise das CTM por Citometria de Fluxo	34
3.17. Diferenciação das CTM.....	34
3.18. Análise Estatística	35
4. RESULTADOS	36
FIGURAS	39
Figura 3: Diferenciação Celular	40
Figura 4: Citometria de Fluxo.....	40
Tabela 2: Contagem e Viabilidade Celular	41
Figura 5: Imageamento <i>in Vivo</i>	42
Figura 6: RT-PCR array	44
Figura 7: Concentração de Hidroxiprolina.....	45
Figura 8: Birrefringência.....	46
Figura 9: Coloração Hematoxilina e Detecção de Apoptose.....	47
Tabela 3: Células Fibroblásticas e Índice Apoptótico	48
Figura 10: Imunohistoquímica para Colágeno tipo III	48
Figura 11: Imunoflorescência para CD90 e CD105	49
Figura 12: Teste Biomecânico	50
5. DISCUSSÃO	51
6. CONCLUSÃO.....	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
ANEXOS	71

1. INTRODUÇÃO

Dentre os tendões do corpo humano o tendão calcâneo é o maior e mais resistente, entretanto é um dos mais acometidos por lesão entre atletas devido à sobrecarga (Reinherz et al., 1986; Gajhede-Knudsen et al., 2013). O processo de reparo das lesões tendíneas pode levar semanas a meses para se completar. Durante esse período, o paciente tende a ser imobilizado para evitar novas rupturas, o que causa inúmeras complicações funcionais retardando o processo de reabilitação (Enwemeka e Reddy, 2000).

1.1. Características Bioquímicas e Estruturais do Tendão

O tendão calcâneo é constituído por tecido conjuntivo denso e modelado, formado por fibras de colágeno imersas em abundante matriz extracelular (MEC) (Józsa e Kannus, 1997; Vidal e Mello, 2010). O colágeno compõe aproximadamente 85% do peso seco do tendão (Kjaer, 2004), e possui como papel principal fornecer resistência biomecânica aos tendões (Benjamin et al., 2008).

O tendão é composto por diferentes tipos de colágenos, em maior quantidade o colágeno tipo I compoendo cerca de 95% do colágeno do tendão calcâneo (Riley, 2004; Longo et al., 2009) e em menor quantidade os tipos II (Benjamin et al., 1991), tipo III presente no epitendão e no endotendão (James et al., 2008), tipo IV (Taylor et al., 2011) e tipo V e VI encontrados na parte mediana e na entese do tendão calcâneo (Józsa e Kannus, 1997; Waggett et al., 1998), o tipo V é ligado através de ligações cruzadas com outros tipos de colágenos e regula a característica de estrutura fibrilar no tendão (James et al., 2008).

O aumento da quantidade do colágeno tipo III no tendão, geralmente está associada a diminuição do diâmetro da fibra de colágeno de tendões em estado patológico, e na fase de reparo pós-lesão, sendo o primeiro colágeno a ser produzido em grande quantidade durante esta fase (Maffulli et al., 2000; Riley, 2004).

As fibrilas de colágeno são formadas por três cadeias polipeptídicas α , organizadas em tripla-hélice. Cada cadeia consiste de uma sequência de aminoácidos repetitiva de Gly-X-Y, na qual Gly é o aminoácido glicina, e X e Y podem ser qualquer aminoácido. Geralmente a posição X é ocupada por prolina, e a posição Y por hidroxiprolina, resultante de modificações pós-traducionais de prolina,

mediada pela prolil hidroxilase. Todos esses componentes são fundamentais para estabilização da tripla-hélice de colágeno (Piez e Reddi, 1984; Ramshaw et al., 1998; Prestes, 2013). Em termos numéricos o colágeno geralmente contém cerca de 30% de glicina, 12% de prolina, 11% de alanina, 10% de hidroxiprolina, 1% de hidroxilisina e pequenas quantidades de aminoácidos polares e carregados (Prestes, 2013). A glicina encontra-se espaçada regularmente a cada dois aminoácidos, permitindo que as três cadeias α se aproximem e formem uma tripla hélice (Hay, 1991). A prolina e hidroxiprolina são responsáveis pela estrutura secundária do colágeno e pela estabilidade da estrutura helicoidal da molécula (Prestes, 2013). A concentração de hidroxiprolina geralmente é usada como parâmetro para medir quantidade de colágeno encontrada no tecido de estudo (Reddy e Enwemeka, 1996). As moléculas de colágeno são secretadas pelos fibroblastos na forma de procolágeno solúvel, o qual possui extremidades em conformação não helicoidal, denominada região N- e C- terminais. No meio extracelular, ocorre a ação das C- e N-peptidases, para clivar as duas porções não helicoidais presentes nas extremidades do procolágeno. A ação dessas enzimas é necessária para iniciar o processo de fibrilogênese (produção de colágeno), pois essas regiões não helicoidais do procolágeno ocupam um grande espaço em volta da molécula dificultando as ligações cruzadas entre as moléculas. Assim, é necessário que ocorra o processo de clivagem para formação da molécula de colágeno, que começa a formar ligações cruzadas com outras moléculas de colágeno, formando as fibrilas (Canty e Kadler, 2005; Carvalho e Pimentel, 2013). Portanto cada fibrila é constituída por moléculas de colágeno solúvel que formam ligações cruzadas para criar moléculas de colágeno insolúvel, as quais se agregam progressivamente em microfibrilas, fibrilas e por final em fibras. A menor unidade estrutural do tendão é a fibrila. (Benjamin et al., 2008).

Com relação à organização hierárquica dos tendões (Figura 1), os feixes de colágeno apresentam-se dispostos em fibrilas, fibras e fascículos. Os fascículos são rodeados pelo endotendão, que possui continuidade com a camada mais externa do tendão, o epitendão. Tanto o endotendão como o epitendão são rodeados por vasos sanguíneos e nervos (Voleti et al., 2012; Raiser et al., 2003). Alguns tendões, especialmente os encontrados nos pés e nas mãos, nas áreas em que ocorre maior movimentação, necessitam de maior lubrificação. Esses tendões apresentam em sua parte mais externa uma bainha com líquido sinovial, que funciona como uma

luva permitindo que o tendão deslize suavemente entre as estruturas que estão ao seu redor. Já tendões como o tendão calcâneo apresentam em sua parte mais externa, um tecido conjuntivo frouxo, o paratendão, (Kannus, 2000; James et al., 2008).

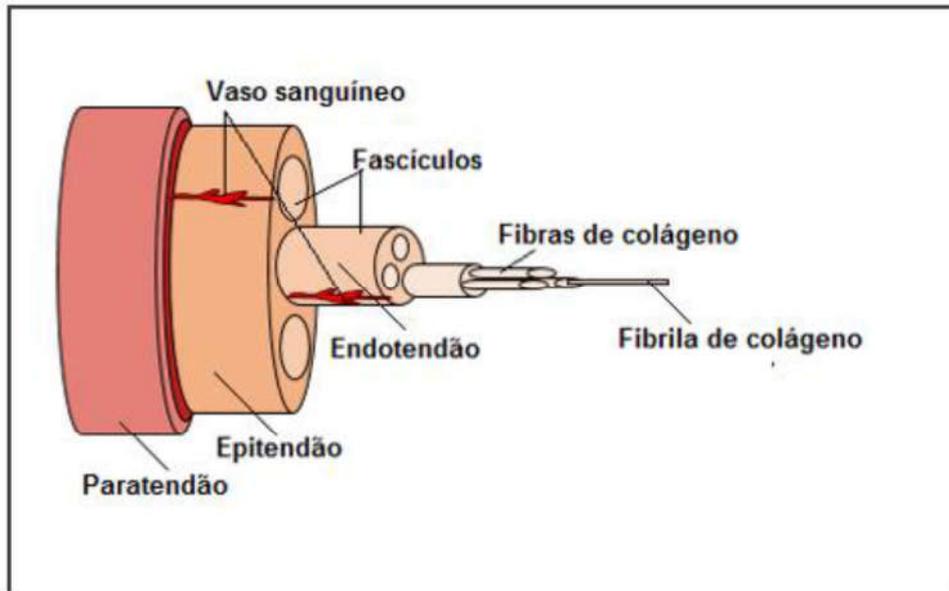


Figura 1: Organização hierárquica da estrutura do tendão a partir das fibrilas de colágeno.

Os feixes de fibras de colágeno dos tendões normais encontram-se alinhadas paralelamente ao eixo longitudinal do tendão (James et al., 2008). Através da análise de birrefringência por microscopia de luz polarizada, é possível quantificar o alinhamento das fibras de colágeno devido às suas propriedades anisotrópicas, por meio da qual se mede o retardo óptico em nanômetro. Portanto, quanto maior é essa medida, maior o grau de organização e compactação das fibras (Vidal, 2003). Ademais outros métodos como o emprego da microscopia de polarização com contraste de interferência diferencial (DIC), o qual permite um maior contraste para observação do material não corado (Vidal et al., 2015), e a microscopia por FT-IR, em que as diferenças entre feixes de elastina e de colágeno podem ser analisadas levando em conta os grupos vibracionais presentes nas duas moléculas (Vidal, 2014; Vidal e Mello, 2016).

Também através da microscopia de luz polarizada é possível observar uma configuração ondulada das fibras de colágeno, denominado *crimp* (Vidal, 1995; Vidal, 2003). Essa configuração em *crimp* é característica dos colágenos formadores

de fibrilas (Gathercole e Keller, 1991), o qual ajuda a proteger o tendão de sofrer ruptura diante da presença de alguma carga súbita, além de auxiliar na absorção de energia durante a deformação inicial e o estresse pelos quais os feixes de colágeno são submetidos durante seu uso, de modo a se adaptar a situação mecânica atuante (Franchi et al. 2007).

Além do colágeno o tendão é composto por água que representa aproximadamente 55% do seu peso (James et al., 2008), células, glicoproteínas, proteínas não colagênicas (PNCs) (Eyre, 1984; Józsa e Kannus, 1997), proteoglicanos (PGs) os quais são formados por glicosaminoglicanos (GAGs) covalentemente ligados a um esqueleto protéico central (Vogel e Heinegart, 1985) e metaloproteinases (MMPs) (Magra e Maffulli, 2005), constituindo assim um tecido altamente organizado (Vidal e Mello, 2010). Os PGs são altamente hidrofílicos, facilitando a rápida difusão de moléculas solúveis em água e a migração celular, sendo responsável pelas propriedades viscoelásticas do tendão (Jozsa et al., 1991; Benjamin et al., 2008), auxiliando na resistência à compressão e na agregação lateral do colágeno tipo I (Youngstrom e Barrett; 2016). O agregam PG de alto peso molecular, em conjunto com a água, auxilia na redução da fricção, facilitando o deslizamento das fibras de colágeno em respostas a cargas mecânicas (Wang, 2006). O fibromodulim e o decorim, são PGs de baixo peso molecular ricos em leucina, presentes na matriz interfibrilar, os quais atuam mantendo e regulando o diâmetro das fibras de colágeno (Watanabe et al., 2005; Derwin et al., 2001).

Os tenócitos são células terminalmente diferenciadas que em condições normais encontram-se alinhadas paralelamente às fibras de colágeno do tendão, são capazes de sintetizar todos os componentes da MEC do tendão, sendo responsáveis pela manutenção da homeostase da mesma, mas sua atividade diminui gradualmente com o envelhecimento (Chuen et al., 2004; Richardson et al., 2007). Apesar de representar apenas cerca de 2% do peso seco do tendão, a elastina, proteína não colagênica, apresenta importantes contribuições para as propriedades biomecânicas do tendão (Henninger et al., 2013), pois encontra-se organizada paralelamente às fibras de colágeno, permitindo suportar as cargas unidirecionais a que são submetidos durante a prática de atividades (Aquino et al., 2005).

As MMPs são um grupo de mais de 24 endopeptidases zinco dependente (Weeks et al., 2014), as quais estão envolvidas no remodelamento da MEC, através

da sua ampla capacidade proteolítica. Dentre os principais grupos de MMPs estão as collagenases (MMP-1, MMP-8 e MMP-13), que clivam colágenos do tipo I, II e III; e as gelatinases (MMP-2 e MMP-9), que clivam colágenos desnaturado e o colágeno do tipo IV (Bramono et al. 2004; Youngstrom e Barrett, 2016). Os inibidores de metaloproteinases (TIMPs), inibem de forma reversível a atividade das MMPs (Bramono et al. 2004). É necessário que haja um equilíbrio entre as MMPs e os TIMPs para manter a homeostase da MEC (Sharma e Maffulli, 2006).

Devido à organização da MEC, os tendões podem suportar altas cargas biomecânicas, transmitindo as forças de contração geradas no músculo ao osso, possibilitando o movimento articular (Lin et al., 2004). No caso do tendão calcâneo esta força de tensão é produzida pelo músculo gastrocnêmio e sóleo, e transmitida através do tecido tendíneo para o osso calcâneo (Józsa e Kannus, 1997).

Ao longo da prática de atividade física, o tendão calcâneo humano pode chegar a suportar cargas superiores a 3500N (Fukashiro et al. 1995; Maffulli, 1999).

1.2. Ocorrência de Lesões Tendíneas

Contudo, apesar de sua alta resistência biomecânica é frequentemente lesionado. Estima-se que lesões no tendão correspondam por cerca de 50% de todas as lesões relacionadas ao esporte, acometendo principalmente o tendão calcâneo (Järvinen et al., 2005). A grande incidência de lesões no tendão calcâneo está relacionada com a carga mecânica imposta sobre o tendão durante a atividade física (Järvinen et al., 2005). Essas lesões podem ocorrer em qualquer idade, sendo mais frequentes entre a terceira e a quinta década de vida, mais comum nos praticantes de atividades desportivas ocasionais, com predominância notória no sexo masculino (Costa e Neto, 2007; Pansini et al., 2007). Durante o processo de envelhecimento também se observa um aumento da incidência de lesões devido a uma diminuição do diâmetro e número das fibras de colágeno (MacLean et al., 2012).

Calcula-se que 75% das rupturas do tendão calcâneo ocorram em atletas recreativos, e somente 8% a 20% ocorram em atletas de competição. Entretanto em atletas que praticam corrida e salto, esse valor pode chegar a 53%. (Wertz et al., 2013). A maioria das lesões no tendão calcâneo ocorrem entre aproximadamente 2 - 6 cm da sua inserção no osso calcâneo (Pansini et al., 2007; Wertz et al., 2013), região onde se relata menor vascularização (Lagergren e Lindholm, 1959; Stein et

al., 2000). Ainda que exista uma relação entre lesões de tendões e o processo de envelhecimento, atletas de competição ainda jovens podem ser acometidos igualmente, devido à alta carga de treinamento, microtraumas cumulativos a partir de constante sobrecarga biomecânica e tempo de recuperação reduzido (Selvanetti et al., 1997; Kader et al., 2002; Yinger et al., 2002). O tendão apresenta baixa vascularização, oxigenação e nutrição, o que leva a uma baixa capacidade de regeneração (Enwemeka, 1989).

1.3. Reparo Tendíneo

O processo de reparo de tendões lesionados geralmente envolve três fases principais que se sobrepõem. Inicia-se com a fase inflamatória, subseqüentemente a fase proliferativa e, por final, a fase de remodelamento (Docheva et al., 2015).

A fase inflamatória tem início logo após a lesão, na qual fibrina e fibronectina são depositados pelas plaquetas dentro do hematoma (Gulotta e Rodeo, 2009). O coágulo resultante, ativa a liberação de vários fatores quimiotáticos, tais como vasodilatadores e moléculas pró-inflamatórias que atraem as células inflamatórias do tecido adjacente. As células inflamatórias, tais como neutrófilos, monócitos e macrófagos migram, para o local da lesão, onde iniciam a fagocitose do coágulo e de detritos celulares (Oakes, 2003; James et al., 2008). Além disso, há uma liberação de grande quantidade de citocinas, como o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento transformante- β (TGF- β), os quais auxiliam tanto na diferenciação e proliferação celular, como na síntese da MEC (Sharma e Maffulli, 2005; Gulotta e Rodeo, 2009; Docheva et al., 2015). Também são liberados fatores angiogênicos os quais iniciam a formação de uma rede vascular (Myers e Wolf, 1974). Os fibroblastos recrutados para o local da lesão começam a sintetizar vários componentes da MEC entre eles o colágeno do tipo III (Oakes, 2003). A concentração de GAGs aumenta significativamente durante as fases iniciais de reparo do tendão (Mello e Vidal, 2003). Esses processos são marcados por um pico 7 dias após a lesão (Murphy et al., 1994).

A fase proliferativa é marcada por um pico 14 dias após a lesão (Oakes, 2003). Novos fatores de crescimento são expressos, como o fator de crescimento fibroblástico (FGF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Gulotta e Rodeo, 2009; Docheva et al., 2015). O recrutamento continuado e a grande

proliferação de fibroblastos, são responsáveis pela síntese de colágeno, PGs e outros componentes da MEC, os quais são dispostos inicialmente de forma aleatória (Leadbetter, 1992; James et al., 2008). Há, portanto, uma constante deposição de matriz, composta principalmente por colágeno do tipo III, o qual forma fibras mais finas que o colágeno do tipo I, e suas fibrilas formam uma rede irregular e desorganizada no local da lesão (Pajala et al., 2009; Lin et al., 2004). Ao final desta fase, o teor de água, células e componentes da MEC encontram-se elevados (Oakes, 2003; James et al., 2008). Os diversos fatores expressos regulam a expressão de genes encontrados em tendões e servem como marcadores de tendinogênese (James et al., 2008).

A fase de remodelamento tem início cerca de 21 dias ou mais após a lesão (Oshiro et al., 2003; Weeks et al., 2014). Esta fase é caracterizada pela redução da celularidade, diminuição da síntese da MEC e colágeno tipo III (Oakes, 2003; Sharma e Maffulli, 2005). O colágeno tipo III gradativamente é substituído pelo colágeno tipo I, em um período de semanas a meses. Mediado por um conjunto de MMPs, que auxiliam na degradação e remodelamento da MEC, incluindo colágenos fibrilares (Oshiro et al., 2003; Weeks et al., 2014). Durante a fase mais tardia de remodelamento, ocorre o aumento das ligações cruzadas entre as fibrilas de colágeno (Evans, 1999). Fibroblastos e fibras de colágeno tornam-se gradualmente alinhadas na direção de tensão (Hooley e Cohen, 1979), com formação de um tecido cicatricial mais maduro, podendo demorar um ano ou mais para que esse processo se conclua (Docheva et al., 2015). No entanto, o tecido de reparo não alcança as características de um tendão normal (James et al., 2008). A lesão tendínea leva a uma resposta fibrótica, que restaura partes da força da região lesionada, contudo permanece inferior ao tendão normal. O tecido cicatricial possui interação reduzida entre as fibras de colágeno com uma maior proporção de colágeno tipo III para colágeno do tipo I. De modo que o tendão fica mais espesso e mais rígido. O que resulta em risco aumentado de recorrência da lesão (Smith, 2011; Docheva et al., 2015).

Devido ao grau de organização do tecido tendíneo, a restauração de sua função após a lesão tende a ser lenta e demorada (Hooley e Cohen, 1979), geralmente acompanhada por alguns problemas como a formação de aderência, que frequentemente se forma impedindo a recuperação de sua função (Goffi, 1996), perda de suas propriedades mecânicas originais de deslizamento sobre os tecidos

vizinhos (Machado et al., 2000), e redução da força biomecânica, causada pelas fibras de colágeno que apresentam diâmetro menor na região da lesão (Maffulli et al., 2000). Assim, o processo de reparo do tendão leva a uma formação de tecido cicatricial, o qual possui composição e propriedades inferiores ao tendão normal (Gulotta et al., 2009).

Entre diversos protocolos para tentar tornar o processo de reparo tendíneo mais eficiente, vários tratamentos vêm sendo estudados em nosso laboratório, tais como aplicação de pomadas e cremes de extratos vegetais (Aro et al., 2012; Aro et al., 2013; Aro et al. 2014; Aro et al., 2015), eletroacupuntura (Almeida et al., 2012), laserterapia (Guerra et al., 2012) e mais recentemente, células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (CTM).

1.4. Células-Tronco Mesenquimais (CTM)

As células-tronco podem ser divididas em células-tronco embrionárias, sendo estas totipotentes ou pluripotentes, e células-tronco adultas as quais são multipotentes (Evans e Kaufman, 1981; Verfaillie, 2002). As CTM são classificadas como células-tronco adultas. Primeiramente, as células-tronco mesenquimais eram extraídas da medula óssea, mas populações semelhantes foram encontradas em outros tecidos, como o tecido adiposo (Barry e Murphy, 2004). As CTM quando comparadas com células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea (BMSC), apresentam muitas vantagens como: fonte abundante de células-tronco mesenquimais, coleta pouco invasiva, alto rendimento celular em cultura (Strem et al., 2005), facilidade de cultivo (Reyes e Verfaillie 2001), e capacidade de auto renovação (Caplan e Dennis, 2006).

Enquanto as CTM podem ser encontradas à razão de 1:100 a 1:500 adipócitos (Mizuno e Hyakusoku, 2005), as BMSC constituem apenas uma pequena porção das células na medula óssea, 0,01-0,001% de células nucleadas (Zuk et al., 2002). As CTM são extraídas a partir do estroma de sustentação do tecido adiposo branco (Bunnell et al., 2008) e apresentam potencial de diferenciação multipotente, em resposta à diferentes estímulos. Portanto possuem a capacidade de se diferenciar em vários tipos celulares, tais como: células adipogênica, osteogênica, condrogênica, (Bunnell et al., 2008; Zeng et al., 2013), tenogênica (Uysal e Mizuno, 2010), miogênica (Mizuno et al., 2002) e angiogênica (Rehman et al., 2004; Cherubino et al., 2011).

As CTM apresentam grande potencial de aplicação terapêutica, pois auxiliam no processo de reparo, são viáveis a longo prazo e secretam importantes fatores de crescimento, tais como o fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-1), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) entre outros (Wang et al., 2006; Schmitt et al., 2012). De acordo com Chan et al., 2000, o fator de crescimento bFGF levou a um aumento na produção de colágeno do tipo I e do tipo III, em estágios iniciais da cicatrização do tendão de ratos.

O uso das CTM vem se destacando, pois não envolve questões éticas como as células-tronco embrionárias, além de serem facilmente obtidas a partir do tecido adiposo (Caplan, 1994). Várias pesquisas demonstraram que as CTM podem ser obtidas a partir do tecido adiposo de cirurgia abdominal ou lipoaspiração, processos que vem crescendo ao redor do mundo (Yang et al., 2011). Com base em marcadores específicos de superfície celular as CTM podem ser identificadas, visto que expressam alguns marcadores tipicamente mesenquimais, como CD29, CD73, CD90 e CD105. E não expressam marcadores de linhagem hematopoética e endotelial, como CD14, CD34, CD45 e *human leukocyte antigen-DR* (HLA-DR) (Yang et al., 2011; Keating, 2012; Maumus et al., 2011).

Com relação aos trabalhos envolvendo a aplicação de células-tronco em tendões, um estudo feito com tendões calcâneos de coelhos demonstrou que a aplicação de BMSC em uma matriz de colágeno, aumentou significativamente a eficiência biomecânica do tendão lesionado em comparação ao grupo controle (Young et al., 1998). As CTM quando aplicadas no tendão flexor digital de cavalos com tendinite induzida por colagenase, melhorou a organização das fibras de colágeno e estrutura geral do tendão (Nixon et al., 2008). Há alguns anos, as CTM em conjunto com exercícios controlados vem sendo utilizadas no tratamento para lesões em tendões de equinos, apresentando-se eficaz na cura dessas lesões (Dahlgren, 2005). Nos últimos anos, diversos estudos vêm sendo realizados em ratos, cavalos e ovelhas entre outros modelos animais, utilizando CTM e BMSC para reparo e regeneração do tendão (Ju et al., 2008; Lacitignola et al., 2008; Nixon et al., 2008).

1.5. Associação de CTM com *Scaffolds*

A associação das CTM com *scaffolds* também representa uma alternativa bastante interessante para tratamento de lesões, devido à permanência de alta quantidade de células na região lesionada por mais tempo (Evans et al., 2006). Para um *scaffold* ser considerado ideal para o uso na engenharia de tecidos é necessário que apresente as seguintes características: sirva como suporte mecânico, promova adesão celular e seja biodegradável, assim dando suporte e espaço para a proliferação e diferenciação celular (Gasparotto et al., 2014). Outro estudo demonstrou que CTM associadas ao *scaffold* de selante de fibrina e depois enxertada em camundongos, aumentou a angiogênese e o número de fibroblastos, resultados não observados no grupo controle (Bensaïd et al. 2003). Diversos estudos vêm demonstrando o uso de diferentes tipos de *scaffolds*. *Scaffolds* inorgânicos, tais como cerâmica (Aarvold et al., 2013), vidros bioativos (Haimi et al., 2009) e poliéster (Wang et al., 2009) e *scaffolds* orgânicos, tais como géis de colágeno (Gentleman et al., 2006; Altman et al., 2002), hidrogel de alginato (Moshaverinia et al., 2012), hidrogel de polietilenoglicol (PEG) (Gao et al., 2015) e fibrina (Kolehmainen e Willerth, 2012), todos manipulados para formação de redes porosas. Estudos *in vitro* mostraram que a fibrina pode ser empregada como matriz provisional para migração e proliferação celular, no reparo de tecidos lesionados (Tuan et al., 1996).

Um novo *scaffold* foi proposto, composto por uma diferente formulação de selante de fibrina (SF), o qual não contém trombina bovina e fibrinogênio humano como nos selantes convencionais, diminuindo assim as chances de causar reações adversas e transmitir doenças infecciosas (Barros et al. 2009). Esse SF é composto por componentes extraídos a partir de bubalinos e serina proteinase uma enzima semelhante à trombina, derivada de peçonha de serpente *Crotalus durissus terrificus* (cascavel). A fibrina faz parte da fase final da cascata de coagulação, em que as moléculas de fibrinogênio são clivadas pela trombrina, convertendo em monômeros de fibrina, que formam fibras constituindo uma rede tridimensional (Lerner e Binur, 1990). O SF é um produto biológico, biodegradável, possui boa capacidade adesiva, flexibilidade e pode ser aplicado de diversas formas (Gasparotto et al., 2014).

Nos estudos de Ferraro et al., 2005, foram avaliados os efeitos deste novo selante de fibrina na cicatrização do tendão de cães. Os tendões foram parcialmente

transeccionados para aplicação de SF. A avaliação biomecânica mostrou que, ao longo do tempo de cicatrização do tendão, houve ganho progressivo de resistência na tração máxima e as análises morfológicas revelaram um processo típico de cura do tendão com um menor nível de inflamação na fase aguda.

A busca por novos tratamentos que sejam eficazes no reparo tendíneo vem aumentando, e inúmeros estudos em modelos animais demonstram que o uso de células tronco pode ser promissor na cura e restauração da funcionalidade do tendão, assim como o uso de scaffolds para que as células sejam mantidas por mais tempo sobre a região de lesão. Devido à grande incidência de rupturas e lesões de tendão, estudos como esse são de grande importância para a sociedade, procurando reduzir o tempo de recuperação e o retorno às atividades do cotidiano (Arruda et al., 2007). O presente estudo visa utilizar uma combinação de CTM com selante de fibrina, para alcançar restauração das propriedades biomecânicas e diminuição do tecido cicatricial e desse modo acelerar o retorno da funcionalidade de tendões calcâneos lesionados.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Estudar o efeito da aplicação de CTM combinadas com selante de fibrina no reparo do tendão calcâneo de ratos, através de métodos biomecânicos, morfológicos, bioquímicos e moleculares.

2.2. Objetivos Específicos

Analisar a resistência dos tendões, comparando entre os grupos, através dos valores dados em força máxima (Newton) e deslocamento máximo (mm).

Avaliar o grau de organização dos feixes de colágeno nos diferentes grupos.

Analisar possíveis alterações nas quantidades de colágeno total nos tendões dos diferentes grupos.

Analisar a expressão de genes relacionados ao remodelamento da MEC, tais como decorin, MMP2, MMP9 e TIMP 2; entre outros genes relacionados ao tendão, tais como IL-1 β , TGF- β , GDF-5, TNF- α , LOX, scleraxis, tenomodulin, decorin.

Observar o tempo de permanência das CTM aplicadas sobre o tendão com transecção parcial.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Grupos Experimentais

Para a pesquisa foram necessários 110 ratos Lewis machos com quatro meses de idade. Todos os animais foram mantidos no biotério com temperatura mantida entre 22-28°C, luz controlada em ciclo de 12 horas (claro-escuro) e possuíam livre acesso à comida e água. Destes, 90 animais foram divididos em 5 grupos experimentais (Tabela 1): normal (N) – ratos com tendões sem transecção; transeccionado (T) – ratos com tendões transeccionados tratados com aplicação tópica de PBS na região lesionada; selante de fibrina (SF) – ratos com tendões transeccionados tratados com aplicação tópica de selante de fibrina na região lesionada; Células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (CTM) – ratos com tendões transeccionados tratados com aplicação tópica de CTM na região lesionada; e CTM e selante de fibrina (CTM+SF) – ratos com tendões transeccionados tratados com aplicação tópica de CTM e selante de fibrina na região lesionada. Todos os animais foram sacrificados 21 dias após a cirurgia, com exceção do grupo (N) que foi sacrificado com 141 dias, mesma idade dos animais cujos tendões foram transeccionados, pois os mesmos não passaram por cirurgia. Os procedimentos experimentais seguiram as normas institucionais para o cuidado e uso de animais de laboratório e foram aprovados pelo Comitê Institucional de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP (Protocolo nº3695-1).

Tabela 1: Grupos experimentais

Grupos	Descrição
N	Ratos com tendão sem transecção
T	Ratos com tendão transeccionado
SF	Ratos com tendão transeccionado tratados com SF
CTM	Ratos com tendão transeccionado tratados com CTM
CTM+SF	Ratos com tendão transeccionado tratados com CTM e SF

3.2. Protocolo para a Transecção Parcial do Tendão Calcâneo e Aplicação Tópica de CTM, Selante de Fibrina

Para os procedimentos cirúrgicos os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de Ketamina (90 mg/Kg) e Xylazina (12 mg/Kg) e as patas inferiores direitas submetidas à tricotomia e antissepsia. Uma incisão longitudinal foi feita na pele do animal, para exposição do tendão calcâneo e uma transecção parcial transversal foi realizada na região proximal do tendão, localizada a uma distância de 4 mm de sua inserção no osso calcâneo, como já descrito em vários trabalhos de nosso laboratório (Tomiosso et al, 2009; Almeida et al, 2012; Aro et al, 2012, 2013 e 2014). Foram aplicadas cerca de 4×10^5 células (CTM) por animal do grupo CTM e CTM+SF, ressuspendidas em 15 μ L de PBS. Após a aplicação das CTM, a pele foi suturada com fio de náilon (Shalon 5-0) e agulha (1,5 cm). Estes mesmos procedimentos foram utilizados para tratar os tendões transecionados, do grupo T que recebeu aplicação de 15 μ L de PBS; do grupo SF que recebeu aplicação de 9 μ L de SF + 15 μ L de PBS; e do grupo CTM+SF que recebeu aplicação de 9 μ L de SF + 15 μ L de PBS + cerca de 4×10^5 CTM. Os animais cujo tendão não foi transecionado pertenciam ao grupo normal, sem lesão. Todos os ratos foram operados em condições esteril.

3.3. Extração e Cultura de CTM

Para obtenção de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (CTM), foram utilizados ratos Lewis machos com 3-4 meses de idade. Os animais foram sacrificados por meio de aprofundamento anestésico. Foi realizada uma incisão na pele do animal para coleta do tecido adiposo da região inguinal. As amostras foram colocadas em tampão fosfato salino (PBS) estéril, cortadas em pedaços minúsculos, e vasos sanguíneos foram removidos para evitar contaminação. Para digestão enzimática, a cada 4 gramas de tecido adiposo foi adicionado 100 μ L de colagenase de uma solução estoque a 0,2% de colagenase do tipo I, 4,9 mL de PBS suplementado com 50 μ L de antimicótico, foi então submetido a 37°C em agitação durante 1 hora. Após o processo o tecido dissociado foi filtrado para remover detritos, e a atividade da colagenase foi inibida por adição de um volume igual de *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM), suplementado com 15% de soro fetal bovino (SFB). A solução foi então centrifugada a 1800 rpm durante 10 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspendido em 5 mL DMEM,

suplementado com 15% de SFB, e plaqueado em uma garrafa de 25cm². As culturas foram mantidas sob atmosfera úmida a 37°C contendo 5% de CO₂. As células foram submetidas à tripsinização sempre que observado mais que 85% de confluência até a 5ª passagem (5P). Os procedimentos foram realizados de acordo com (Yang et al., 2011), com algumas modificações.

3.4. Viabilidade Celular

Foram analisadas três culturas diferentes, na 5P, mantidas em garrafas de 75 cm². O pellet obtido de cada cultura após a tripsinização foi ressuspensionado em 1 mL de PBS. Foi utilizada uma alíquota de 10 µL de cada cultura a qual foi corada com Azul de Tripán 0,4%. As CTM foram colocadas para análise no aparelho Countess II FL (Life Technologies), que mediu a concentração e viabilidade celular.

3.5. Selante de Fibrina

O selante de fibrina derivado de peçonha de serpente (*Crotalus durissus terrificus*) foi gentilmente fornecido pelo Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP) da UNESP, seus componentes e instruções de uso estão descritos nas suas patentes (números de registro BR1020140114327 e BR1020140114360). No momento da utilização, os componentes foram previamente descongelados, reconstituídos, misturados e aplicados de acordo com o protocolo desenvolvido em projetos anteriores (Thomazini-Santos et al., 2001; Barros et al., 2009 e 2011; Gasparotto et al., 2014; Ferreira Júnior, 2014).

3.6. Migração Celular

As CTM na 5P foram tripsinizadas e centrifugadas à 1800 rpm durante 10 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* contendo cerca de $4,0 \times 10^5$ células, foi marcado com PKH26 (Sigma®), de acordo com o protocolo de Godoy et al., 2011. O PKH26 foi analisado no aparelho de imageamento *in vivo* para verificar sua intensidade de fluorescência (figura 1). Após a marcação com PKH26 o *pellet* foi ressuspensionado em 15 µL de PBS e aplicado sobre o tendão calcâneo transecionado do grupo CTM; no grupo SF + CTM foi repetido o mesmo procedimento com adição de 9 µL de selante de fibrina; no rato controle *sham* foram aplicadas CTM sobre o tendão não transecionado; e o rato controle negativo teve apenas seu tendão transecionado sem aplicação de CTM ou selante de fibrina. Foi realizado

imageamento *in vivo* com o aparelho In-Vivo FX PRO (BRUKER®, USA) no 1°, 2°, 3°, 7°, 14° e 21° dias após a lesão, para verificar o comportamento e localização das CTM marcadas com PKH26. Para tal, aplicamos os comprimentos de onda de 550 nm e 600 nm para excitação e emissão do fluoróforo, respectivamente, durante 1,0 min. Adicionalmente, os animais foram submetidos ao raio-X, visando-se a localização anatômica da marcação. Durante o procedimento, os animais foram mantidos sob anestesia (isoflurano 3% em ar medicinal). A fim de excluirmos possíveis marcações inespecíficas, o controle negativo também foi submetido ao imageamento. Além disso, o pelo foi completamente removido da área de interesse e a pele foi limpa com etanol 70% para a remoção de materiais que interferissem na fluorescência (tais quais maravalha e resíduos de ração). Foram avaliadas a área de marcação (mm²) e a intensidade de fluorescência (fótons por segundo por milímetro quadrado, P/s/mm²).

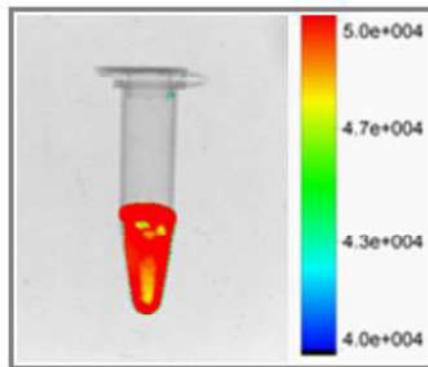


Figura 1: *Eppendorf* contendo PKH26 analisado no aparelho de imageamento *in vivo* para verificar a intensidade de fluorescência do PKH26 para posterior marcação das CTM ($\times 10^8$ P/s/mm²).

3.7. Ensaio Biomecânico

Os animais foram sacrificados por aprofundamento anestésico e os tendões foram coletados e armazenados a -80°C no biofreezer até o momento do teste. Antes do ensaio biomecânico, os tendões foram descongelados e mensurados com paquímetro, considerando seu comprimento, largura e espessura. Para o ensaio biomecânico os tendões foram mantidos em PBS para impedir que suas fibras secassem e fixados a garras de metal pela junção miotendínea e osteotendínea, de forma que ficassem alinhados corretamente (Figura 2), foi utilizado o texturômetro (MTS, modelo TESTSTAR II). Em cada teste, os tendões foram tracionados até o

seu rompimento total, submetidos a um aumento gradual de carga a uma velocidade de deslocamento de 1 mm/s, utilizando uma cédula de carga de 0,05 N. O teste forneceu resultados de força máxima (N) e deslocamento máximo (mm), que foram utilizados para calcular a tensão máxima (Mpa), deformação máxima (L) de cada grupo. A área de secção transversal do tendão calcâneo foi calculada assumindo uma aproximação elíptica ($A = \pi Wd/4$), empregando as medidas dos valores de largura (W) e espessura (d). O valor da tensão máxima (MPa) foi estimado pela razão entre a carga máxima (N) e a área de secção transversal (mm^2). A deformação máxima (L) foi calculada através de ($L = L_f - L_i / L_i$), onde (L_f) é o valor do comprimento final antes da ruptura, e (L_i) é o valor do comprimento inicial do tendão. A rigidez foi calculada através de (N/mm). Os ensaios foram realizados de acordo com os protocolos de (Benevides et al., 2004; Tomiosso et al., 2009; Vieira et al., 2014).

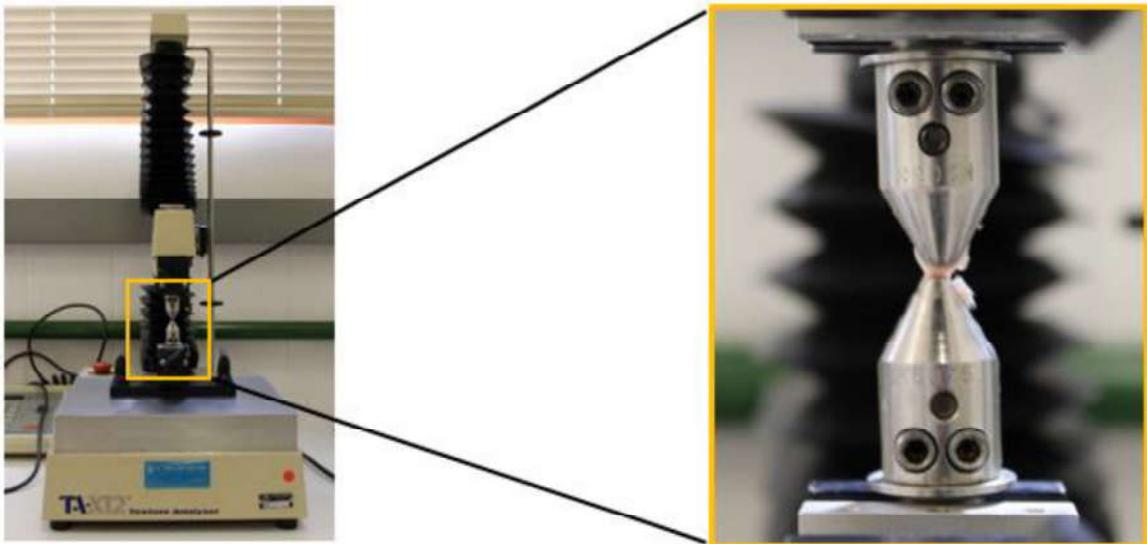


Figura 2: Texturômetro com o tendão calcâneo fixado nas garras de metal para realização do ensaio biomecânico. A junção miotendínea do tendão foi fixada na garra superior e a junção osteotendínea, na garra inferior.

3.8. Dosagem de Hidroxiprolina

A hidroxiprolina foi utilizada como indicador da quantidade de colágeno contido nos tendões dos diferentes grupos. Foram utilizados os tendões provenientes do teste biomecânico. As amostras foram picadas e imersas em acetona por 48h e depois colocadas em clorofórmio etanol (2:1) por mais 48h. Após esse processo de desidratação, as amostras foram colocadas na estufa a 37°C para

secar. Cada amostra foi então cuidadosamente pesada e submetida a hidrólise em HCl 6N (1 mL/10 mg de tecido) por 4h à 130°C. Posteriormente o hidrolisado foi neutralizado com NaOH 6N, protocolo de acordo com (Stegemann e Stalder, 1967), com algumas modificações. Para preparo da microplaca foi utilizado 4 µL de cada amostra e adicionado 50 µL de uma solução de cloramina T (282 mg cloramina T, 2 mL de n-propanol, 2 mL de água destilada e 16 mL de tampão de citrato acetato pH 6,0). Após 20 min em temperatura ambiente, foi adicionado 50 µL de solução de Ehrlich (2,5 g de 4-dimetilamino-benzaldeído, 9,3 mL de n-propanol e 3,9 mL de ácido perclórico a 70%). O material foi incubado por 15 min a 65 °C e posteriormente resfriado. A absorbância das amostras foi medida a 550 nm no espectrofotômetro (leitor de microplaca, Expert Plus, Asys®). Concentrações de 0,2 a 6 µg/mL de hidroxiprolina, foram utilizadas para preparação da curva padrão. A quantidade de hidroxiprolina das amostras foi expressa em miligramas por grama de tecido seco. Protocolo de acordo com (Jorge et al., 2008), com algumas modificações.

3.9. Preparo de Cortes em Congelação

Os tendões foram coletados e emblocados em Tissue-Tek®. As amostras congeladas foram cortadas no criostato, em cortes longitudinais seriados de 7 µm. Os cortes foram fixados usando solução de formaldeído a 4% em tampão Millionig (fosfato de sódio monobásico 0.13 M e hidróxido de sódio 0.1 M, pH 7.4). Em seguida os cortes seguiram para as análises de birrefringência, histomorfometria, imunohistoquímica, imunofluorescência e apoptose.

3.10. Birrefringência e Contraste por Interferência Diferencial (DIC)

Para este procedimento foi utilizado o microscópio Olympus BX-51 (Olympus America, Center Valley, PA, USA) equipado com câmera Q-color 5 (Olympus America). Para avaliação visual e medidas de birrefringência foi empregado o software Image Pro-plus v.6.3 para Window™ (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). Com o microscópio e o software é possível levar-se a efeito análises de DIC e de propriedades anisotrópicas tanto separadamente quanto somadas (Vidal, 2014; Vidal et al., 2015). Para obter a birrefringência das fibras e feixes de colágeno, sem atividade dos prismas de Wallston, estes foram removidos do trajeto de luz polarizada, girando-se a torre do condensador até a posição para campo de observação livre, dando passagem só para luz polarizada. E também é removido o

prisma de Nomarski, abaixo do analisador. Nestas condições tem-se simplesmente um microscópio de polarização. No lugar do prisma de Nomarski foi inserido um compensador de Senarmont de 1/4 comprimento de onda, usado para análise dos feixes de colágeno antes e após compensação. Após o estudo da morfologia das fibras e feixes de colágeno pela sua birrefringência de cortes imersos em água destilada, a birrefringência foi medida por análise de imagem capturada. Para tal, usou-se uma padronização da fonte de iluminação e da sensibilidade da câmera de forma que sempre as mesmas condições de trabalho fossem preservadas. Em termos ópticos, empregou-se sempre objetiva 40x2 e luz monocromática com $\lambda = 546$ nm. Foram examinados e medidos cortes longitudinais dos tendões de todos os grupos; como padrão para ajustar as condições de trabalho foram adotados os cortes das amostras CTM, como tratamento do qual se esperava uma resposta hipoteticamente ideal. As medidas da birrefringência foram em termos do brilho das imagens e expressas em pixels, este procedimento permitiu uma alta amostragem de áreas medidas, assim como a detecção da maior variabilidade de birrefringência como anteriormente verificado (Vidal, 2010; Vidal et al., Fig. 1, 2010).

3.11. Histomorfometria

Para as aferições do número de fibroblastos (n em $10^4 \mu\text{m}^2$) foram utilizados cortes longitudinais corados com Hematoxilina de Harris. Foram feitas cinco amostragens para cada um dos três cortes obtidos a partir de secções da região da lesão das peças coletadas de cada um dos três animais de cada grupo. Todas as imagens foram capturadas e digitalizadas utilizando Fotomicroscópio Leica DM2000. As medidas foram realizadas em imagens digitalizadas com o apoio do programa *Sigma Scan Pro 5.0™* e, os dados obtidos foram analisados pelo teste de ANOVA e pós-teste de Tukey.

3.12. Imunohistoquímica para Colágeno do Tipo III

Cortes longitudinais dos tendões foram incubados com Pronase E 1mg/ml em PBS por 15 min na temperatura ambiente. Em seguida, a atividade da peroxidase endógena foi bloqueada pela imersão em metanol contendo 0,3% (v/v) de peróxido de hidrogênio por 30 min. Logo após, foram lavados em PBS e tratados com soro fetal bovino por 20 min e incubados com anticorpo primário diluído em PBS 0,01M com 1% de albumina bovina durante 18h a 4° C em câmera úmida. Foi utilizado

anticorpo primário anti-colágeno tipo III, monoclonal para camundongo (diluído 1:200, Sigma, EUA). Para controle negativo foram utilizados cortes tratados PBS 0,01M com 1% de albumina bovina sem a adição do anticorpo primário. Após a incubação, os cortes foram lavados três vezes em PBS e tratados com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugados com peroxidase (diluído 1:500, Sigma, EUA) durante 30 min a temperatura ambiente. Por fim, os cortes foram lavados com tampão Tris-HCl 0,05M pH 7,4 tratados com diaminobenzidina a 0,05% (v/v) em Tris-HCl 0,05M pH 7,4 contendo 0,03% (v/v) de peróxido de hidrogênio por 5 min para detecção da atividade da peroxidase. Para montagem em resina, os cortes foram previamente lavados em água destilada, desidratados e diafanizados. Todas as imagens foram capturadas e digitalizadas utilizando Fotomicroscópio *Leica DM2000*. As contagens foram realizadas em imagens digitalizadas com o apoio do programa *Sigma Scan Pro 5.0™*, conforme descrito para análise morfométrica.

3.13. Detecção de Células em Apoptose por Ensaio de TUNEL

Cortes longitudinais de tendão calcâneo dos diferentes grupos experimentais foram montadas em lâminas silanizadas. Em seguida, as secções foram tratadas com proteinase K (Boehringer, Mannheim, Alemanha) em 20 µg/mL, em câmara úmida durante 15 min à temperatura ambiente. Depois, os cortes foram lavados em água destilada e tratados com H₂O₂ a 2% de em metanol durante 10 min à temperatura ambiente, e novamente lavados em água destilada. Logo em seguida, as lâminas foram pré-incubadas com Desoxinucleotidil-terminal transferase (TdT) em tampão de CoCl₂ 1 mM durante 5 min à temperatura ambiente, e em seguida, incubadas durante 60 minutos, em câmara úmida a 37 ° C, com 50 µL de TdT e Trifosfato de desoxiuridina biotinilada (Bio dUTP; Boehringer; TdT 0,3 U mL⁻¹, Bio dUTP 8 µM em tampão e TdT CoCl₂ a 1 mM). As secções foram então lavadas quatro vezes em água destilada (durante 2 min cada), duas vezes em solução salina tamponada com fosfato (PBS, 5 minutos cada), em albumina de soro humano a 2% (5 min) e em PBS (5 min). Em seguida, os cortes foram cobertos pelo complexo estreptavidina-peroxidase biotinilada (Boehringer) diluída 1: 100 em câmara unida para 45 min à temperatura ambiente, lavadas em PBS e coradas com diaminobenzidina 50 mM (0,05%). As lâminas foram então lavadas em água e preparadas para montagem em resina. Controles positivos e negativos foram incluídos em cada grupo. Para os controles positivos, as secções foram tratadas

com DNase I (1 $\mu\text{g mL}^{-1}$; Boehringer) em tampão DNase durante 10 min à temperatura ambiente antes da exposição ao Bio dUTP e TdT. As secções foram incubadas sem a enzima TdT como controle negativo. Todas as imagens foram capturadas e digitalizadas utilizando Fotomicroscópio Leica DM2000. O nome TUNEL deste ensaio vem do termo TdT-mediated dUTP-TMR Nick End Labeling. Foi utilizado para o ensaio o Kit (ApopTag® Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (EMD MILLIPORE).

3.14. Imunofluorescência

Cortes longitudinais de tendões foram fixados em acetona gelada -4°C durante 20 min. Em seguida foram lavados duas vezes com PBS por 5 min. Então foram incubados com PBS/BSA 1 % por 1 hora em temperatura ambiente. Posteriormente foi retirado o PBS/BSA e as amostras foram incubadas por 2 horas em temperatura ambiente, com 200 μL de anticorpo primário CD90 anti-rat (BD Pharmingen™) diluído 1:200, em PBS/BSA 1%. Após o tempo, foram lavadas 2 vezes com PBS por 5 min, e incubadas com o anticorpo secundário FITC (eBioscience) e com CD105-PE anti-mouse, ambos diluídos 1:200 em PBS, por 40 min em temperatura ambiente, protegido da luz. Logo após foram lavadas duas vezes com PBS por 5 min. As lâminas foram incubadas com DAPI (0,1mg/mL em metanol) por 5 min a 37°C para marcação dos núcleos. As lâminas foram analisadas no microscópio de fluorescência (Olympus BX60) e as imagens capturadas pelo programa QCapture 4.0.

3.15. RT-PCR Array

Os tendões foram coletados cuidadosamente de quatro animais por grupo, colocados em RNA-*later* (QIAGEN), e mantidos à -20°C até o momento do uso. Para uma melhor extração do RNA total, os tendões foram pulverizados utilizando pulverizador e nitrogênio líquido. Foi realizada a extração do RNA total utilizando *beads* (2.3 mm de diâmetro, Biospec) e o *RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit* (cat. No. 74704, QIAGEN), seguindo as instruções da fabricante. Para a síntese de cDNA foi utilizada 0,5 μg de RNA de cada amostra, utilizando o *RT² First Strand Kit* (QIAGEN) utilizando o termociclador Mastercycler Pro (Eppendorf®). O cDNA foi congelado a -20°C até a realização do *real-time* PCR. A reação de *real-time* PCR foi realizada utilizando o *kit RT² Profiler PCR Arrays* (formato A) em combinação com o *RT²*

SYBR Green Mastermixes (QIAGEN) no aparelho termociclador 7300 (AB Applied Biosystems®), seguindo as instruções do fabricante. Para cada amostra de cada animal, foram utilizados três tipos de controles de reação: 1. Controle positivo da PCR; 2. Controle da transcriptase reversa; 3. Controle para contaminação de DNA genômico de rato. O GAPDH (Refseq# NM_017008) foi utilizado como controle endógeno para cada amostra. Foram analisados os seguintes genes (QIAGEN): Scleraxis (SCX) (NM_017008), tenomodulin (TNMD) (NM_022290), Fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (NM_012675), Intereucina-1 β (IL-1 β) (NM_031512), Fator de crescimento transformante- β (TGF- β) (NM_021578), Metaloproteinase-2 (MMP-2) (NM_031054), Metaloproteinase-9 (MMP-9) (NM_031055), Inibidor tecidual de metaloproteinase-2 (TIMP-2) (NM_021989), Decorin (DCN) (NM_024129), Lisil oxidase (LOX) (NM_017061) e Fator de diferenciação do crescimento-5 (GDF-5) (XM_001066344). As reações foram feitas em uma única pipetagem de cDNA para cada gene incluindo o controle endógeno.

3.16. Análise das CTM por Citometria de Fluxo

As CTM foram tripsinizadas e depois centrifugadas a 2000 rpm (10 min.), e posteriormente foram contadas na câmara de Neubauer. Após a contagem, as CTM foram ressuspensas em PBS, em uma concentração mínima de 10^6 células/mL para cada 200 μ L de PBS/BSA 2%. Para fazer o painel imunofenotípico, foi realizada a incubação com anticorpos para detecção de CD90-PE (BD-Bioscience 12-4817-82), CD105-PerCP (BD-Bioscience 46-4817-80) e CD34-FITC duplo conjugado (BD-Bioscience 11-0341-82), por 1h, à 37°C. Posteriormente, as CTM foram lavadas 2x com 500 μ L de PBS e centrifugadas a 2000 rpm, durante 7 min. As CTM foram ressuspensas em 500 μ L de PBS/BSA 2% e 50 μ L de paraformaldeído (4%).

3.17. Diferenciação Osteogênica, Condrogênica e Adipogênica das CTM

Após a 5ª passagem as CTM foram cultivadas utilizando diferentes meios para cada tipo de diferenciação desejada. Para o meio osteogênico base, foi utilizado: 79,9 ml DMEM/15 mM HEPES, 10 ml de solução estoque de beta-glicerofosfato (630 mg de beta-glicerofosfato em 20 ml de DMEM/15 mM HEPES), 10 mL de soro fetal bovino e 100 μ L de solução estoque ASAP (50 mg de ácido-ascórbico 2-fosfato em 10 ml de DMEM/15mM HEPES). Para o meio condrogênico base (concentrações finais), foi utilizado: DMEM, HEPES livre de ácido(15 mM), 6,25 μ g/ml de insulina, 10

ng de TGF-beta e 50 nM de ASAP. E para o meio adipogênico base, foi utilizado: DMEM, HEPES (15 mM), soro fetal bovino (10%), dexametasona (1×10^{-8} M), insulina de pâncreas bovino (2,5 µg/ml) e indometacina (100 µM). Os diferentes meios de diferenciação foram trocados 2x por semana, durante 3-4 semanas. Em seguida, as culturas foram fixadas e coradas com Alizarina Red S, Azul de Toluidina e Oil Red. As imagens das amostras foram feitas no microscópio invertido Axiovert S100 (ZEISS).

3.18. Análise Estatística

Todos os resultados foram apresentados em média e desvio padrão para os valores com distribuição normal (ou mediana e amplitude interquartilica para os valores que não aderiram a distribuição gaussiana). Para os dados com distribuição normal (Biomecânica; HO Pro; Imageamento – Intensidade da Marcação para 1 dia e 3 dias; Imageamento – Área de Marcação para 1 dia; RT-PCR-array para os genes: Decorin, GDF-5, IL-1beta, LOX, MMP-2, MMP-9, SCX, TGF-beta, TIMP-2, TNMD e TNF-alfa; e Dados Morfométricos) foi usada a Análise de Variância (ANOVA) seguido do teste post-hoc de Tukey para análise intra-grupo (no caso de significância estatística), ou o Teste T de Student precedido do Teste de Levene, e para os demais que não aderiram a distribuição gaussiana (Birrefringência; Imageamento – Intensidade da Marcação para 2 dias, 7 dias e 14 dias; Imageamento – Área de Marcação para 2 dias, 3 dias, 7 dias e 14 dias; utilizou-se a estatística não paramétrica por meio do Teste de Kruskal-Wallis seguido do teste post-hoc de Dunn para análise intra-grupo (no caso de significância estatística), ou o Teste U de Mann-Whitney. A evolução do imageamento conforme o tempo também foi avaliado dentro de cada grupo pelo Teste de Friedman para amostras pareadas. A análise estatística foi realizada no software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 22.0 e para todos os testes supracitados foi considerado o nível de significância $\alpha = 0,05$ e poder do teste de 95%.

4. RESULTADOS

As diferenciações condrogênicas, osteogênicas e adipogênicas das células em cultura na 5^o passagem, foram realizadas para confirmação do potencial de diferenciação das CTM. Através da coloração das CTM *in vitro* com Azul de toluidina, Alizarina Red e Oil Red foi possível evidenciar sua diferenciação em condrócito, osteoblasto e adipócito, respectivamente (Figura 3).

Na citometria de fluxo, foi observada a presença de cerca de 95% de células CD90 e 5% de células CD105 positivas (Figura 4). Não foi detectada a presença de células CD34.

A viabilidade celular das CTM injetadas no tendão foi analisada utilizando o aparelho Countess. As culturas apresentaram uma quantidade média de $3,65 \times 10^5$ células por garrafa de 75 cm², e uma média de 85,33% de células viáveis (tabela 2). Foram injetadas cerca de $4,0 \times 10^5$ células por animal nos grupos CTM e CTM+SF. Para o estudo de migração celular, CTM marcadas com PKH26 foram injetadas no tendão transecionado dos animais do grupo CTM e CTM+SF, e analisadas em função do tempo através de imageamento *in vivo*. Na figura 5A é possível observar as imagens das patas inferiores dos animais no 1^o, 2^o, 3^o, 7^o e 14^o dias após a aplicação das CTM. Os animais também foram analisados no 21^o dia após o tratamento e não apresentaram nenhuma marcação em ambos os grupos (imagem não apresentada). As imagens apresentadas são aquelas que melhor representaram a média do grupo. O rato controle *sham* apresentou uma leve marcação apenas no primeiro dia e o rato controle negativo não apresentou nenhuma marcação em nenhum dia (imagem não apresentada). Com relação aos resultados comparando a área ocupada pelas CTM no grupo CTM e CTM+SF, em diferentes tempos após a aplicação no tendão (figura 5B), é possível observar diferenças significativas no 1^o dia no grupo CTM versus CTM+SF ($p < 0,001$). Além disso, houve uma diminuição gradual da área marcada até o 7^o dia em ambos os grupos, desaparecendo no 14^o dia no grupo CTM e aumentando no grupo CTM+SF. A comparação da intensidade de fluorescência ($\times 10^8$ P/s/mm²) das CTM no grupo CTM e CTM+SF, em diferentes tempos após a aplicação no tendão (figura 5C), apresentou resultado estatisticamente significativo no 1^o dia para o grupo CTM em relação ao grupo CTM+SF no mesmo período ($p < 0,05$). A fluorescência do grupo CTM foi diminuindo gradativamente até o 3^o dia, e teve um pequeno aumento no 7^o dia em ambos os grupos. No entanto, no grupo CTM+SF a fluorescência teve uma pequena

diminuição no 3º dia, aumentando gradativamente até o 14º. Os dados apresentados nos gráficos (figura 5B e 5C) foram normalizados em função do *sham*.

Nos resultados do RT-PCR array, foram observadas importantes alterações no nível de expressão de genes relacionados à diferenciação celular e ao remodelamento da MEC dos tendões dos diferentes grupos, embora não tenham sido estatisticamente significativos em sua maioria. Um maior nível de expressão do gene tenomodulin, estatisticamente significativo, foi observado no grupo CTM em relação ao grupo SF ($p=0,014$). Tendências à maior expressão dos genes escleraxis, GDF-5, TGF- β , MMP-2 e TIMP-2 foram observadas no grupo CTM em comparação aos outros grupos transecionados. Nos grupos SF e CTM+SF, também houve tendência à maior expressão dos genes TNF- α e IL-1 β (Figura 6).

A análise dos resultados da dosagem de hidroxiprolina (figura 7), a qual é um indicador indireto da concentração de colágeno no tecido, mostrou que o grupo CTM apresentou maior concentração de hidroxiprolina quando comparado aos outros grupos transecionados, mas sendo estatisticamente significativo ($p=0,041$) apenas quando comparado ao grupo N. Vale ressaltar que foram usados tendões calcâneos inteiros.

A birrefringência referente à região de transecção dos tendões dos grupos T, SF, CTM e CTM+SF analisados através de microscopia de polarização, mostrou uma distribuição bastante diversificada dos feixes de colágeno entre os grupos analisados (figura 8). Nenhuma diferença aparente foi notada entre os grupos CTM e CTM+SF. A birrefringência bem como a diversidade observada, podem ser visualizadas na figura 8 A, B, C, D, onde a intensidade da birrefringência, assim como as diferenças em graus de compactação dos feixes de colágeno podem ser claramente notados. A análise das medidas de birrefringência mostrou brilho mais intenso no grupo SF em relação aos demais grupos, sendo o valor significativo ($p < 0,001$).

Nos cortes corados com Hematoxilina de Harris, observa-se células fibroblásticas em grande número na área de lesão quando comparadas ao grupo normal (figura 9 A, C, E, G, I). Todos os grupos experimentais apresentaram maior quantidade de fibroblastos em relação ao grupo N, com $p < 0,001$ (tabela 3).

No ensaio para detecção de apoptose, foi observado maior número de células com marcação positiva nos grupos T e CTM em relação ao tendão normal (figura 9 B, D, F, H, J). O grupo N apresentou menor índice apoptótico em relação a todos os

grupos ($p < 0,001$); os grupos SF ($p < 0,001$) e CTM+SF ($p = 0,003$) apresentaram menor índice apoptótico em relação ao grupo T. O grupo SF também apresentou menor índice apoptótico quando comparado aos grupos CTM e SF+CTM ($p < 0,001$) (Tabela 3).

A detecção para colágeno III através de imunohistoquímica (figura 10), mostrou reação positiva para todos os grupos na região epitendínea, sendo mais intensa nos grupos SF e CTM+SF.

Através da imunofluorescência utilizando os marcadores de superfície celular CD90 e CD105, característicos desse tipo de células-tronco, observou-se a presença de pequena quantidade de CTM na região transeccionada de tendões dos grupos CTM+SF e CTM (Figura 11).

Por meio da avaliação biomecânica, foi analisada a força máxima suportada pelos tendões, sendo estatisticamente significativo para o grupo T quando comparado ao grupo CTM ($p = 0,011$) e ao grupo CTM+SF ($p = 0,031$). O parâmetro deslocamento máximo não apresentou nenhuma diferença significativa entre os grupos, assim como os parâmetros deformação máxima e rigidez. Já para área de secção transversal e tensão máxima, o grupo N apresentou valores inferiores e superiores, respectivamente, a todos os grupos transeccionados ($p < 0,001$) (figura 12).

FIGURAS

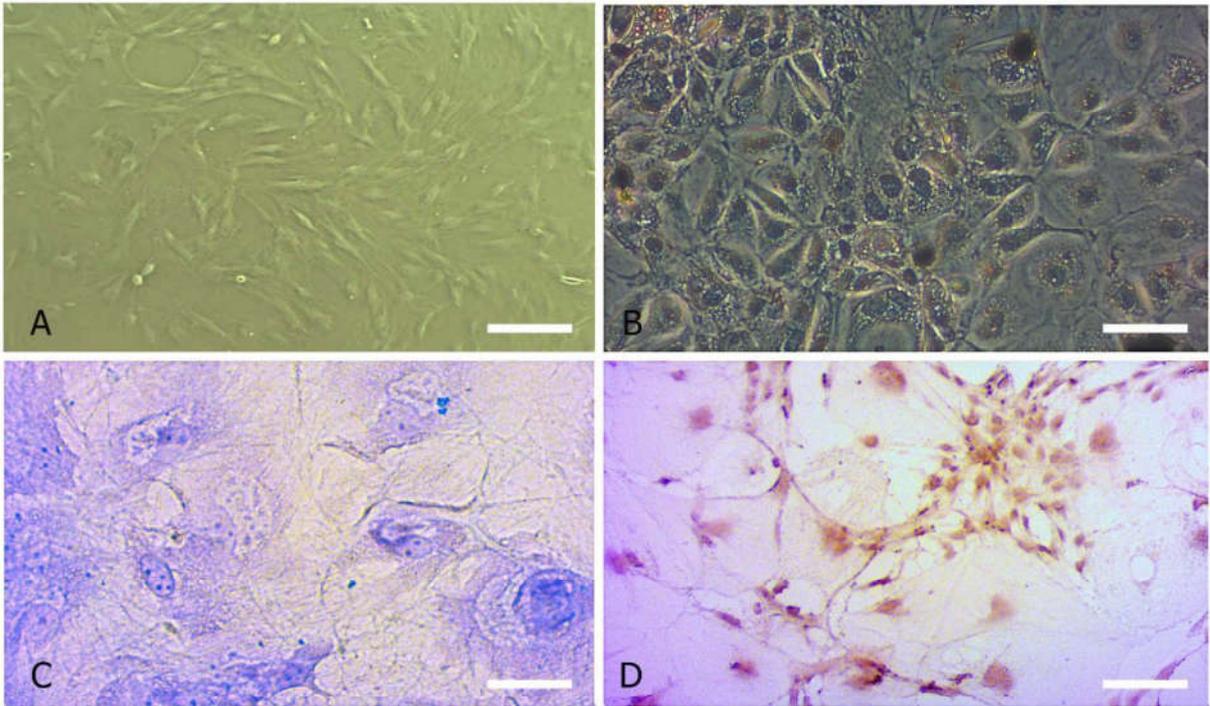


Figura 3: Células em cultura, submetidas a diferenciação. A) CTM em cultura na 5°P; B) Diferenciação adipogênica das CTM e coloração com oil red; C) Diferenciação condrogênica das CTM seguidas da coloração com azul de toluidina; D) Diferenciação osteogênica das CTM e coloração com alizarina red.

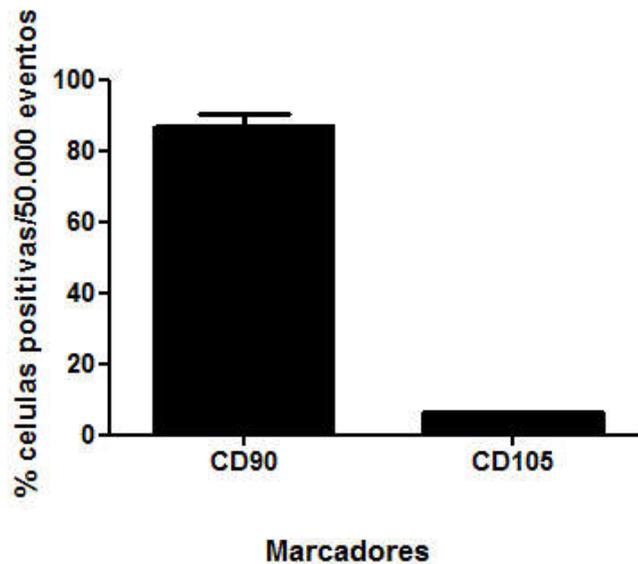
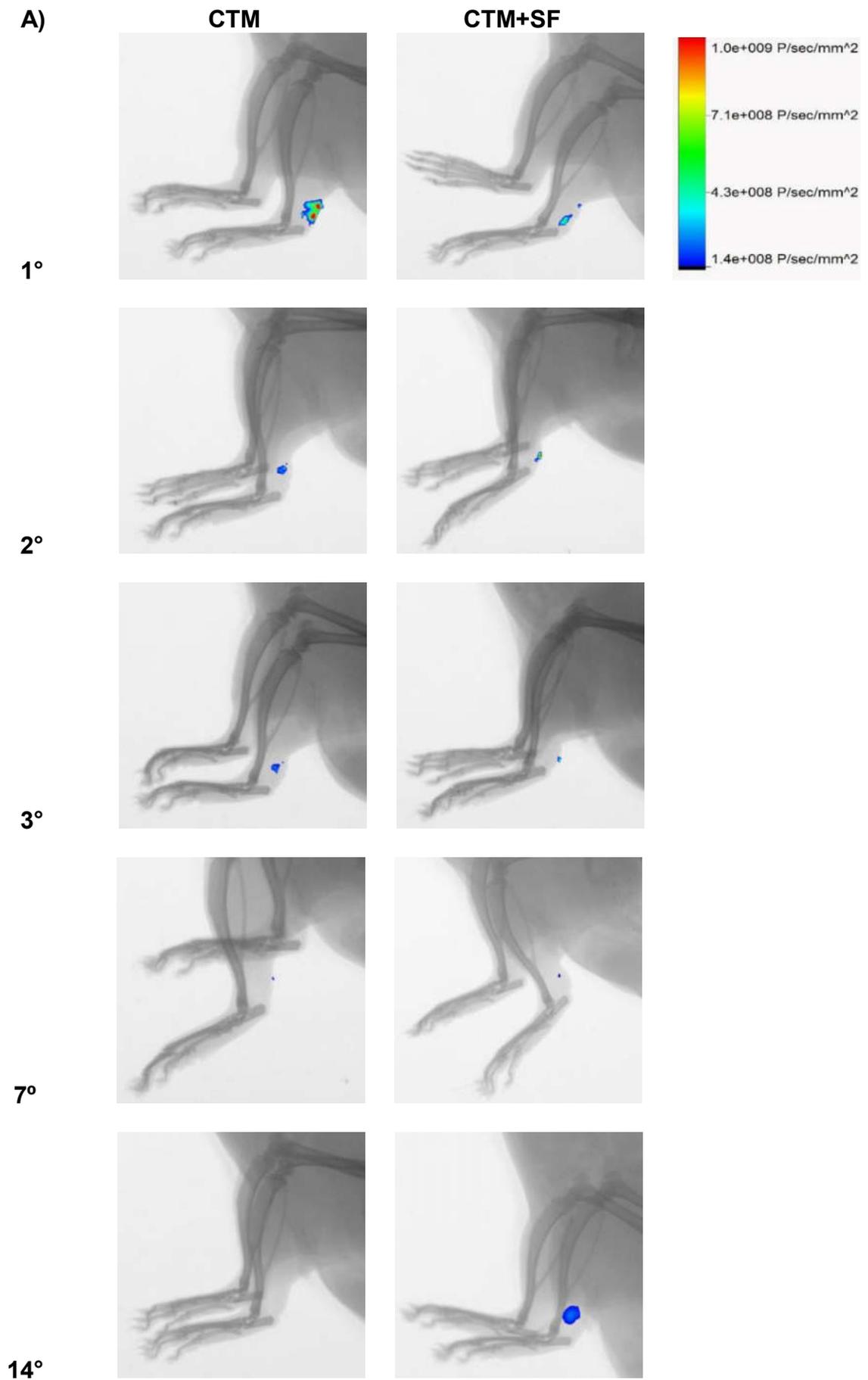


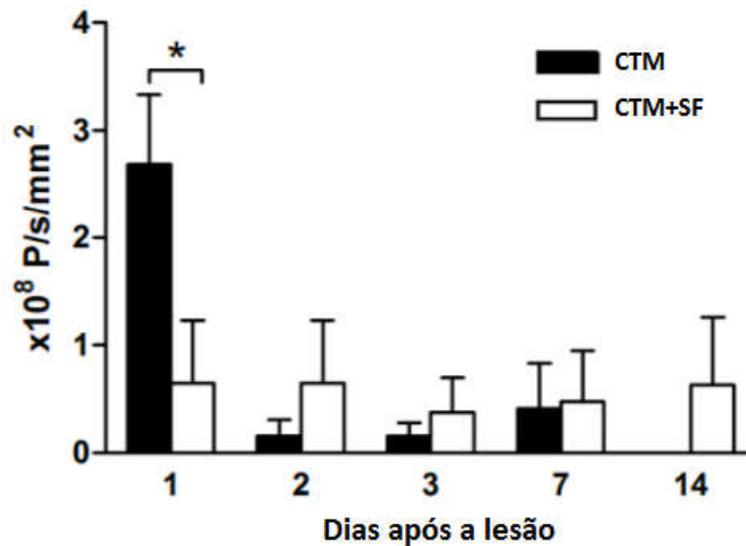
Figura 4: Citometria de fluxo para as CTM na 5° passagem. Observe a porcentagem de marcação positiva para CD90 e CD105, marcadores de superfície celular típicos de células-tronco mesenquimais.

Tabela 2: Valores de contagem e viabilidade celular das CTM no momento da aplicação nos tendões.

	Quantidade de Células	Células viáveis	Células não viáveis
Cultura 1	$3,34 \times 10^5$	93%	7%
Cultura 2	$3,81 \times 10^5$	80%	20%
Cultura 3	$3,81 \times 10^5$	83%	17%
Média	$3,65 \times 10^5$	85,33%	14,7%



B) Intensidade de Fluorescência



C) Área de Marcação

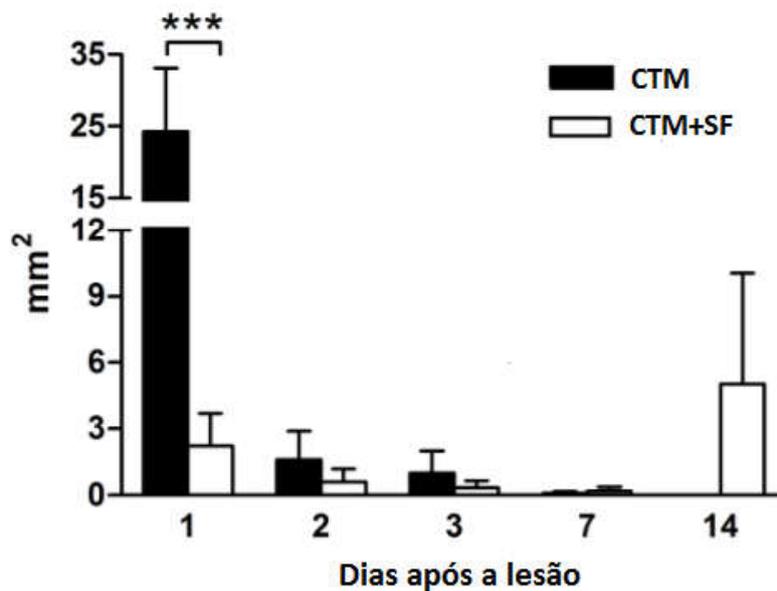


Figura 5: A) Imageamento *in vivo* das patas inferiores de ratos Lewis, com o tendão calcâneo direito submetido à transecção parcial e aplicação de CTM marcadas com PKH26, dos grupos CTM e CTM+SF no 1°, 2°, 3°, 7° e 14° dias após a lesão. Escala: intensidade de fluorescência ($\times 10^8$ P/s/mm²). **B e C)** Intensidade de fluorescência e área ocupada pelas CTM marcadas com PKH26 nos grupos CTM e CTM+SF, no 1°, 2°, 3°, 7° e 14° dias após a lesão. Diferença significativa representada por * ($p < 0,05$) e *** ($p < 0,001$), entre o grupo CTM e CTM+SF.

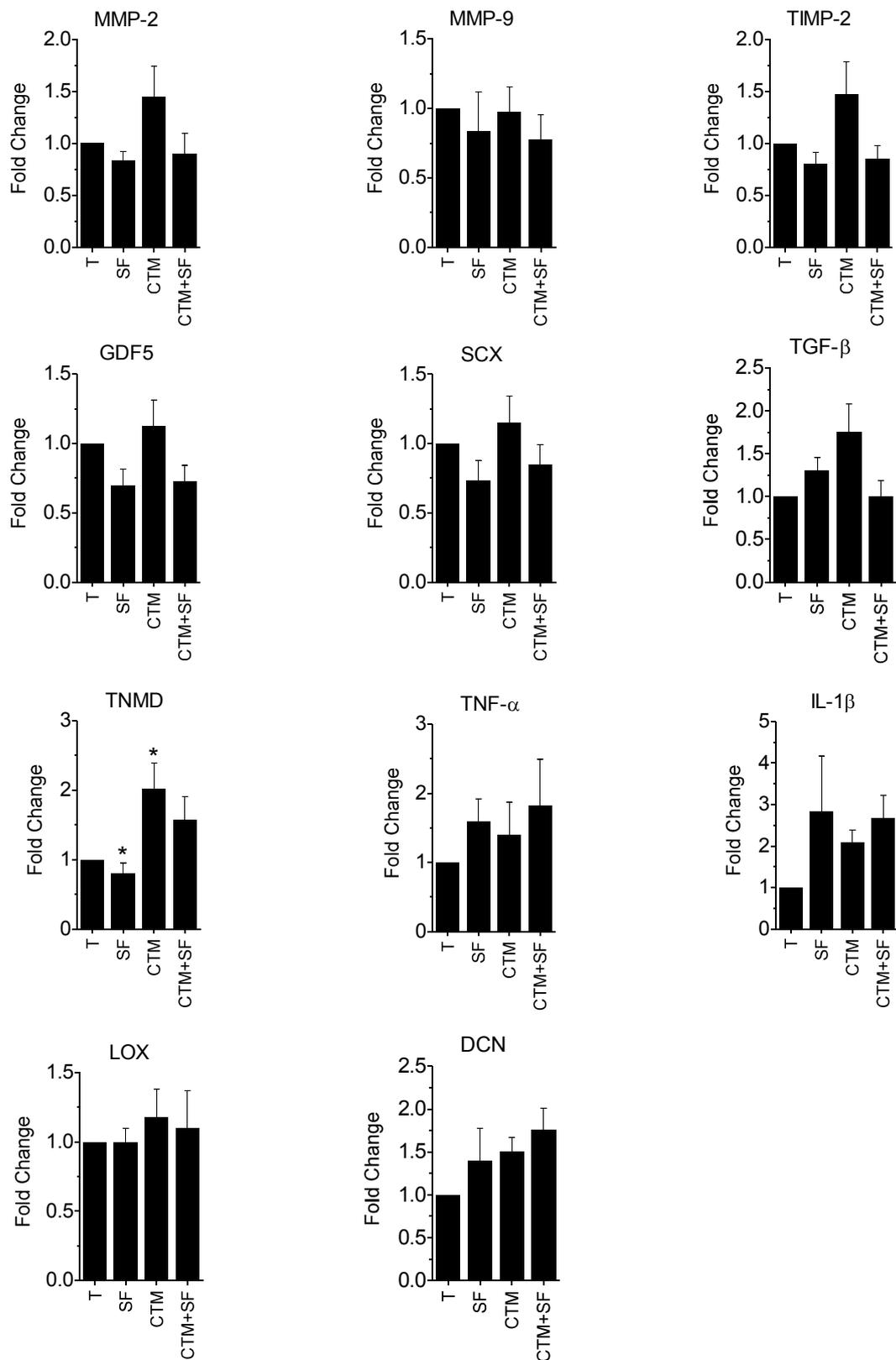


Figura 6: Análise de expressão gênica através do RT-PCR Array. Foi observada diferença significativa (*) apenas para o gene tenomodulin (TNMD), cuja maior expressão pode ser notada no grupo CTM em relação ao grupo SF ($p=0,014$).

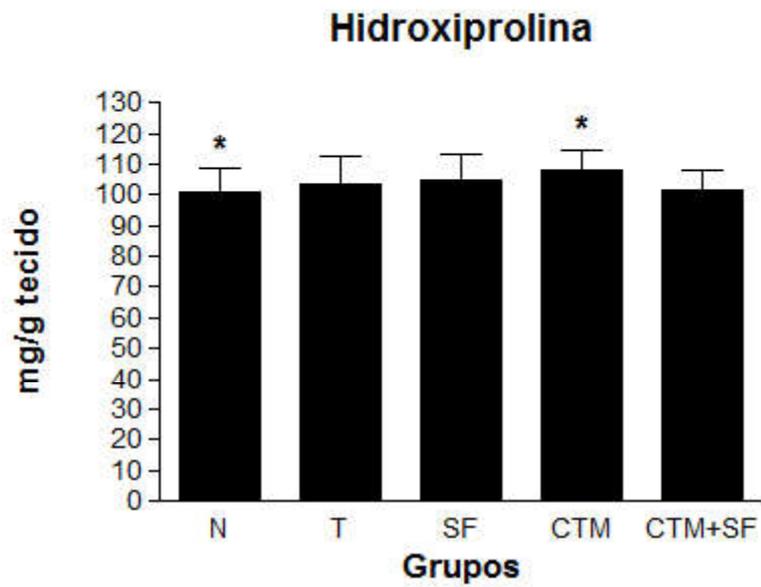
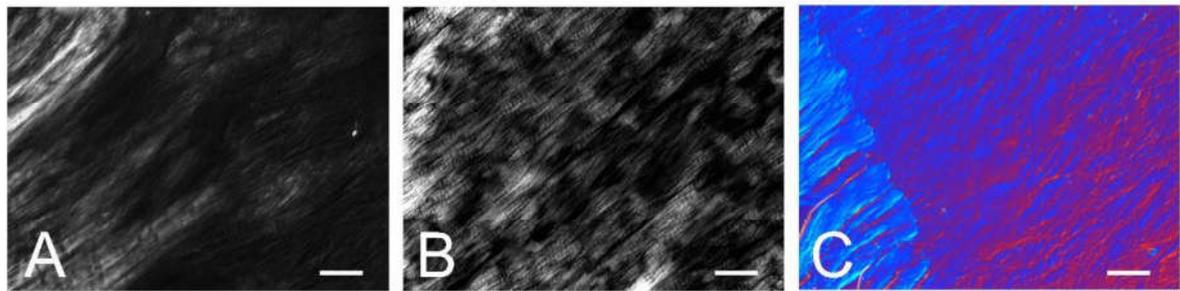


Figura 7: Concentração de hidroxirolina (mg/g de tecido), dos tendões inteiros dos grupos N, T, CTM, SF e CTM+SF. Observe uma maior concentração de hidroxirolina no grupo CTM em comparação aos outros grupos que apresentaram concentrações bem semelhantes entre si. Diferença significativa (*) entre o grupo N e CTM ($p < 0,05$).



D

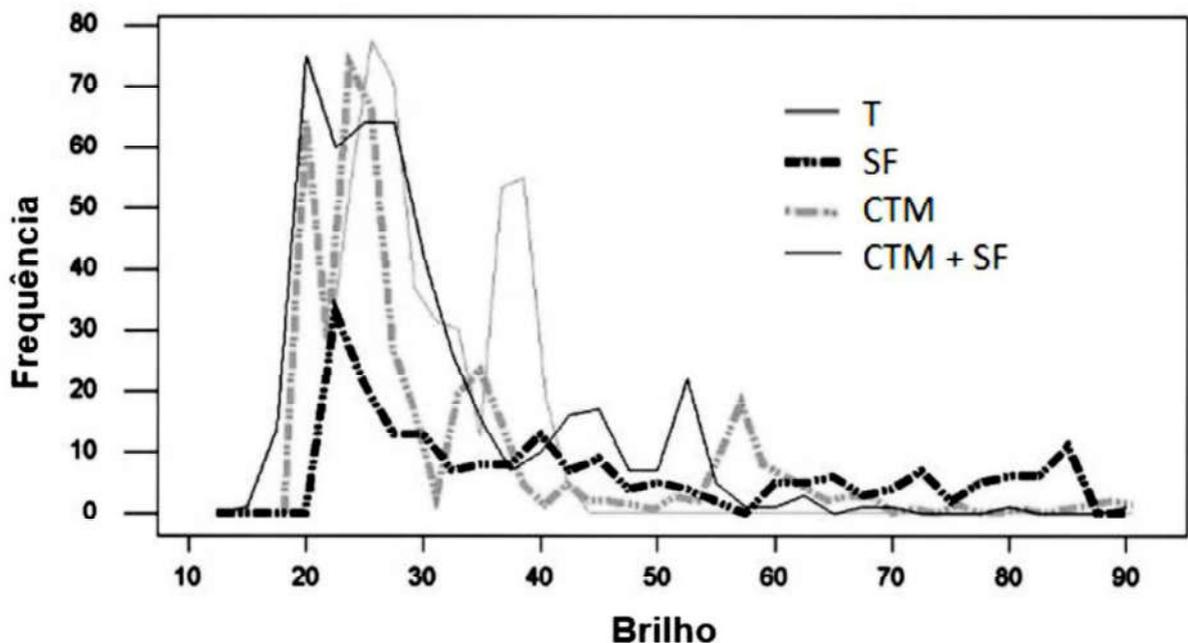


Figura 8: Imagens e frequência da birrefringência nos diferentes grupos. A) No grupo T é observado pouco brilho devido a muitos feixes de colágeno não estarem organizados. B) Já no grupo SF, foi notável o aumento do brilho de birrefringência e observa-se um típico padrão de *crimp* bem desenvolvido, encontrado apenas neste grupo. C) Grupo CTM, mostra uma imagem com o uso do DIC, onde é possível visualizar em vermelho uma menor organização dos feixes de colágeno, e em azul intenso (conforme a tabela de Michel-Lévy) o alto grau de compactação dos feixes de colágeno. Barra = 200 μm (A); 50 μm (B); 100 μm (C). A figura (D) apresenta a frequência de valores de birrefringência para os grupos T, SF, CTM e CTM+SF. Os quatro grupos apresentaram valores < 50 megapixels, mas apenas os grupos SF, CTM e CTM + SF apresentaram valores > 50 megapixels, com maior brilho no grupo SF.

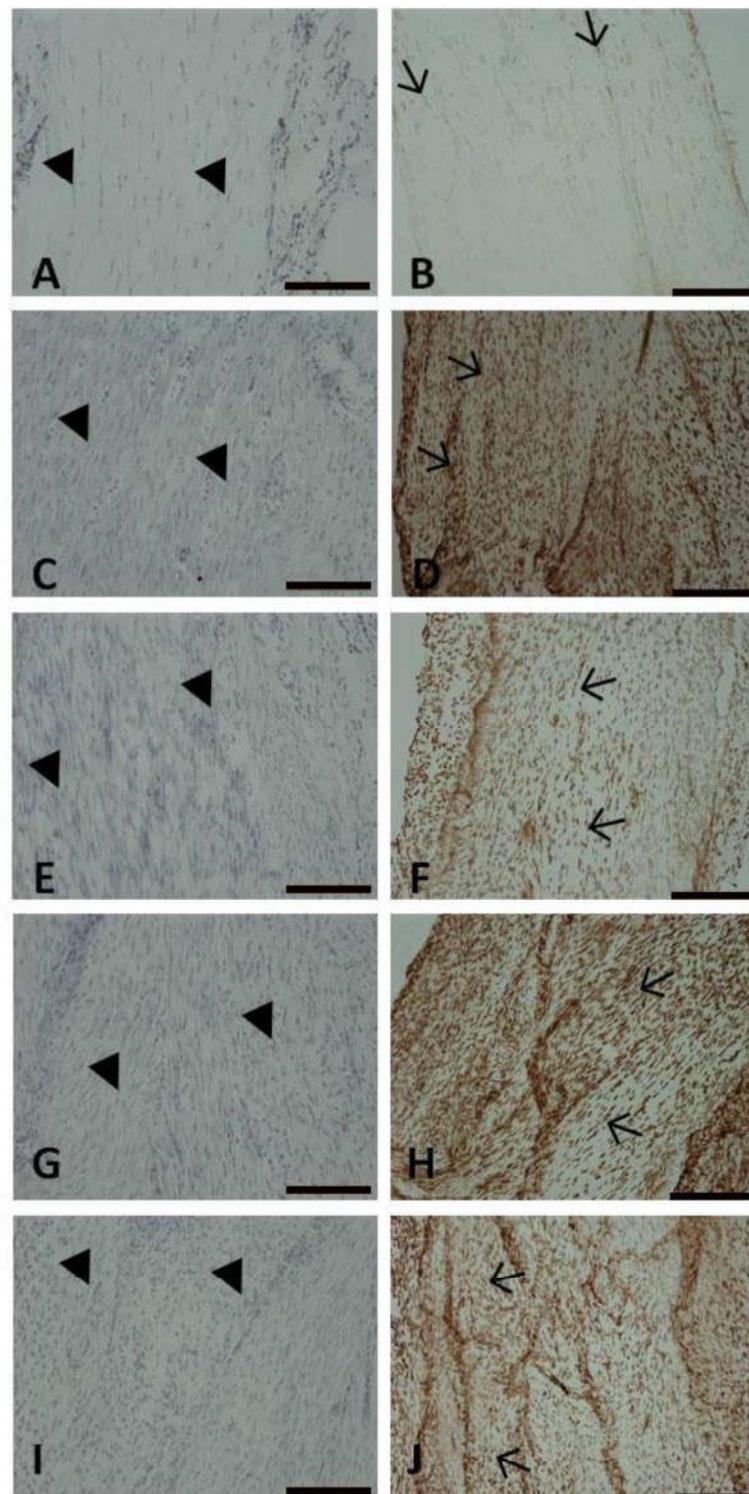


Figura 9: Cortes longitudinais da região de transecção do tendão calcâneo, corados com Hematoxilina de Harris (A, C, E, G, I) e cortes submetidos à reação para detecção de apoptose (TUNEL) (B, D, F, H, J). Figura A e B – grupo N; C e D – grupo T; E e F grupo SF; G e H – grupo CTM; I e J – grupo CTM+SF. Cabeça de Seta – núcleo de células fibroblásticas. **Seta** - células com reatividade positiva para TUNEL. Barra = 200 μ m.

Tabela 3 – Número total de células fibroblásticas e Índice apoptótico (núcleos marcados/núcleos não marcados em $10^4\mu\text{m}^2$) na área de transecção do tendão calcâneo. Diferença significativa (*) entre o grupo N e os outros grupos; (a, b, c, d, e) diferenças significativas entre os grupos marcados com a mesma letra.

Grupos	N	T	SF	CTM	CTM+SF
Células fibroblásticas (n/ $10^4\mu\text{m}^2$)	$26,6 \pm 3,8$	$88,7 \pm 11,7$	$93,9 \pm 9,8$	$96,7 \pm 12,3$	$90,5 \pm 14,2$
Índice apoptótico (%)	$5,3 \pm 1,9^*$	$49,8 \pm 7,3^{*,a,b}$	$26,8 \pm 6,6^{*,a,c,d}$	$54,9 \pm 5,8^{*,c,e}$	$39,7 \pm 8,5^{*,b,d,e}$

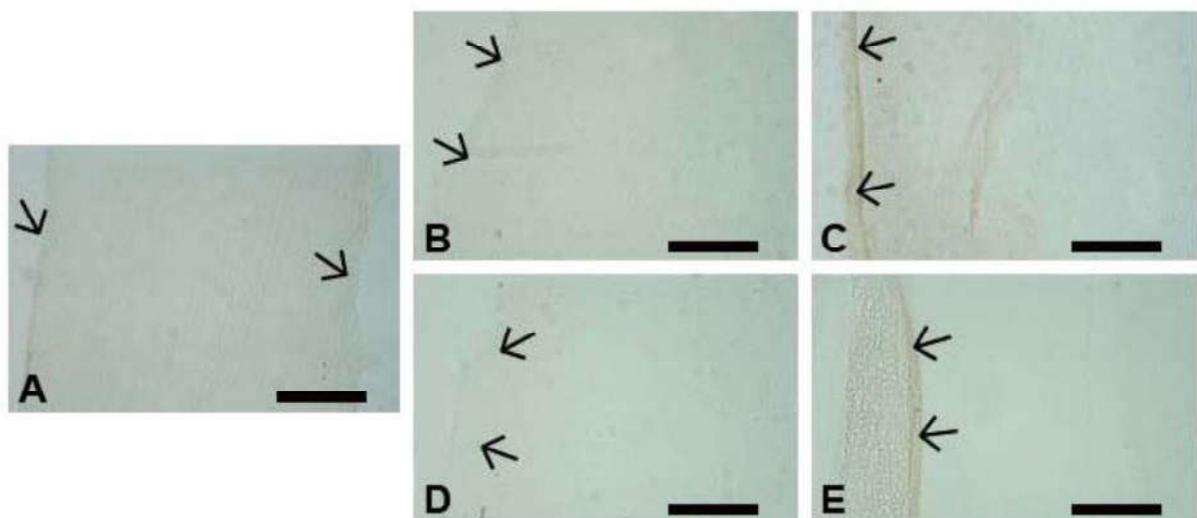


Figura 10: Imunohistoquímica para colágeno III em cortes longitudinais da região de transecção do tendão calcâneo. A) grupo N, B) grupo T, C) grupo SF, D) grupo CTM e E) CTM+SF. Observe a marcação positiva apenas na região do epitendão. Note que a reação foi mais intensa nos grupos SF (C) e CTM+SF (E). Seta - reação positiva. Barra = 200 μm .

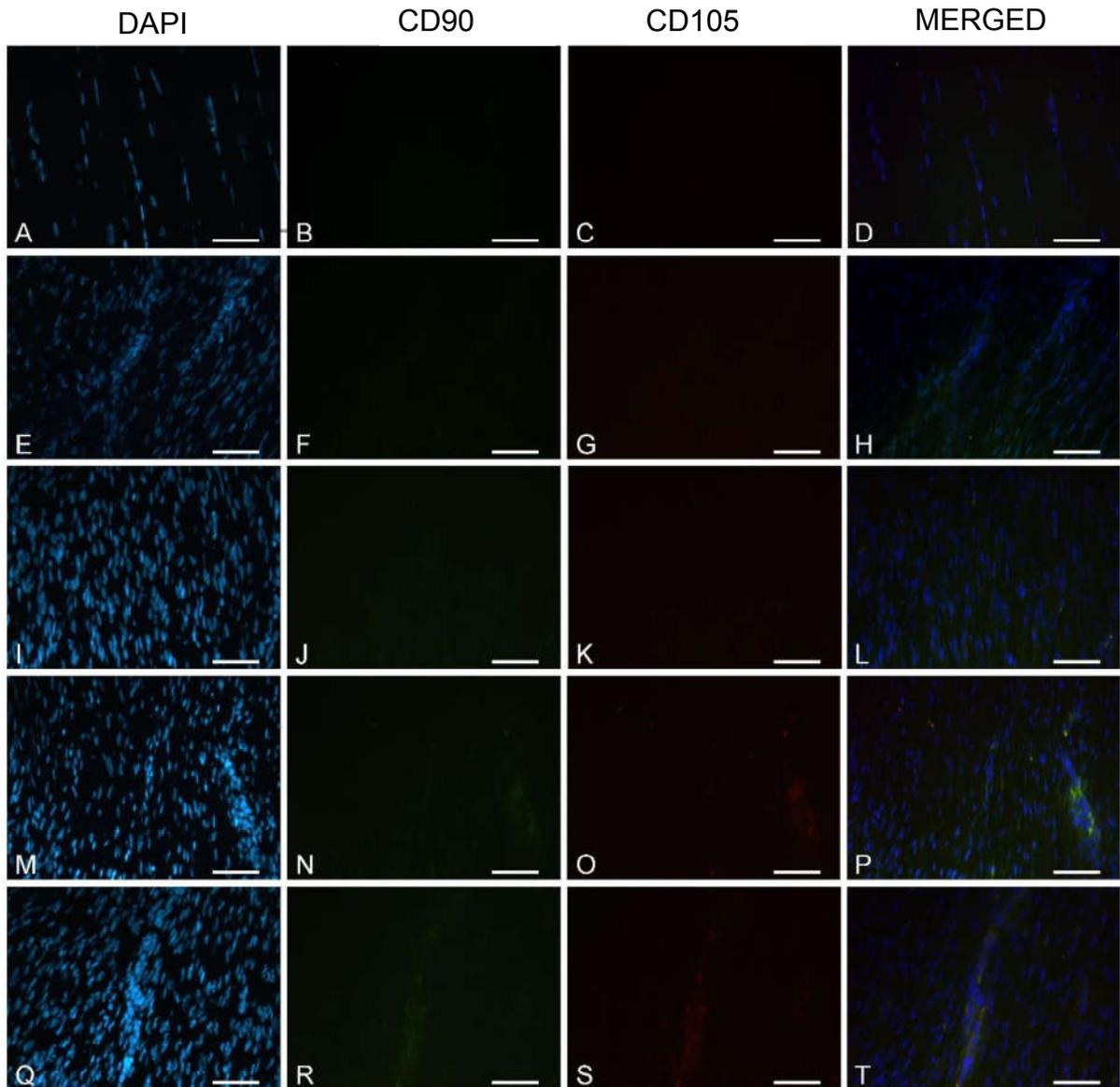


Figura 11: Imunofluorescência para CD90 e CD105 na região de transecção do tendão calcâneo, Grupos: N (A, B, C, D), T (E, F, G, H), SF (I, J, K, L), CTM (M, N, O, P), CTM+SF (Q, R, S, T). Observe marcação CD90 positiva somente nos grupos CTM (N) e CTM+SF (R), assim como marcação CD105 positiva nos mesmo grupos, CTM (O) e CTM+SF (S). Barra = 50 μ m.

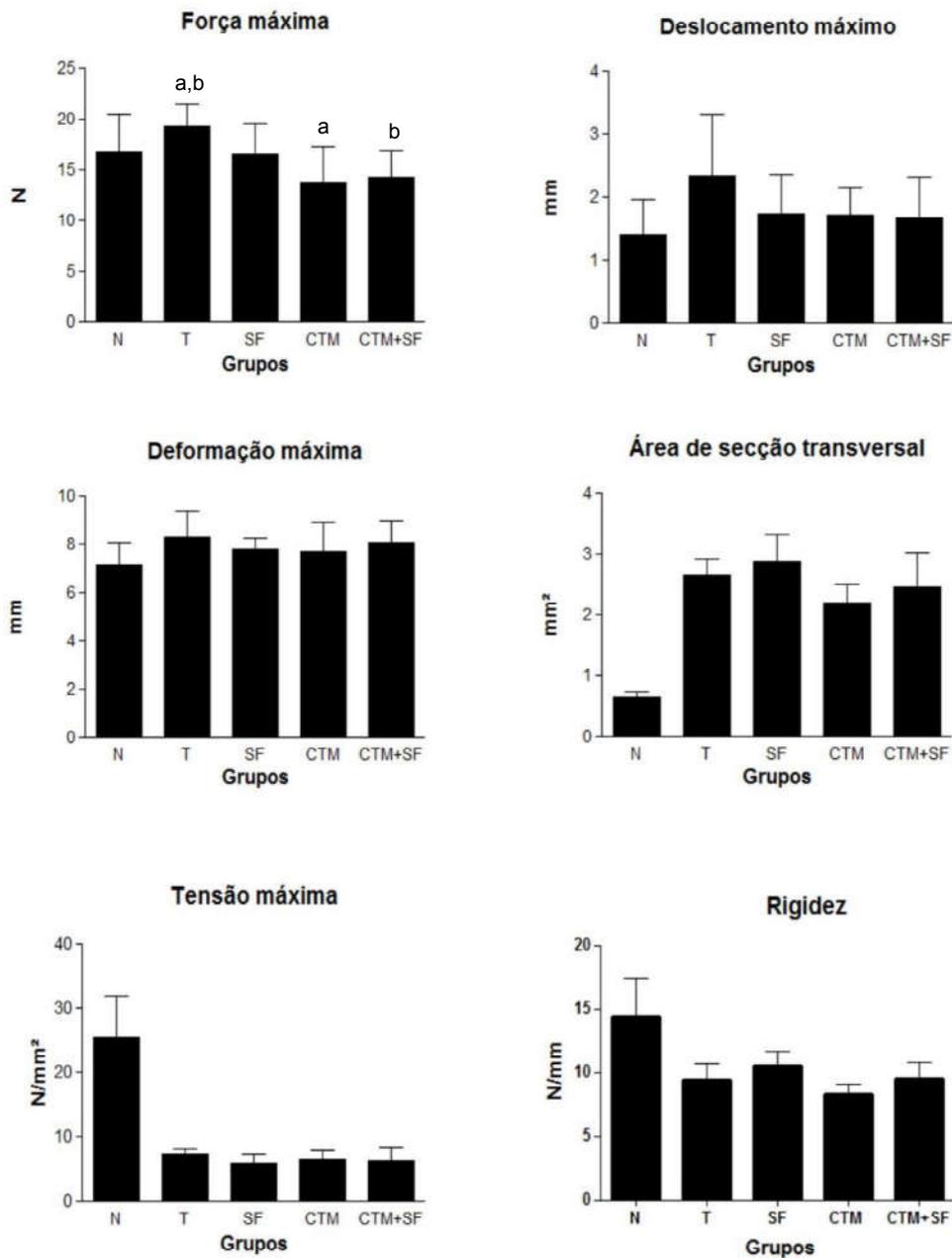


Figura 12: Teste biomecânico dos tendões para os seguintes parâmetros: força, deslocamento, deformação, área de secção transversal, tensão e rigidez. Diferença significativa (^{a, b}) entre o grupo T versus CTM ($p=0,011$) e CTM+SF ($p=0,031$), para força máxima.

5. DISCUSSÃO

Em estudos anteriores realizados em nosso laboratório foi observada a efetividade da aplicação de CTM sobre o tendão calcâneo parcialmente transecionado, isoladas e associadas com fator de crescimento, no 14º e 45º dias após a lesão (artigos em preparação). No presente estudo, foi analisado o efeito da aplicação tanto de CTM isoladas, como combinada com selante de fibrina, mantendo uma linha de estudos focada nos mecanismos moleculares envolvidos na diferenciação das células-tronco em fibroblastos, assim como nos efeitos parácrinos da CTM no ambiente da lesão. Ainda existem poucos estudos sobre o efeito da aplicação de CTM no reparo do tendão, sendo que diversos estudos apontam o efeito imunomodulatório, anti-inflamatório e a liberação de fatores de crescimento pelas CTM em outros tecidos e *in vitro* (Peroni e Borjesson, 2011; Lee et al., 2011; Wang et al., 2014). Sendo assim, nosso principal objetivo foi verificar se o uso de CTM e de CTM combinada com selante de fibrina foi efetiva no remodelamento da MEC no 21º dia de reparo do tendão calcâneo.

De acordo com o imageamento *in vivo*, resultado marcante foi observado no grupo CTM quanto a intensidade de fluorescência e área de marcação, no 1º dia após a cirurgia, em relação ao grupo CTM+SF. Acreditamos que essa maior área marcada com células-tronco no 1º dia após a lesão, possa ter influenciado a resposta celular no ambiente da lesão, visto os diferentes resultados encontrados principalmente na análise de expressão gênica dos diferentes grupos. Vale ressaltar que, em nosso modelo de transecção, é provável que tenha ocorrido a interação entre as células presentes no ambiente da lesão com as CTM aplicadas. A literatura descreve os efeitos parácrinos das CTM na modulação da atividade celular (Peroni e Borjesson, 2011; Lee et al., 2011; Wang et al., 2014), assim como os efeitos de moléculas secretadas por fibroblastos sobre a atividade das CTM (Veronesi et al., 2015). Alguns estudos *in vitro* apontaram a capacidade de diferenciação tenogênica das CTM, na presença de estímulos biológicos apropriados, tais como fator de crescimento (Park et al., 2010; Raabe et al., 2013), forças de tensão (Raabe et al., 2013) e quando cultivada em co-cultura com tenócitos (Veronesi et al., 2015).

Do 2º até o 7º dia, maior intensidade de fluorescência, assim como menor área de marcação, foram observados em ambos os grupos CTM e CTM+SF. Esse resultado pode indicar uma maior agregação das CTM na região lesionada. Vale

ressaltar que, somente o grupo CTM+SF apresentou marcação no 14º dia, com intensidade de fluorescência semelhante a observada nos períodos anteriores, assim como maior área de marcação, possivelmente pelo fato do selante de fibrina ter se degradado e liberado as CTM. Nossos dados corroboram com o estudo *in vivo* de Wolbank e colaboradores (2015), o qual implantou em camundongos, por via subcutânea, coágulos de fibrina marcados com fluoróforo e acompanhou sua degradação por 21 dias através de imageamento *in vivo*. O estudo aponta que grande parte do coágulo de fibrina é degradado por volta de 14 dias, e após 16 dias está totalmente degradado.

Bensaïd e colaboradores (2003) através de um estudo *in vitro*, demonstrou que o *scaffold* de fibrina em conjunto com células-tronco mesenquimais humanas (HMSCs), dependendo da concentração de fibrinogênio e trombina é degradado por volta de 14 a 15 dias. É importante mencionar que no decorrer do processo de reparo, a intensidade de fluorescência no grupo CTM+SF quase não variou até o 14º dia, isso se deve a adesão das células no *scaffold* fibrina, o qual as manteve agregadas até ser degradado. O estudo de Gasparotto e colaboradores (2014) mostra que o selante de fibrina derivado de peçonha de serpente, o mesmo utilizado no presente estudo, proporciona crescimento e aderência de grande quantidade de células tronco na densa rede de fibrina formada pelo selante.

Os resultados de expressão gênica mostraram-se muito elucidativos, embora não tenham sido estatisticamente significativos em sua maioria, pois em alguns grupos observamos uma maior tendência a expressão de alguns genes importantes. No caso da expressão gênica para GDF-5 e TGF- β , observamos uma marcante tendência a maior expressão desses genes no grupo CTM, em relação aos outros grupos experimentais. Sabe-se que tanto o GDF-5 como o TGF- β , entre outros fatores, estão relacionados com o estímulo da síntese de colágeno (Rickert et al., 2001; Klein et al., 2002; Kyurkchiev et al., 2014, Veronesi et al., 2015). O resultado de expressão gênica corrobora com os dados da dosagem de hidroxiprolina, a qual apresentou maior concentração no grupo CTM quando comparado ao grupo N, inferindo maior concentração de colágeno total no tecido.

Segundo o estudo de Wang e colaboradores (2015), o tratamento com CTM pode aumentar a expressão do colágeno tipo I e III, tanto em fibroblastos dérmicos humanos irradiados por UVB como não irradiados. Segundo Kim e colaboradores (2011), a expressão do pró-colágeno tipo I aumenta significativamente na pele de

camundongo após aplicação de CTM. CTM aplicadas sobre o tendão calcâneo lesionado de coelhos auxiliaram na cicatrização do tendão e aumentaram o colágeno tipo I (Uysal et al., 2012). Em nossos resultados, a detecção de colágeno tipo III na região epitendínea foi mais intensa nos grupos SF e CTM+SF quando comparados aos outros grupos. De acordo com Kannus (2000), o colágeno tipo III em tendões normais, geralmente está restrito ao endotendão e epitendão. Resultados de Pontes et al. (2012) corroboram com nossos dados, uma vez que também demonstraram um aumento na concentração de colágeno (não especificado qual tipo de colágeno) no grupo tratado com selante de fibrina, sugerindo a atuação da fibrina na síntese do colágeno.

Ainda com relação ao GDF-5, também é conhecido seu papel na diferenciação das CTM em fibroblastos (Naderi et al., 2016). Observamos uma tendência a maior expressão do GDF-5 no grupo CTM, assim como de dois outros genes importantes na indução e na diferenciação de CTM em fibroblasto, tais como os genes escleraxis e tenomodulim. A escleraxis é um fator de transcrição responsável pela diferenciação de células tronco em fibroblastos, e é especificamente detectado em populações precursoras de células de tendão (Veronesi et al., 2015; James et al., 2008). Já o tenomodulim é um marcador de membrana presente em fibroblastos e atua como regulador da proliferação celular, diferenciação e maturação de fibrilas de colágeno (Shukunami et al., 2006; Oshima et al., 2003). Uma maior tendência à expressão de escleraxis foi observada no grupo CTM, assim como aumento significativo da expressão de tenomodulim foi observada nesse mesmo grupo em relação ao grupo SF. Esses dados indicam uma maior diferenciação em fibroblastos, possivelmente a partir de células tronco residentes do tendão (Lui, 2013) ou a partir das CTM aplicadas (Uysal et al., 2011; Veronesi et al., 2015).

Nossos dados morfométricos também indicaram um marcante aumento do número de fibroblastos no grupo CTM, embora não seja estatisticamente significativo em relação aos outros grupos, corroborando com a expressão de tenomodulim. Estudo *in vivo* de Uysal et al. (2012) mostrou que as CTM aplicadas em tendão calcâneo de coelhos aumentam a produção de fator básico de crescimento de fibroblasto (bFGF). Outro estudo também obteve resultados semelhantes, onde a quantidade de fibroblastos da pele de camundongos nude foram significativamente aumentados com a aplicação subcutânea de CTM

comparado ao grupo controle (Kim et al., 2011). Considerando o índice apoptótico, o selante de fibrina diminuiu significativamente a ocorrência da apoptose quando aplicado isoladamente nos tendões ou associado as CTM. Nossos dados corroboram com o estudo de Gasparotto e colaboradores (2014), o qual mostrou taxa de viabilidade celular acima de 80% para células tronco cultivadas na presença do mesmo selante de fibrina utilizado em nosso estudo, indicando manutenção de sua funcionalidade.

Com relação às citocinas pró-inflamatórias, TNF- α e IL-1 β , expressão mais proeminente foi observada nos grupos SF e CTM+SF. Dados de Peres (2014), mostraram aumento marcante de infiltrado inflamatório durante a fase inicial de cicatrização da pele de ratos com aplicação isolada de selante de fibrina ou associado à CTM, em relação aos outros grupos com sutura, (mesmo SF utilizado em nosso estudo). A tendência à maior expressão de TNF- α e IL-1 β observada nos grupos transeccionados seguidos da aplicação do selante de fibrina, pode estar relacionada a um processo inflamatório, com resquícios ainda no 21º dia, considerando a permanência da fibrina até o 14º dia na região lesionada. Yücel e colaboradores (2003) mostraram em seu estudo que apesar da aplicação do selante de fibrina aumentar a inflamação nos primeiros dias após a aplicação, a matriz de fibrina auxilia a recuperação do tecido. E com o passar do tempo há um decréscimo da inflamação, até a fibrina ser totalmente absorvida que ocorre por volta de 2 semanas.

De acordo com os dados estruturais, maiores valores de birrefringência foram detectados no grupo SF, seguido do grupo CTM+SF, refletindo maior organização dos feixes de colágeno. Em estudo de Tuan e colaboradores (1996) foi demonstrado que os fibroblastos cultivados junto com o gel de fibrina, reorganizam ativamente a matriz de fibrina e sintetizam colágeno, refletindo no remodelamento tecidual. Seus dados demonstraram que as fibrilas de fibrina são, em grande parte, removidas e substituídas por fibrilas de colágeno e outros componentes filamentosos da MEC. Outros estudos apontam a fibrina como um *scaffold* para produção e organização do colágeno (Radosevich et al., 1997; Branski et al., 2011). Embora não tenha sido significativa, a expressão de MMP-2 e de TIMP-2 foi proeminente no grupo CTM, o que pode ter refletido na baixa organização dos feixes de colágeno nesse grupo. Estudos realizados em nosso laboratório vêm mostrando a relação do aumento de MMP-2 e o maior remodelamento da MEC durante o processo de cicatrização

tendínea (Aro et al., 2012; Da Re Guerra et al., 2013). Portanto, embora tenha sido observado um aumento na expressão da MMP-2, o seu inibidor também mostrou-se aumentado, impedindo sua atuação no remodelamento tecidual no grupo CTM (Bernardo e Fridman, 2003).

Os parâmetros biomecânicos analisados, tais como deformação máxima, deslocamento máximo, área de secção transversal e tensão máxima não apresentaram diferenças significativas entre os grupos transeccionados. Entretanto, no parâmetro carga máxima, o grupo T curiosamente apresentou valor superior em relação aos grupos CTM e CTM+SF. Esse dado corrobora com o estudo de Kraus e colaboradores (2014), no qual foram encontrados valores biomecânicos ligeiramente superiores no grupo tratado com as BMSC no 14º dia, e aumento significativo no resultado biomecânico ao longo do tempo, entre o 14º e 28º dia, apenas para o grupo transeccionado controle.

Com relação à utilização da fibrina, em um estudo feito com tendão flexor digital profundo de cães, com aplicação de selante de fibrina derivado de peçonha de serpente (o mesmo SF utilizado neste estudo), mostrou que ao longo do período de cicatrização, no 7º, 15º e 30º dias após a cirurgia, o tendão ganhou resistência biomecânica (Ferraro et al., 2005). Entretanto, nossos resultados biomecânicos para o grupo SF apresentou-se semelhante aos grupos T, CTM e CTM+SF. Uysal e Mizuno (2011) em sua pesquisa em tendão calcâneo de coelhos, mostram que a aplicação tópica de CTM no local da lesão, aumenta significativamente a resistência a tração nas fases iniciais do processo de reparo do tendão.

Quando se analisa o parâmetro de tensão, ou seja, os valores de força mecânica dividido pela área de secção transversal do tendão, não foram encontradas diferenças entre os grupos transeccionados. A heterogeneidade encontrada para os valores de força entre esses grupos foi devido apenas às diferenças na área de secção transversal. Com isso, demonstramos que os tratamentos com CTM e SF, combinados ou isoladamente, não resultaram em alterações no comportamento biomecânico do tendão transeccionado no 21º dia após a lesão.

Após a lesão tendínea, dependendo do tipo e da extensão da lesão, dificilmente o tendão recupera sua estrutura e função, tornando-se mais susceptível a recorrência de lesões (Gajhede-Knudsen et al., 2013; James et al., 2008). Protocolos que tornem mais efetiva essa recuperação tecidual, são importantes pelo

fato de evitarem novas imobilizações as quais levam a efeitos deletérios, tais como a alteração da organização da MEC, seguida da diminuição da resiliência e resistência dos tendões (Tipton et al., 1975; Aro et al., 2008). Kannus e colaboradores (1997) observou que as fibras de colágeno em tendão calcâneo humano, submetido a 15 semanas de imobilização, encontram-se mais finas e desorganizadas. Loitz e colaboradores (1989) relataram uma diminuição de 20% na força máxima do tendão tibial anterior de coelhos após 3 semanas de imobilização. Outro estudo feito com coelhos depois de 4 e 8 semanas de imobilização do membro posterior, mostrou que, a área de secção transversal do tendão calcâneo não se alterou, mas a carga média para ruptura, assim como rigidez média em ambos os grupos imobilizados foi significativamente menor do que a do grupo controle (Matsumoto et al., 2003).

Importante ressaltar que, no presente estudo, os animais não tiveram a pata transeccionada imobilizada após a cirurgia, portanto a demanda biomecânica decorrente da marcha, deve ter atuado na resposta tanto das células presentes no tendão, assim como das CTM implantadas (Trumbull et al., 2016). O mecanismo de sinalização celular desencadeado pela matriz fibrosa, denominado de mecanotransdução e sugerido por Vidal (1994), também pode ter atuado de forma mais intensa nos grupos em que foi utilizada a fibrina, pois nesse caso foi observado maior organização das fibras de colágeno. Os dados estruturais não refletiram diretamente na biomecânica, talvez pelo tempo de recuperação, 21 dias, que é marcado por um início do processo de remodelamento (Silva et al., 2013; Tomiosso et al., 2009; Aro et al., 2012; Da Re Guerra et al., 2013).

Nossos dados mostram a permanência das CTM na região lesionada, quando aplicadas isoladamente ou combinadas com o selante de fibrina. Uma maior expressão de tenomodulin também foi observada após a aplicação somente das células tronco. Já o uso do selante de fibrina, seguida da sua associação com as células tronco, mostrou-se efetivo no reparo tendíneo, especialmente no que se refere à organização da matriz extracelular. Também com relação a presença de colágeno tipo III foi notória sua presença no epitendão nos grupos em que se aplicou fibrina e fibrina combinada com células tronco. Nesses mesmos grupos ainda foi observado um menor índice apoptótico.

6. CONCLUSÃO

Nossos resultados mostram diferenças significativas, em alguns parâmetros, entre os grupos analisados, tais como:

- 1) O imageamento *in vivo* mostrou que as células-tronco permaneceram no local da lesão até o 7° dia, sendo que no caso do grupo SF+CTM, as células-tronco permaneceram até o 14° dia.
- 2) O colágeno tipo III apareceu mais proeminente, apenas na região do epitendão do grupo SF e CTM+SF, que também foram os grupos que apresentaram menor índice apoptótico.
- 3) Os dados da PCR para Escleraxis, MMP-2, MMP-9, TIMP-2, TNF- α , IL-1 β , TGF- β , Decorin, GDF-5 e LOX, não mostraram diferenças significativas entre os grupos, mas no caso do tenomodulin, sua expressão foi acentuada no grupo CTM em relação ao grupo SF.
- 4) A organização dos feixes de colágeno foi maior quando se usa apenas selante de fibrina, seguido da sua associação às CTM.
- 5) Os parâmetros biomecânicos para deformação máxima, deslocamento máximo, área de secção transversal e tensão máxima não apresentaram diferenças significativas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aarvold A, Smith JO, Tayton ER, Lanham SA, Chaudhuri JB, Turner IG, Oreffo RO. The effect of porosity of a biphasic ceramic scaffold on human skeletal stem cell growth and differentiation in vivo. *J Biomed Mater Res A*. 2013; 101(12):3431-7.
- Almeida MS, Aro AA, Guerra FDR, Vieira CP, Vidal BC, Pimentel ER. Electroacupuncture Increases the Concentration and Organization of Collagen in a Tendon Healing Model in Rats. *Connective Tissue Research*. 2012; 53: 542-547.
- Altman GH, Horan RL, Martin I, Farhadi J, Stark PR, Volloch V, Richmond JC, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL. Cell differentiation by mechanical stress. *FASEB J*. 2002; 16(2):270-2.
- Aquino CF, Viana SO, Fonseca ST. Comportamento biomecânico e resposta dos tecidos biológicos ao estresse e a imobilização. *Fisioterapia em movimento*, Curitiba. 2005; 18(2):35-43.
- Aro AA, Esquisatto MAM, Nishan U, Perez MO, Rodrigues RAF, Foglio MA, Carvalho JE, Gomes L, Vidal BC, Pimentel ER. Effect of Aloe Vera Application on the Content and Molecular Arrangement of Glycosaminoglycans During Calcaneal Tendon Healing. *Microscopy Research and Technique*. 2014; 77:964-973.
- Aro AA, Nishan U, Perez MO, Rodrigues RA, Foglio MA, Carvalho JE, Gomes JE, Vidal BC, Pimentel ER. Structural and biochemical alterations during the healing process of tendons treated with Aloe vera. *Life Sciences*. 2012; 91:885-893.
- Aro AA, Perez MO, Vieira CP, Esquisatto MAM, Rodrigues RAF, Gomes L, Pimentel ER. Effect of Calendula Officinalis Cream on Achilles Tendon Healing. *THE ANATOMICAL RECORD*. 2015; 298:428-435.
- Aro AA, Simões GF, Esquisatto MAM, Foglio MA, Carvalho JE, Oliveira ALR, Gomes L, Pimentel ER. Arrabidaea chica extract improves gait recovery and changes collagen content during healing of the Achilles tendon. *Injury, Int. J. Care Injured*. 2013; 44:884-892.
- Aro AA, Vidal BC, Tomiosso TC, Gomes L, Matiello-Rosa SMG, Pimentel ER. Structural and Biochemical Analysis of the Effect of Immobilization Followed by Stretching on the Calcaneal Tendon of Rats. *Connective Tissue Research*. 2008; 49:443-454.
- Arruda ERB, Rodrigues NC, Taciro C, Parizotto NA. Influência de diferentes comprimentos de onda da laserterapia de baixa intensidade na regeneração tendínea do rato após tenotomia. *Rev. bras. fisioter. São Carlos*. 2007; 11(4): 283-288.
- Barros LC, Ferreira Jr RS, Barraviera SRCS, Stolf HO, Thomazini-Santos IA, Mendes-Giannini MJS, Toscano E, Barraviera B. A New Fibrin Sealant

- from *Crotalus durissus terrificus* Venom: Applications in Medicine. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B: Critical Reviews*. 2009; 12(8):553-571.
- Barros LC, Soares AM, Costa FL, Rodrigues VM, Fuly AL, Giglio JR, Gallacci M, Thomazini-Santos IA, Barraviera SRCS, Barraviera B Jr, Ferreira RS. Biochemical and biological evaluation of gyroxin isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom. *J Venom Anim Toxins*. 2011; 17:23.
- Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: Clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004; 36:568-8417.
- Benevides GP, Pimentel ER, Toyama MH, Novello JC, Marangoni S, Gomes L. Biochemical and biomechanical analysis of tendons of caged and penned chickens. *Connect. Tissue Res*. 2004; 45:206-215.
- Benjamin M, Kaiser E, Milz S, Structure–function relationships in tendons: a review. *J. Anat*. 2008; 212:211-228.
- Benjamin M, Tyers RNS, Ralphs JR. Age-related changes in tendon fibro-cartilage. *J Anat* 1991; 179:127-36.
- Bensaïd W, Triffitt JT, Blanchat C, Oudina K, Sedel L, Petite H: A biodegradable fibrin scaffold for mesenchymal stem cell transplantation. *Biomaterials*. 2003; 24:2497.
- Bernardo M, Fridman R. TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase-2) regulates MMP-2 (matrix metalloproteinase-2) activity in the extracellular environment after pro-MMP-2 activation by MT1 (membrane type 1)-MMP M. *Biochem J*. 2003; 74:739-745.
- Bramono DS, Richmond JC, Wietzel PP, et al. Matrix metalloproteinases and their clinical applications in orthopaedics. *Clin Orthop* 2004; 428:272-85.
- Branski LK, Mittermayr R, Herndon DN, Jeschke MG, Hofmann M, Masters OE, Norbury WB, Traber DL, Tangl S, Redl H. Fibrin sealant improves graft adherence in a porcine full-thickness burn wound model. *Burns: J Intern Soc for Burn Inj*. 2011; 37(8):1360-6.
- Bunnell BA, Flaat M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods*. 2008; 45:115-20.
- Canty EG, Kadler KE. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *J Cell Sci*. 2005; 1(118):1341-53.
- Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem*. 2006; 98(5):1076-1084.
- Caplan AI. The mesengenic process. *Clin Plast Surg*. 1994; 21(3):429-435.

- Carvalho HF, Recco-Pimentel SM. *A Célula*, 3a Ed. Editora Manole, 2013.
- Chan BP, Fu S, Qin L, Lee K, Rolf CG, Chan K. Effects of basic fibroblast growth factor (bFGF) on early stages of tendon healing: a rat patellar tendon model. *Acta Orthop Scand*. 2000; 71(5):513-8.
- Cherubino M, Rubin JP, Miljkovic N, Kelmendi-Doko A, Marra KG. Adipose-derived stem cells for wound healing applications. *Ann Plast Surg*. 2011; 66:210-215.
- Chuen FS, Chuk CY, Ping WY, Nar WW, Kim HL, Ming CK. Immunohistochemical characterization of cells in adult human patellar tendons. *J Histochem Cytochem*. 2004; 52:1151-1157.
- Costa TM, Neto JSH. Estudo comparativo dos métodos conservador e cirúrgico para tratamento das lesões agudas do tendão do calcâneo. *Acta Ortop Bras*. 2007; 15:50-54.
- Dahlgren LA. Review of treatment option for equine tendon and ligament injuries: What's new and how do they work? In: *American Association of Equine Practitioners*. Lexington. 2005; 2668.
- Derwin KA, Soslowsky LJ, Kimura JH, Plaas AH. Proteoglycans and glycosaminoglycan fine structures in the mouse tail tendon fascicle. *J Orthop Res*. 2001; 19:269-277.
- Docheva D, Müller SA, Majewski M, Evans HC. Biologics for tendon repair. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2015; 84:222-239.
- Enwemeka CS, Reddy K. The biological effects of laser therapy and other modalities on connective tissue repair process. *Laser Therapy*. 2000; 12:22-30.
- Enwemeka CS. Inflammation, cellularity and fibrillogenesis in regeneration tendon: Implications for tendon rehabilitation. *Physical Therapy*. 1989; 69:816-825.
- Evans CH. Cytokines and the role they play in the healing of ligaments and tendons. *Sports Med*. 1999; 28:71-76.
- Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981; 292:154-6.
- Evans ND, Gentleman E, Polak JM. Scaffolds for stem cells. *Materials today*. 2006; 9:12, 26-33.
- Eyre DR, Paz MA, Gallop PM. Crosslinks in collagen and elastin. *Annu Rev Biochem* 1984; 53:717-48.
- Ferraro GC, Moraes JRE, Pereira GT, Moraes FR, Camargo MHB. Clinical and morphological evaluation of snake venom derived of fibrin glue tendon healing in dogs. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2005; 11:433-446.

- Ferraro GC, Moraes JRE, Shimano AC, Pereira GT, Moraes FR, Camargo MHB. Effect of snake venom derived fibrin glue on the tendon healing in dogs. Clinical and biomechanical study. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2005; 11:261-274.
- Ferreira Junior RS. Autologous or heterologous fibrin sealant scaffold: which is the better choice? *J Venom Anim Toxins*. 2014; 20:31.
- Franchi M, Triré A, Quaranta M, Orsini E, Ottani V. Collagen structure of tendon relates to function. *The Scientific World Journal*. 2007; 7:404-420.
- Fukashiro S, Komi PV, Jarvinen M, Miyashita M. In vivo Achilles tendon loading during jumping in humans. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1995; 71:453-458.
- Gajhede-Knudsen M, Ekstrand J, Magnusson H, Maffulli N. Recurrence of Achilles tendon injuries in elite male football players is more common after early return to play: an 11-year follow-up of the UEFA Champions League injury study *Br J Sports Med*. 2013; 47:763-768.
- Gao G, Yonezawa T, Hubbell K, Dai G, Cui X. Inkjet-bioprinted acrylated peptides and PEG hydrogel with human mesenchymal stem cells promote robust bone and cartilage formation with minimal printhead clogging. *Biotechnol J*. 2015; 10(10):1568-77.
- Gasparotto VPO, Landim-Alvarenga FC, Oliveira ALR, Simões GF, Lima-Neto JF, Barraviera B, Ferreira RSJ. A new fibrin sealant as a three-dimensional scaffold candidate for mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*. 2014; 5:(78)1-10.
- Gathercole LJ e Keller A. Crimp morphology in the fibre-forming collagens. *Matrix*. 1991; 11:214-234.
- Gentleman E, Nauman EA, Livesay GA, Dee KC. Collagen Composite Biomaterials Resist Contraction While Allowing Development of Adipocytic Soft Tissue *In Vitro*. *Tissue Engineering*. 2006; 12(6): 1639-1649.
- Godoy JAP, Block DB, Tollefsen DM, Werneck CC, Vicente CP. Dermatan sulfate and bone marrow mononuclear cells used as a new therapeutic strategy after arterial injury in mice. *Cytotherapy*. 2011; 13(6):695-704.
- Goffi FS. Técnica cirúrgica – Bases anatômicas, fisiopatologias e técnicas da cirurgia. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1996; 126-252.
- Guerra FDR, Vieira CP, Almeida MS, Oliveira LP, Aro AA, Pimentel ED. LLLT improves tendon healing through increase of MMP activity and collagen synthesis. *Lasers Med Sci*. 2013; 28:1281-1288.
- Guerra FR, Vieira CP, Aro AA, Pimentel ER. The low level laser therapy application improves the healing process of the Achilles tendon of rats. *Journal of Bodywork and Movement Therapies*. 2012; 16:525-526.

- Gulotta LV, Rodeo SA. Growth factors for rotator cuff repair. *Clin Sports Med.* 2009; 28(1):13-23.
- Haimi S, Suuriniemi N, Haaparanta AM, Ellä V, Lindroos B, Huhtala H, Rätty S, Kuokkanen H, Sándor GK, Kellomäki M, Miettinen S, Suuronen R. Growth and osteogenic differentiation of adipose stem cells on PLA/bioactive glass and PLA/beta-TCP scaffolds. *Tissue Eng Part A.* 2009; 15(7):1473-80.
- Hay ED. *Cell biology of extracellular matrix.* New York: Plenum. 2ed, 1991.
- Henninger HB, Underwood CJ, Romney SJ, Davis GL, Weiss JA. Effect of elastin digestion on the quasi-static tensile response of medial collateral ligament. *J Orthop Res.* 2013; 31:1226-1233.
- Hooley CJ, Cohen RE. A model for the creep behaviour of tendon. *Int J Biol Macromol.* 1979; 1:123-32.
- James R, Kesturu G, Balian G, Chhabra AB. Tendon: biology, biomechanics, repair, growth factors, and evolving treatment options. *J Hand Surg Am.* 2008; 33(1):102-12.
- Järvinen TA, Kannus P, Maffulli N, Khan KM. Achilles tendo disorders: etiology and epidemiology. *Foot Ankle Clin.* 2005; 10:255-266.
- Jorge MP, Madjarof C, Ruiz ALTG, Fernandes AT, Rodrigues RAF, Sousa IMO, et al. Evaluation of wound healing properties of *Arrabidaea chica* Verlot extract. *Journal of Ethnopharmacology* 2008;188:361-6.
- Jozsa L, Kannus P, Balint JB, Reffy A. Three-dimensional ultrastructure of human tendons. *Acta Anat (Basel).* 1991; 142:306-12.
- Józsa LG, Kannus P. Human tendons: anatomy, physiology and pathology. *Structure and Metabolism of Normal Tendons.* Human Kinetics, Champaign; 1997; 46-95.
- Ju YJ, Muneta T, Yoshimura H, Koga H, Sekiya I. Synovial mesenchymal stem cells accelerate early remodeling of tendon-bone healing. *Cell Tissue Res.* 2008; 332(3):469-78.
- Kader D, Saxena A, Movin T, Maffulli N. Achilles tendinopathy: some aspects of basic science and clinical management. *Br J Sports Med.* 2002; 36:239-249.
- Kannus P, Jozsa L, Natri A, Jarvinen M. Effects of training, immobilization and remobilization on tendons. *Scand J Med Sci Sports.* 1997; 7:67-71.
- Kannus P. Structure of the tendon connective tissue. *Scand. J. Med. Sports.* 2000; 10:312-320.
- Keating A. Mesenchymal stromal cells: new directions. *Cell Stem Cell.* 2012; 10:709-716.

- Kim JH, Jung M, Kim HS, Kim YM, Choi EH. Adipose-derived stem cells as a new therapeutic modality for ageing skin. John Wiley & Sons A/S, *Experimental Dermatology*. 2011; 20:383-387.
- Kjaer M. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiol Rev*. 2004; 84(2):649-98.
- Klein MB, Yalamanchi N, Pham H, Longaker MT, Chang J. Flexor tendon healing in vitro: effects of TGF-beta on tendon cell collagen production. *J Hand Surg*. 2002; 27A:615-620.
- Kolehmainen K, Willerth SM. Preparation of 3D Fibrin Scaffolds for Stem Cell Culture Applications. *J Vis Exp*. 2012; 61:3641.
- Kraus TM, Imhoff FB, Wexel G, Wolf A, Hirsch D, Lenz L, Stöckle U, Buchmann S, Tischer T, Imhoff AB, Milz S, Anton M, Vogt S. Stem Cells and Basic Fibroblast Growth Factor Failed to Improve Tendon Healing. *J Bone Joint Surg Am*. 2014; 96:761-9.
- Kyurkchiev D, Bochev I, Ivanova-Todorova E, Mourdjeva M, Oreshkova T, Belemezova K, Kyurkchiev S. Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells* 2014; 6(5): 552-570.
- Lacitignola L, Crovace A, Rossi G, Francioso E. Cell therapy for tendinitis, experimental and clinical report. *Vet Res Commun*. 2008; 32:33-38.
- Lagergren C, Lindholm A. Vascular distribution in the Achilles tendon; an angiographic and microangiographic study. *Acta Chir Scand*. 1959; 116(5-6):491-5.
- Leadbetter WB. Cell-matrix response in tendon injury. *Clin Sports Med*. 1992; 11: 533-578.
- Lee RH, Oh JY, Choi H, Bazhanov N. Therapeutic Factors Secreted by Mesenchymal Stromal Cells and Tissue Repair. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2011; 112:3073-3078.
- Lerner R, e Binur, NS. Current status of surgical adhesives. *J Surg Res*. 1990; 48:165-181.
- Lin TW, Cardenas L, Soslowsky LJ. Biomechanics of tendon injury and repair. *Journal of Biomechanics*. 2004; 37: 865-877.
- Loitz BJ, Zernicke RF, Vailas AC, Kody MH, Meals RA. Effects of short-term immobilization versus continuous passive motion on the biomechanical and biochemical properties of the rabbit tendon. *Clin Orthop* 1989; 244:265-71.
- Longo UG, Ronga M, Maffulli N. Achilles tendinopathy. *Sports Med Arthrosc*. 2009; 17:112-126.

- Lui PPY. Identity of tendon stem cells – how much do we know? *J Cell Mol Med.* 2013; 17(1):55-64.
- Machado MVM, Vulcano LC, Hussni CA, Alves LG. Efeito da laserterapia em tendinite experimental no tendão flexor digital superficial em eqüinos: estudo histológico e ultrasonográfico. *Archives of Veterinary Science.* 2000; 5:111-115.
- MacLean S, Khan WS, Malik AA, Snow M, Anand S. Tendon Regeneration and Repair with StemCells. Hindawi Publishing Corporation *Stem Cells International.* 2012; 1-6.
- Maffulli N, Ewen SWB, Waterston SW, Reaper J, Barrass V. Tenocytes from ruptured and tendinopathic Achilles tendons produce greater quantities of type III collagen than tenocytes from normal Achilles tendons an in vitro model of human tendon healing. *Am J Sports Med.* 2000; 28(4):499-505.
- Maffulli, N. Rupture of the Achilles tendon. *J Bone Joint Surg Am.* 1999; 81:1019-1036.
- Magra M, Maffulli N. Matrix metalloproteases: a role in overuse tendinopathies. *Br J Sports Med* 2005; 39(11):789-91.
- Matsumoto F, Trudel G, Uthoff HK, Backman DS. Mechanical effects of immobilization on the Achilles' tendon. *Arch Phys Med Rehabil* 2003; 84:662-7.
- Maurus M, Guérit D, Toupet K, Jorgensen C, Noël D. Mesenchymal stem cell-based therapies in regenerative medicine: applications in rheumatology. *Stem Cell Res Ther.* 2011; 2:1-14.
- Mello MLS, Vidal BC. Experimental tendon repair: glycosaminoglycan arrangement in newly synthesized collagen fibers. *Cell Mol Biol* 2003; 49(4):579-85.
- Mizuno H, Hyakusoku H. Mesengenic potential and future clinical perspective of human processed lipoaspirate cells. *J Nippon Med Sch.* 2005; 70(4):300-6.
- Mizuno H, Zuk PA, Zhu M et al. Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells. *Plast Reconstr Surg.* 2002; 109:199-209.
- Moshaverinia A, Chen C, Akiyama K, Ansari S, Xu X, Chee WW, Schricker SR, Shi S. Alginate hydrogel as a promising scaffold for dental-derived stem cells: an in vitro study. *J Mater Sci Mater Med.* 2012; 23(12):3041-51.
- Murphy PG, Loitz BJ, Frank CB, Hart DA. Influence of exogenous growth factors on the synthesis and secretion of collagen types I and III by explants of normal and healing rabbit ligaments. *Biochem Cell Biol* 1994; 72:403-9.
- Myers B, Wolf M. Vascularization of the healing wound. *Am Surg.* 1974; 40:716-722.

- Naderi N, Combellack EJ, Griffin M, Sedaghati T, Javed M, Findlay MW, Wallace CG, Mosahebi A, Butler PEM, Seifalian AM, Whitaker IS. The regenerative role of adipose-derived stem cells (ADSC) in plastic and reconstructive surgery. *Int Wound J*. 2016; 1-16.
- Nixon AJ, Dahlgren LA, Haupt JL, Yeager AE, Ward DL. Effect of adipose-derived nucleated cell fractions on tendon repair in horses with collagenase-induced tendinitis. *Am J Vet Res*. 2008; 69(7):928-37.
- Oakes BW. Tissue healing and repair: tendons and ligaments. In: Frontera WR, editor. *Rehabilitation of sports injuries: scientific basis*. Boston: Blackwell Science. 2003; 56-98.
- Oshima Y, Shukunami C, Honda J, Nishida K, Tashiro F, Miyazaki J, Hiraki Y, Tano Y. Expression and Localization of Tenomodulin, a Transmembrane Type Chondromodulin-I-Related Angiogenesis Inhibitor, in Mouse Eyes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2003; 44(5):1814-1823.
- Oshiro W, Lou J, Xing X, Tu Y, Manske PR. Flexor tendon healing in the rat: A histologic and gene expression study. *J Hand Surg*. 2003; 28A:814-823.
- Pajala A, Melkko J, Leppilähti J, Ohtonen P, Soini Y, Risteli J. Tenascin-C and type I and III collagen expression in total Achilles tendon rupture. An immunohistochemical study. *Histol Histopathol* 2009; 24:1207-11.
- Pansini JV, Carvalho DA, Souza RF. Lesão aguda do tendão do calcâneo – Relação com a degeneração tendínea prévia e padrão epidemiológico. *Rev ABTP*. 2007; 1:33-8.
- Park A, Hogan MV, Kesturu GS, James R, Balian G, Chhabra AB. Adipose-derived mesenchymal stem cells treated with growth differentiation factor-5 express tendonspecific markers. *Tissue Eng: Part A*. 2010; 16:2941-51.
- Peres VS. Efeito do selante de fibrina derivado de peçonha de serpente associado a células-tronco mesenquimais na cicatrização de ferida cirúrgica em ratos. Botucatu, 2014.
- Peroni JF, Borjesson DL. Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Activities of Stem Cells. *Vet Clin Equine*. 2011; 27:351-362.
- Piez KA e Reddi AH. *Extracellular matrix biochemistry*. New York: Elsevier, 1984.
- Pontes KP, Duprat AC, Lancellotti CLP, Silva L Souza FC. Influence of selant fibrin on the wound healing of the pigs vocal folds. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2012; 78(1):51-6.
- Prestes RC. Colágeno e Seus Derivados: Características e Aplicações em Produtos Carneos. *UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde*. 2013; 15(1):65-74.
- Raabe O, Shell K, Fietz D, Freitag C, Ohrndorf A, Christ HJ, et al. Tenogenic differentiation of equine adipose tissue-derived stem cells under the

influence of tensile strain, growth differentiation factors and various oxygen tensions. *Cell Tissue Res.* 2013; 352:509-21.

Radosevich M, Goubran HA, Burnouf T. Fibrin Sealant: Scientific Rationale, Production Methods, Properties and Current Clinical Use. *Vox Sang.* 1997; 72:133-43.

Raiser AG, Pippi NL, Graça DL, Silveira DS, Bordini I, Baiotto GC. O fio de poliamida como substituto de perda segmentar do tendão calcâneo comum em cães. *Rev Bras Med Vet.* 2003; 1:23-29.

Ramshaw JAM, Shah NK, Brodsky B. Gly-X-Y tripeptide frequencies in collagen: a context for hostguest triple-helical peptides. *J. Struct Biol.* 1998; 122:86-91.

Reddy GK, Enwemeka CS. A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues. *Clin Biochem.* 1996; 29(3):225-229.

Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, Pell CL, Johnstone BH, Consideine RV, March KL. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation.* 2004; 109:1292-1298.

Reinherz RP, Zawada SJ, Sheldon DP. Recognizing unusual tendon pathology at the ankle. *J Foot Surg.* 1986; 25:278-283.

Reyes M, Verfaillie CM. Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells. *Ann NY Acad Sci.* 2001; 938:231-233.

Richardson SH, Starborg T, Lu Y, Humphries SM, Meadows RS, Kadler KE. "Tendon development requires regulation of cell condensation and cell shape via cadherin-11- mediated cell-cell junctions". *Molecular and Cellular Biology.* 2007; 27(17): 6218-6228.

Rickert M, Jung M, Adiyaman M, Richter W, Simank HG. A growth and differentiation factor-5 (GDF-5) coated suture stimulates tendon healing in an Achilles tendon model in rats. *Growth Factors* 2001; 19:115-126.

Riley G. The pathogenesis of tendinopathy. A molecular perspective, *Rheumatology (Oxford).* 2004; 43:131-142.

Schmitt A, van Griensven M, Imhoff AB, Buchmann S. Application of stem cells in orthopedics. *Stem Cells Int.* 2012; 2012:1-11.

Selvanetti A, Cipolla M, Puddu G. Overuse tendon injuries: basic science and classification. *Oper Tech Sports Med.* 1997; 5:110-117.

Sharma P, Maffulli N. Biology of tendon injury: healing, modeling and remodeling. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2006; 6:181-190.

- Sharma P, Maffulli N. Tendon injury and tendinopathy: healing and repair. *J Bone Joint Surg Am.* 2005; 87:187-202.
- Shukunami C, Takimoto A, Oro M, Hiraki Y. Scleraxis positively regulates the expression of tenomodulin, a differentiation marker of tenocytes. *Dev Biol.* 2006; 298:234-247.
- Silva FS, Marques MS, Silva JB, Abreu BJ, Neto OT, Corrêa MA. Desenvolvimento de sistema para reprodução e análise de curvas força-distensão em tendões calcâneos de ratos. *Rev. Ciênc. Méd. Biol., Salvador.* 2013; 12(1):15-21.
- Smith RKW. Princípios de Tratamento de Lesões Tendíneas e Ligamentares. *Journal of Continuing Education in Animal Science of CRMV-SP.* São Paulo: Conselho Regional de Medicina Veterinária. 2011; 9(3):84-87.
- Stegemann H, Stalder K. Determination of hydroxyproline. *Clin Chim Acta.* 1967; 18(2):267-73.
- Stein V, Laprell H, Tinnemeyer S, Petersen W. Quantitative assessment of intravascular volume of the human Achilles tendon. *Acta Orthop Scand.* 2000; 71(1):60-3.
- Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, Fraser JK, Hedrick MH. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med.* 2005; 54:132-41.
- Taylor SH, Al-Youha S, Van Agtmael T, Lu Y, Wong J, McGrouther DA, Kadler KE. Tendon is covered by a basement membrane epithelium that is required for cell retention and the prevention of adhesion formation. *PLoS One* 2011; 6(1):e16337.
- Thomazini-Santos IA, Barraviera SRCS, Mendes-Giannini MJS, Barraviera B. Surgical adhesives. *J Venom Anim Toxins.* 2001; 7:159.
- Tipton CM, Matthes RD, Maynard JA, Carey RA. The influence of physical activity on ligaments and tendons. *Med Sci Sports.* 1975; 7(3):165-75.
- Tomiosso TC, Nakagaki WR, Gomes L, Hyslop S, Pimentel ER. Organization of collagen bundles during tendon healing in rats treated with L-NAME. *Cell and Tissue Research.* 2009; 337:235-242.
- Trumbull A, Subramanian G, Yildirim-Ayan E. Mechanoresponsive musculoskeletal tissue differentiation of adipose-derived stem cells. *BioMed Eng OnLine.* 2016; 15:43.
- Tuan TL, Song A, Chang S, Younai S, Nimni ME. In vitro fibroplasia: matrix contraction, cell growth, and collagen production of fibroblasts cultured in fibrin gels. *Exp Cell Res.* 1996; 223:127-34.

- Uysal AC, Mizuno H. Differentiation of adipose-derived stem cells for tendon repair. *Methods Mol Biol.* 2011; 702:443-51.
- Uysal AC, Mizuno H. Tendon regeneration and repair with adipose derived stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther* 2010; 5:161-167.
- Uysal CA, Tobita M, Hyakusoku H, Mizuno H. Adipose-derived stem cells enhance primary tendon repair: biomechanical and immunohistochemical evaluation. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2012; 65:1712-9.
- Verfaillie CM, Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends Cell Biol.* 2002; 12:502-8.
- Veronesi F, Torricelli P, Bella ED, Pagani S, Fini M. In vitro mutual interaction between tenocytes and adipose-derived mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy.* 2015; 17: 215-223.
- Vidal BC, Anjos EHM, Mello MLS. Optical anisotropy reveals molecular order in a mouse enthesis. *Cell and Tissue Research.* 2015; 362:177-185.
- Vidal BC, Mello MLS. Optical anisotropy of collagen fibers of rat calcaneal tendons: an approach to spatially resolved supramolecular organization. *Acta Histochem.* 2010; 112:53-61.
- Vidal BC. Cell and extracellular matrix interaction: a feedback theory based on molecular order recognition-adhesion events. *Ver Fac Ciên Med Unicamp.* 1994; 4:11-14.
- Vidal BC. Crimp as part of helice structure. *C R Acad Sci Paris, Sci la Vie/Life Sci.* 1995; 318: 173-178.
- Vidal BC. Fluorescence, aggregation properties and FT-IR microspectroscopy of elastin and collagen fibers. *Acta Histochemica.* 2014; 116:1359-1366.
- Vidal BC. Image analysis of tendon helical superstructure using interference and polarized light microscopy. *Micron.* 2003; 34:423-32.
- Vidal BC; Mello MLS. FT-IR Microspectroscopy of Rat Ear Cartilage. *Plos One.* 2016; 11(3):1-13.
- Vieira CP, Oliveira LP, Guerra FR, Almeida MS, Marcondes MCC, Pimentel ER. Glycine Improves Biochemical and Biomechanical Properties Following Inflammation of the Achilles Tendon. *The Anatomical Record: advances in integrative anatomy and evolutionary biology.* 2014; 1.
- Vogel KG, Heinegård D. Characterization of proteoglycans from adult bovine tendon. *J Biol Chem* 1985; 260:298-306.
- Voleti PB, Buckley MR, Soslowsky LJ. Tendon healing: repair and regeneration. *Annu Rev Biomed Eng.* 2012; 14:47-71.

- Waggett KG, Ralphs JR, Kwan APL, Woodnutt D, Benjamim M. Characterization of collagens and proteoglycans at the insertion of the human Achilles tendon. *Matrix Biol.* 1998; 16:457-470.
- Wang JH. Mechanobiology of tendon, *J. Biomech.* 2006; 39:1563-1582.
- Wang M, Crisostomo PR, Herring C, Meldrum KK, Meldrum DR. Human progenitor cells from bone marrow or adipose tissue produce VEGF, HGF and IGF-1 in response to TNF by a p38 mitogen activated protein kinase dependent mechanism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2006; 291:880-884.
- Wang T, Guo S, Liu X, Xu N, Zhang S. Protective effects of adipose-derived stem cells secretome on human dermal fibroblasts from ageing damages. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015; 8(12):15739-15748.
- Wang Y, Chen X, Cao W, Shi Y. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. *Nature Immunology.* 2014; 15(11):1009-1016.
- Wang Z, Zhang Z, Zhang JC, She ZJ, Ding JD. Distribution of bone marrow stem cells in large porous polyester scaffolds. *Chinese Sci Bull.* 2009; 54:2968-2975.
- Watanabe T, Hosaka Y, Yamamoto E, Ueda H, Sugawara K, Takahashi H, Takehana K. Control of the collagen fibril diameter in the equine superficial digital flexor tendon in horses by decorin. *J Vet Med Sci.* 2005; 67(9):855-860.
- Weeks KD, Dines JS, Rodeo AS, Bedi A. The basic science behind biologic augmentation of tendon-bone healing: a scientific review. *Instr Course Lect.* 2014; 63:443-450.
- Wertz J, Galli M, Borchers JR. Achilles Tendon Rupture: Risk Assessment for Aerial and Ground Athletes. *Sports health.* 2013; 5:407-409.
- Wolbank S, Pichler V, Ferguson JC, Meinel A, Griensven MV, Goppelt A, Redl H. Non-invasive in vivo tracking of fibrin degradation by fluorescence imaging. *J Tissue Eng Regen Med.* 2015; 9:973-976.
- Yang XF, He X, He J, Zhang LH, Su XJ, Dong ZY, Xu YJ, Li Y, Li YL. High efficient isolation and systematic identification of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Biomedical Science.* 2011; 18:59.
- Yinger K, Mandelbaum BR, Almekinders LC. Achilles rupture in the athlete current science and treatment. *Clin Podiatr Med Surg.* 2002; 19:231-250.
- Young RG, Butler DL, Weber W, Caplan AI, Gordon SL, Fink DJ. Use of Mesenchymal Stem Cells in a Collagen Matrix for Achilles Tendon Repair. *The Journal of Bone and Joint Surgery.* 1998; 36:406-413.
- Youngstrom DW, Barrett JG. Engineering Tendon: Scaffolds, Bioreactors, and Models of Regeneration. *Stem Cells International.* 2016; 1-11.

- Yücel E, Oral O, Olgaç V, Oral C K. Effects of fibrin glue on wound healing in oral cavity. *J of Dentistry*. 2003; 31(8): 569-75.
- Zeng G, Lai K, Li J, Zou Y, Huang H, Liang J, Tang X, Wei J, Zhang P. A rapid and efficient method for primary culture of human adipose-derived stem cells. *Landes Bioscience, Organogenesis*. 2013; 9(2):87-295.
- Zuk PA, M Zhu, P Ashjian, DA De Ugarte, JI Huang, H Mizuno, ZC Alfonso, JK Fraser, P Benhaim, MH Hedrick. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002; 13:4279-4295.



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Reparo de tendão de rato após aplicação de células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo, associadas à fibrina" (protocolo nº 3695-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel / Katleen Arthur, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 12 de janeiro de 2015.

Campinas, 12 de janeiro de 2015.



Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva

Profa. Dra. Rachel Meneguello
Presidente
Comissão Central de Pós-Graduação
Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **EFEITO COMBINADO DA APLICAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO E SELANTE DE FIBRINA, NO PROCESSO DE REPARO DE TENDÃO CALCÂNEO DE RATOS**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora

Campinas, 01/07/2016

Assinatura _____

Nome do(a) autor(a): **Katleen Arthur**

RG n.º 12571103-0

Assinatura _____

Nome do(a) orientador(a): **Euson Rosa Pimentel**

RG n.º 5017230



COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
Universidade Estadual de Campinas
Caixa Postal 6109, 13083-970, Campinas, SP, Brasil
Fone (19) 3521-6378. email: cpgib@unicamp.br

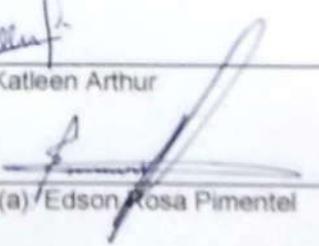


DECLARAÇÃO

Em observância ao §5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Dissertação de Mestrado, intitulada ***"Efeito Combinado da Aplicação de Células-Tronco Mesenquimais Derivadas de Tecido Adiposo e Selante de Fibrina, no Processo de Reparo de Tendão Calcâneo de Ratos"***, desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura: 

Nome do(a) aluno(a): Katleen Arthur

Assinatura: 

Nome do(a) orientador(a): Edson Rosa Pimentel

Data: 01/07/2016