



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

FERNANDA ORIANI BORTOLAZZO

**“EFEITO COMBINADO DA APLICAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO E
MICROCORRENTE NA CICATRIZAÇÃO DO TENDÃO CALCANEAR DE RATOS
APÓS TRANSECÇÃO PARCIAL”**

CAMPINAS
2018

FERNANDA ORIANI BORTOLAZZO

**“EFEITO COMBINADO DA APLICAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO E
MICROCORRENTE NA CICATRIZAÇÃO DO TENDÃO CALCANEAR DE RATOS
APÓS TRANSECÇÃO PARCIAL”**

*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 FERNANDA ORIANI BORTOLAZZO
E ORIENTADA PELO PROF. DR. EDSON ROSA
PIMENTEL.

Orientador: Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel

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

CAMPINAS
2018

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

B648e Bortolazzo, Oriani Fernanda, 1991-
Efeito combinado da aplicação de células tronco e microcorrente na cicatrização do tendão calcâneo de ratos após transecção parcial / Fernanda Oriani Bortolazzo. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Edson Rosa Pimentel.

Coorientador: Andrea Aparecida de Aro.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Regeneração (Biologia). 2. Birrefringência. 3. Colágeno. 4. Citocinas. 5. Matriz extracelular. I. Pimentel, Rosa Edson, 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: Combined effect of the application of stem cell and microcurrent on calcaneus tendon repair after partial transection

Palavras-chave em inglês:

Regeneration (Biology)

Birefringence

Collagen

Cytokines

Extracellular matrix

Área de concentração: Biologia Celular

Titulação: Mestra em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Edson Rosa Pimentel [Orientador]

Flávia Da Ré Guerra

Fernanda Aparecida Sampaio Mendonça

Data de defesa: 27-04-2018

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 27 de abril de 2018.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel (Orientador)

Profa. Dra. Flávia Da Ré Guerra

Prof. Dra. Fernanda Aparecida Sampaio Mendonça

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

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Valéria e Fernando Bortolazzo, pelo amor e dedicação constantes, e por acreditarem e me apoiarem em todos os momentos, meus maiores incentivadores e batalhadores pela realização de meus sonhos.

Ao meu tio, Claudemir Luís Bortolazzo, por toda ajuda e incentivo.

Ao Vitor Pereira Gomes, pelo carinho, amor e paciência em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ser presença constante em minha vida, iluminar meu caminho e sempre me proporcionar forças para continuar.

Ao meu orientador Prof. Edson Rosa Pimentel, uma pessoa ímpar, dotado de grande sabedoria, a quem tenho profundo respeito e admiração. Agradeço por todos os ensinamentos e por ter confiado em mim. Você tem um lugar muito importante e especial em minha vida profissional.

À minha co-orientadora Profa. Andrea De Aro, por me ajudar a adquirir persistência, e compartilhar de toda sua sabedoria, a fim de que eu pudesse agregar ainda de forma ínfima uma fração de todo o seu conhecimento.

À minha amiga, Letícia Drudi Lucke, que juntas compartilhamos desde os momentos mais felizes até os mais árduos proporcionados pela vida acadêmica.

Ao meu amigo, Lucas Fuji, que sempre esteve presente; “A você meu muito obrigada, por toda sua ajuda e dedicação no projeto experimental. Sua alegria tornou os fastidiosos finais de semana mais divertidos. ”

Agradeço à Universidade Estadual de Campinas, ao programa de pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural por toda a prestatividade e disponibilidade dadas ao longo do mestrado.

Ao Centro Universitário Hermínio Ometto – UNIARARAS e a todos os professores que durante a minha trajetória acadêmica contribuíram para que hoje chegasse até aqui, agradeço ainda, por toda a receptividade e colaboração durante o mestrado.

Por fim, agradeço à agência de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) envolvida no financiamento deste trabalho.

RESUMO

O tendão calcâneo é o maior e mais resistente dentre os tendões do corpo humano. Entretanto, devido à sobrecarga, é um dos mais acometidos por lesão entre atletas, e é relativamente comum na população adulta de modo geral. A cicatrização envolve eventos que são controlados por mediadores bioquímicos que regulam o reparo. A utilização das células tronco derivadas de tecido adiposo (CTMA) apresenta diversas vantagens devido à sua capacidade de diferenciação, coleta pouco invasiva e alto rendimento celular. Efeitos promissores no reparo tendíneo tem sido também demonstrando pela utilização da microcorrente (MC), pois mimetiza e amplia os sinais bioelétricos do corpo, aumentando sua habilidade em transportar nutrientes e resíduos metabólicos das células na área afetada. A associação das CTMA com MC pode representar uma alternativa para tratamento de lesões tendíneas com possíveis efeitos terapêuticos satisfatórios. **Objetivo:** Investigar o efeito combinado da aplicação das CTMA e MC no 14º dia do processo de cicatrização do tendão calcâneo de ratos. **Materiais e Métodos:** 75 ratos Wistars machos foram distribuídos em 5 grupos: normal (N); transeccionado (T); transeccionado tratado com CTMA (CT); transeccionado tratado com microcorrente (MC) e transeccionado tratado com CTMA e microcorrente (CT+MC). Análises: citometria de fluxo, fluorescência, dosagem de hidroxiprolina, Elisa, Western blotting, zimografia, medidas de birrefringência e coloração com HE e AT. **Resultados:** A citometria demonstrou alta expressão dos marcadores CD90 e CD105 e baixa do CD34 nas CTMA. Maior concentração de hidroxiprolina foi encontrada em tendões do grupo T em relação aos grupos CT, MC e CT+MC. Os resultados da quantificação de PCNA, assim como do TNF- α mostraram aumento expressivo em seus níveis nos grupos CT e CT+MC. No resultado de caspase III não houve diferença entre os grupos. A quantificação da citocina IL-10 apresentou níveis aumentados nos grupos MC e CT+MC em relação ao grupo N, assim como aumento no grupo MC em relação ao T. O colágeno I mostrou-se aumentado nos grupos MC e CT+MC, enquanto que o aumento do colágeno III na região tendínea foi mais intenso no grupo CT quando comparados ao grupo N. A isoforma ativa da MMP-2 aumentou em todos os grupos com tendões transeccionados. A microscopia de polarização mostrou maior organização das fibras de colágeno no grupo MC, devido ao maior valor de birrefringência observado nesse grupo. Na microscopia de fluorescência, observou-se no 14º dia a presença das CTMA-GFP injetadas logo após a lesão nos grupos CT e CT+MC. Nos cortes de tendões transeccionados corados com HE e AT, foram observados maior celularidade e matriz mais fortemente, respectivamente, em relação ao grupo N. **Conclusão:** o presente estudo indica um efeito benéfico da microcorrente na região transeccionada do tendão para a reorganização do tecido, evidenciada pelo aumento dos níveis de colágeno I e organização das fibras colágenas.

Palavras-chave: reparo, morfologia, colágeno, citocinas, PCNA, matriz extracelular, birrefringência.

ABSTRACT

The calcaneus tendon is the largest and most resistant tendon of the human body. However, due to overload, it is one of the most affected by injury among athletes, and also relatively common in the adult population in general. Healing involves events that are controlled by biochemical mediators that regulate repair. The use of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (ADMSC) has several advantages due to its capacity of differentiation, little invasive collection and high cellular yield. Promising effects on tendon repair have also been demonstrated by the use of microcurrent (MC) as it mimics and amplifies the bioelectrical signals of the body, increasing its ability to carry nutrients and metabolic waste from the cells in the affected area. The association of ADMSC with MC may represent an alternative for treatment of tendinous lesions with possible satisfactory therapeutic effects. **Objective:** To investigate the combined effect of ADMSC and MC on the calcaneus tendon healing process in rats. **Materials and Methods:** 75 male Wistars rats were distributed in 5 groups: normal (N); transected tendon (T); transected tendon treated with ADMSC (SC); transected tendon treated with microcurrent (MC) and transected tendon treated with ADMSC and microcurrent (SCMC). Samples of each group were analyzed using flow cytometry, hydroxyproline dosage, Elisa, Western blotting and zymography. For morphology birefringence measurements and sections stained with HE and TB, were analyzed. **Results:** Cytometry demonstrated high expression of the CD90 and CD105 markers and low CD34 markers. Higher concentration of hydroxyproline was found in tendons of the T group in relation to the SC, MC and SCMC groups. The results of the quantification of PCNA as well as of TNF- α showed an expressive increase in their levels in the SC and SCMC groups. The quantification of IL-10 cytokine showed increased levels in the MC and CT + MC groups in relation to the N group, as well as in the MC group in relation to the T. Collagen I was shown to be increased in the groups submitted to MC and ADMSC+ MC, whereas the increase in collagen III in the transection region of the tendon was more intense in the SC group when compared to the Normal tendon. The active isoform of MMP-2 was increased in all groups with transected tendons. Analysis under Polarization microscopy showed greater organization of the collagen fibers in the MC group, due to the higher birefringence value observed in that group. In the fluorescence microscopy, the presence of the ADMSC-GFP injected shortly after the injury in the CT and CT + MC groups was observed on the 14th day. In the sections of transected tendons stained with HE and TB, greater cellularity and more strongly stained extracellular matrix were observed in all transected tendons, in relation to the N group. **Conclusion:** the present study indicates a beneficial effect of the microcurrent in the transected region of the tendon for the reorganization of the tissue, evidenced by the increase of collagen I levels and the organization of the collagen fibers.

Keywords: repair, morphology, collagen, cytokines, PCNA, extracellular matrix, birefringence.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AH - Ácido Hialurônico;
AT - Azul de Toluidina;
CASPASES - *Cysteine Aspartic Protease*;
CTA - Células Tronco Adultas;
CTMA - Células Tronco Mesenquimais derivadas de Tecido Adiposo;
CTMA-GFP - Células Tronco provenientes de ratos GFP (Green Fluorescent Protein)
CTM - Células-Tronco Mesenquimais;
CTMO - Células tronco mesenquimais derivadas da Medula Óssea;
ELISA - Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay;
GAGs - Glicosaminoglicanos;
GFP - *Green Fluorescent Protein*;
GM-CFS - Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos;
HE - Hematoxilina-Eosina;
IL-1 - Interleucina 1;
IL-10 - Interleucina 10;
IL-6 - Interleucina 6;
IL-8 - Interleucina 8;
MEC - Matriz Extracelular;
MMP- 2 - Metaloproteinase 2;
MMP- 9 - Metaloproteinase 9;
MMPs - Metaloproteinases;
PCNA - Antígeno Nuclear de Proliferação Celular
PDGF - Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas;
PGs - Proteoglicanos;
RT - Região de Transecção;
T1 - Região adjacente a transecção;
TFDS - Tendão Flexor Digital Superficial;
TGF- β - Fator de Crescimento Transformante β ;
TIMPs - Inibidores Teciduais de Metaloproteinases;
TNF- α - Fator de Necrose Tumoral Alfa;
VEGF - Fator de Crescimento Endotelial Vascular;
WB - Western blotting;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Organização hierárquica da estrutura do tendão.....	16
Figura 2: Citometria de fluxo para os marcadores CD105, CD90 e CD34.....	40
Figura 3: Imagens de microscopia de fluorescência.....	41
Figura 4: Bandas representativas e gráficos das análises de WB.....	42
Figura 5: Dosagem de Hidroxiprolina.....	43
Figura 6: Zimografia para MMP-2 e MMP-9 e densitometria.....	43
Figura 7: Elisa para quantificação de IL-10 e TNF- α	44
Figura 8: Coloração com HE.....	44
Figura 9: Coloração com AT.....	45
Figura 10: Imagens e medidas de birrefringência.....	46

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Características Estruturais e Bioquímicas do Tendão Calcâneo	13
1.2 Arquitetura Interna do Tendão	16
1.3 Lesão do Tendão Calcâneo	17
1.4 Mecanismos Envolvidos na Cicatrização Tendínea	18
1.5 Mediadores Químicos e seus Efeitos no Processo de Reparo	21
1.6 Tratamentos	23
1.6.1 Células Tronco Mesenquimais Derivadas de Tecido Adiposo (CTMA)	24
1.6.2 Estimulação Elétrica de Baixa Intensidade	26
2. OBJETIVOS.....	28
2.1 Objetivo Geral	28
2.2 Objetivo Específico	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1 Grupos Experimentais	29
3.2 Obtenção e Cultura das Células Tronco	30
3.3 Protocolo para a Transecção Parcial do Tendão Calcâneo e Aplicação Tópica de CTMA	30
3.4 Protocolo de Microcorrente	31
3.5 Citometria de Fluxo	31
3.6 Dosagem de Hidroxiprolina	31
3.7 Preparo de Cortes em Congelação	32
3.8 Histologia	33
3.8.1 Coloração HE e AT	33
3.8.2 Birrefringência	33
3.9 Extração e Dosagem de Proteínas Totais.	33
3.10 Western Blotting (WB).....	34
3.11 Enzyme Linked Immunonosorbent Assay (ELISA)	34
3.12 Fluorescência	35
3.13 Zimografia para Metaloproteinase-2 e -9	35
3.14 Análises Estatísticas	35
4. RESULTADOS.....	37

5. DISCUSSÃO.....	46
6. CONCLUSÃO	53
6.1 Conclusão Geral	53
6.2 Conclusão Específica.....	53
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
ANEXOS.....	66

1. INTRODUÇÃO

Os tendões são estruturas anatômicas que ligam os músculos aos ossos, possuem coloração branca e brilhante, em função da agregação e organização dos feixes de colágeno por toda extensão do tecido (BENJAMIN et al., 2008). Sua principal função é transmitir a força gerada nos músculos para o osso a fim de manter a postura ou produzir movimento possibilitando a realização de movimentos voluntários quanto involuntários, de uma maneira sintônica e eficaz. (CULAW et al., 1999; THORNTON e HART, 2011).

1.1 Características Estruturais e Bioquímicas do Tendão Calcâneo

O tendão calcâneo, ou tendão de Aquiles, é o maior e mais forte de todos os tendões do corpo humano, e mede cerca de 15cm (PALMER, 2007). Origina da junção das aponeuroses dos músculos gastrocnêmios lateral e medial, e convergem numa lâmina membranácea que se funde com o tendão do músculo sóleo subjacente para formar o tendão calcâneo, que se insere na tuberosidade do osso calcâneo da região tarsal do pé (LATARJET e LIARD, 1996; KOSKINEN et al., 2004; DANGELO e FATTINI, 2007).

O tendão calcâneo, assim como os demais tendões, é constituído por tecido conjuntivo denso e modelado, e abundante matriz extracelular (MEC) formada por fibras colagênicas altamente orientadas (JÓZSA e KANNUS, 1997; VIDAL e MELLO, 2010). O maior componente da MEC do tendão calcâneo é o colágeno, constituindo aproximadamente 85% do peso seco do tendão (KJAER, 2004), e tem como principal função fornecer resistência biomecânica a essa estrutura (BENJAMIN et al., 2008). O colágeno predominante é o tipo I compondo cerca de 95% do colágeno total (RILEY, 2008; LONGO et al., 2009), embora estejam presentes também em menor quantidade no epitendão e no endotendão colágenos do tipo II e III (JAMES et al., 2008). Os colágenos do tipo IV, V e VI são encontrados na parte mediana e na entese do tendão calcâneo (JÓZSA e KANNUS, 1997; WAGGETT et al., 1998; TAYLOR et al., 2011), e além disso, o tipo V é ligado através de ligações cruzadas com outros tipos de colágenos e atua regulando a característica de estrutura fibrilar no tendão (JAMES et al., 2008).

As moléculas de colágeno são constituídas por três cadeias polipeptídicas denominadas α , que assumem uma organização em tripla-hélice, estabilizada por ligações de hidrogênio e ligações eletrostáticas. Cada cadeia é caracterizada pela repetição de um triplete Gly-X-Y, na qual Gly é o aminoácido glicina, com conteúdo de 30% e X e Y podem ser qualquer aminoácido. No entanto, a posição X comumente é ocupada por prolina, representando 12% e

a posição Y por hidroxiprolina, com 11%. A repetição desse triplete é o que proporciona a estrutura primária de cada cadeia (PRESTES, 2013).

As extremidades geralmente não assumem a conformação helicoidal, favorecendo a ocorrência de ligações cruzadas em alguns tipos de colágenos. Tais ligações fornece uma grande resistência às forças de tensão, e são responsáveis pelas funções mecânicas. O aumento na quantidade de ligações cruzadas dentro e entre as moléculas de colágeno, em indivíduos que já atingiram idade adulta, resulta no aumento da cristalinidade e rigidez das estruturas que contém colágeno (CARVALHO e PIMENTEL, 2013).

A estrutura secundária do colágeno é gerada pela geometria das moléculas de prolina e hidroxiprolina, além disso, tais aminoácidos colaboram para estabilidade da estrutura helicoidal da molécula (PRESTES, 2013). A concentração de hidroxiprolina geralmente é usada como parâmetro para medir quantidades de colágeno presente no tecido de estudo (REDDY e ENWEMEKA, 1996).

As moléculas de colágeno são secretadas na forma de pró-colágeno solúvel, que são originadas a partir das cadeias α que se associam em sua porção C-terminal por ligações de H e pontes dissulfetos dando início a estrutura trimérica dessa molécula (CARVALHO e PIMENTEL, 2013). O pró-colágeno é secretado dentro das vesículas, formado no aparelho de Golgi e, à medida que passam para o meio extracelular, sofrem a ação de peptidases que clivam as duas porções não helicoidais presentes em suas extremidades, removendo os N- e C-propeptídeos. A ação dessas enzimas é necessária para iniciar o processo de fibrilogênese, e esses propeptídeos tem como ação impedir que as moléculas de pró-colágeno associem-se em agregados no interior celular, permitindo dessa forma, a sua secreção como moléculas isoladas. Assim, é necessário que ocorra o processo de clivagem para formação do tropocolágeno, o qual começa a se ligar com outras moléculas de tropocolágeno, por meio de ligações cruzadas, dando origem as fibrilas de colágeno (NEKLYUDOV, 2003; CANTY e KADLER, 2005; DAMODARAN et al., 2010)

A associação entre o colágeno e os outros elementos da MEC, bem como o diâmetro e a orientação de suas fibras e feixes são responsáveis pela funcionalidade e as propriedades biomecânicas dos tendões (VIDAL e CARVALHO, 1990). Na MEC além de colágeno, estão presentes substância de suporte, como proteoglicanos, (PGs) e glicoproteínas estruturais assim como proteínas de ligação, COMP (proteína oligomérica da matriz da cartilagem), tenascina C, fibronectina, fibulina, fibrilina e trompoespondina. As funções destas proteínas estão relacionadas com a organização das moléculas da matriz, sinalização e comunicação celular entre os componentes (CARVALHO e PIMENTEL, 2013).

Os PGs são moléculas compostas por uma proteína central, que se une covalentemente por uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanos. Entre os PGs presentes nos tendões, o decorin e o fibromodulin são os PGs mais importantes, com comprovada ação durante o processo de fibrilogênese (DERWIN et al, 2001) regulando a espessura das fibrilas, por inibir a adição de novas moléculas de colágeno e evitar a fusão entre as fibrilas (CARVALHO e PIMENTEL, 2013), além de estarem envolvidos na modulação da MEC e no comportamento celular (CHAKRAVARTI, 2002). A concentração desses pequenos PGs é alterada durante o processo de reparo, uma vez que atuam diretamente na fibrilogênese do colágeno (THOMOPOULOS et al., 2002).

Os elementos da MEC são produzidos por tenoblastos e tenócitos, que se situam entre as fibras de colágeno (KIRKENDALL e GARRETT, 1997, KANNUS, 2000). O arranjo estrutural das fibrilas de colágeno e a associação destas com outros elementos de matriz são responsáveis pelas propriedades biomecânicas do tendão (BENEVIDES et al., 2004).

A manutenção da integridade e organização da matriz envolve, a síntese e degradação dos componentes da MEC. As metaloproteinases (MMPs) são endopeptidases zinco dependente que desempenham ação proteolítica e possuem um importante papel na síntese e no remodelamento da MEC do tendão (SUMMERS e KOOB, 2002; MAGNUSSON et al., 2003). Inicialmente, as MMPs são expressas sob uma forma enzimaticamente inativa conhecida como “zimogênio” ou “pró-MMP”, cuja organização estrutural básica é comum a todos os membros já identificados e apresenta três domínios distintos: sequência N- terminal, pró-peptídeo ligado ao sítio catalítico por uma ligação sulfidril, sítio catalítico contendo Zn^{2+} e cálcio e extremidade C-terminal. A ativação enzimática requer a remoção do domínio pró-peptídeo por meio da degradação deste por outras proteases, tais como plasmina, ou por MT-MMPs (MMPs do tipo membrana) (RAFFETTO e KHALIL, 2008; MURPHY e NAGASE, 2008)

As MMPs são divididas basicamente em collagenases (MMP-1, 8 e 13), que clivam colágenos do tipo I, II e III; gelatinases (MMP-2, 9), (BRAMONO et al., 2004; YOUNGSTROM e BARRETT, 2016); estromelisina (MMP-3 e 10), MMPs de membrana (MMP-14, 15, 16, 17 24 e 25) e outras que são classificadas de acordo com suas propriedades bioquímicas (UEDA et al., 2008). As atividades das MMPs são inibidas de forma reversível pelos inibidores de metaloproteinases (TIMPs) (BRAMONO et al., 2004). Dessa forma, é necessário que haja um equilíbrio entre as MMPs e TIMPs a fim de manter a homeostase da MEC (SHARMA e MAFFULLI, 2004).

A pró-MMP-2 (72 kDa) é processada por ação combinada da MMP-14 e do TIMP-2, resultando na forma enzimaticamente ativa (64 kDa). Entretanto, o estresse oxidativo

aumentado e a ação do peroxinitrito (ONOO^-) podem ativar a pró-MMP-2 sem remover o pró-peptídeo autoinibitório, mantendo-se o mesmo peso molecular da forma inativa (72 kDa) (SCHULZ, 2007; MURPHY e NAGASE, 2008).

1.2 Arquitetura Interna do Tendão

Os feixes de colágeno apresentam-se dispostos em fibrilas, fibras e fascículos. Os fascículos são rodeados pelo endotendão, que possui continuidade com o epitendão. Tanto o endotendão como o epitendão constituem-se por uma fina camada de tecido conjuntivo contendo suprimento nervoso, vascular e linfático (RAISER et al., 2003; VOLETI et al., 2012). Alguns tendões, especialmente os encontrados nos pés e nas mãos 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. Tendões como o calcâneo, não estão envolvidos em uma bainha sinovial e apresentam em sua parte mais externa, um tecido conjuntivo frouxo, o paratendão, composto por única camada de células vascularizadas o que permite o fornecimento sanguíneo para esta estrutura (KANNUS, 2000; MAFFULLI et al., 2004; JAMES et al., 2008)

Dessa forma, a arquitetura tendínea é organizada em paratendão, o qual circunda essa estrutura. Abaixo há uma fina bainha de tecido conjuntivo denominada epitendão, onde sua superfície interna é contínua com o endotendão. Este recobre cada fibra do tendão e liga essas fibras individuais, formando os fascículos de colágeno (Figura 1) (JÓZSA e KANNUS, 1997).

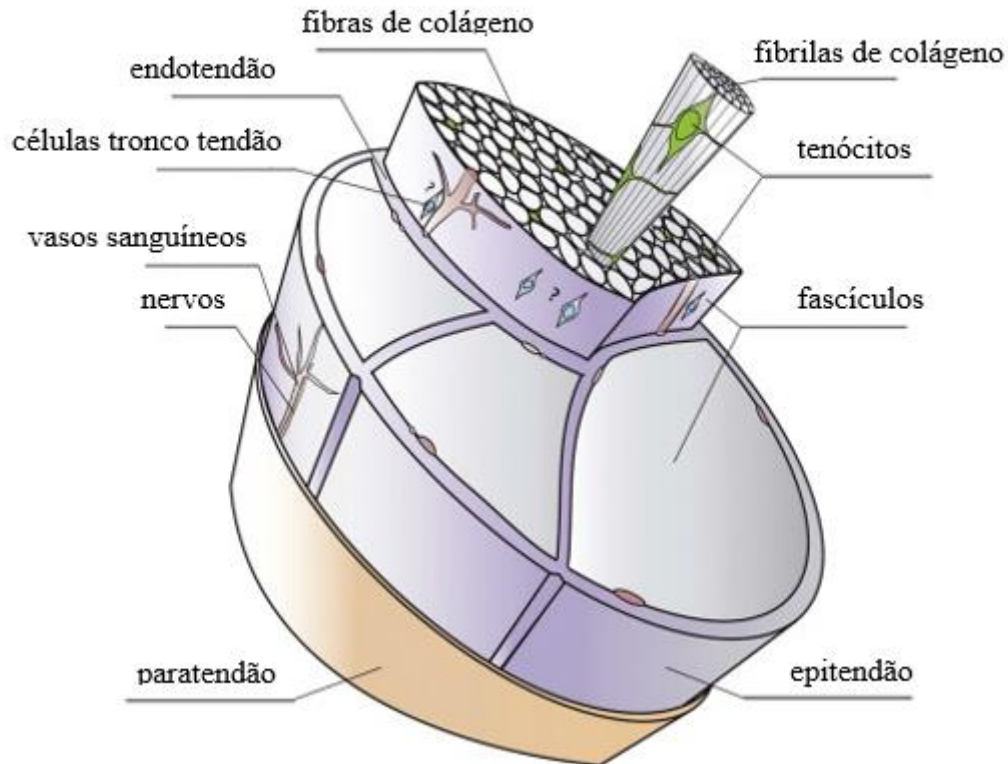


Figura 1: Ilustração da organização hierárquica da estrutura do tendão. As moléculas de colágeno são organizadas em fibrilas, feixes e fascículos (modificado de Wang, 2006).

1.3 Lesão do Tendão Calcâneo

Dentre os tendões do corpo humano, o tendão calcâneo é o maior e mais resistente. Entretanto, devido à sobrecarga, é um dos mais acometidos por lesão entre atletas devido à sobrecarga, o que é relativamente comum também na população adulta com incidência estimada em 18 para cada 100.000 pessoas. Em função da crescente prática de atividades esportivas esta incidência tem aumentado nos últimos anos. (LEPPILAHTI et al., 1996; PAJALA et al., 2002; GAJHEDE-KNUDSEN et al., 2013).

Lesão no tendão calcâneo, além de ser uma das mais graves, é também a mais comum dentre as lesões tendíneas. As rupturas podem ocorrer de uma forma total ou parcial. A ruptura total ocorre com maior incidência em atletas entre 20 e 40 anos de idade, enquanto que a ruptura parcial é mais comum em indivíduos de meia idade, envolvidos com atividades recreacionais. (BARRY e MCGUIRE, 1996).

Nos esportes, os futebolistas e esportes de alto impacto, como a corrida e o salto, são os que provocam com maior frequência as rupturas dos tendões calcâneos, uma vez que esses tipos

de atividades ocasionam grande estresse ao tendão durante a contração muscular excêntrica do tríceps sural (SALOMÃO et al., 1993). Diante disso, em torno de 81 e 89% das rupturas do tendão de calcâneo ocorrem durante atividades relacionadas com esportes (LEPPILAHTI et al., 1998; PAJALA et al., 2002).

Com o avanço da idade, ocorrem importantes mudanças biomecânicas no tendão, relacionadas com a degeneração colagenosa. Elastina, PGs e água diminuem enquanto que o conteúdo de colágeno aumenta, levando à perda da elasticidade do tecido como um todo (KANNUS, 2000).

O processo de cicatrização no tendão calcanear demora semanas ou até mesmo meses, em função do baixo suprimento sanguíneo, e quando lesionado há uma redução do fluxo com consequente hipóxia local (LONGO et al., 2009; PALMER, 2007; TITLE e SCHON, 2007).

Com a perda da integridade do tecido, logo se inicia o processo de reparo, com a finalidade de restabelecer a homeostasia tecidual (MENDONÇA e COUTINHO, 2009).

1.4 Mecanismos Envolvidos na Cicatrização Tendínea

A cicatrização envolve eventos que são sustentados e controlados por mediadores imunológicos e bioquímicos implicando na ativação de células e sinais moleculares que interagem, regulam e modulam o reparo. Esta é descrita em três fases, inflamatória, proliferativa e de remodelamento ou maturação, baseadas nos aspectos macroscópicos, histológicos e celulares predominantes em cada uma delas (BALBINO et al., 2005; LIMA et al., 2012). Essas fases não ocorrem isoladamente, e se sobrepõem de forma contínua e temporal (GHOSH e CLARK, 2007).

Fase inflamatória

Após a ocorrência da lesão, inicia-se a fase inflamatória, que se estende do 1º ao 7º dia pós-lesão (RAMASASTRY, 2005). É caracterizada pela alteração nas células endoteliais provenientes da lesão de vasos sanguíneos, e ativação de plaquetas, as quais sofrem desgranulação induzida pela trombina, e secretam múltiplos mediadores, incluindo fatores de crescimento (EMING et al., 2007).

A produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , interleucina 1 (IL-1) e interleucina 6 (IL-6) ocorre rapidamente após a lesão (GERSZTEN et al., 1999). O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e IL-1 são os principais mediadores da resposta inflamatória aguda, atuam sobre os receptores das células endoteliais induzindo a produção de óxido nítrico (NO), assim como aumento da expressão de moléculas de adesão, que contribuem para o recrutamento e acúmulo de mais fagócitos na área inflamada. Mesmo estando formado o

gradiente químico, se tais citocinas não estiverem expressas na membrana das células endoteliais, a força de arraste da circulação não permite a adesão e transmigração leucocitária para o exterior do vaso (TIZARD, 2005). Os neutrófilos provenientes da circulação são as primeiras células a atingirem a região, estando predominantes presentes entre o primeiro e segundo dia. (HATANAKA e CURI, 2007).

Os macrófagos, derivados dos monócitos, são as próximas células a surgirem na área lesionada, por volta do segundo ao quinto dia (PARK e BARBUL, 2004). Além de auxiliar os neutrófilos na eliminação de microorganismos pela fagocitose, os macrófagos após fagocitá-los, apresentam seus peptídeos às células T auxiliares (ABBAS et al., 2008). Além disso, atuam na limpeza da ferida, degradando e eliminando componentes do tecido danificado, como colágeno, elastina e PGs (MENDONÇA e COUTINHO, 2009).

A liberação de mediadores tais como, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformante β (TGF- β), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), serotonina, bradicinina, prostaglandina e histamina, também glicoproteínas adesivas como fibronectina e trombospondina, são importantes constituintes da MEC provisória (MENDONÇA e COUTINHO, 2009). Os mediadores liberados formam um gradiente quimiotático que orienta o recrutamento e a migração das células envolvidas com a instalação da resposta inflamatória (BALBINO et al., 2005).

Fase proliferativa

Inicia-se por volta do 8º dia e estende-se até o 14º dia pós-lesão. A fase proliferativa do processo de cicatrização é a responsável pelo fechamento da lesão propriamente dito, estágio que se caracteriza pelos processos de fibroplasia, angiogênese e deposição de MEC (OSHIRO et al, 2003).

No processo de fibroplasia, ocorre a substituição da MEC provisória por um tecido conjuntivo mais denso e elástico, uma vez que, ocorre aumento significativo de fibroblastos ativados, os quais são responsáveis por este processo, atuando na síntese de proteínas da matriz como a fibronectina, ácido hialurônico (AH), PGs e colágeno no local lesionado (HARTLAPP et al., 2001). Fatores de crescimento como PDGF e TGF- β , induzem a síntese de colágeno durante a fase proliferativa (BROUGHTON et al., 2006).

Para que a fibroplasia ocorra de forma eficiente, acontece concomitantemente o processo de angiogênese, formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes, a fim de carrear oxigênio e nutrientes necessários ao metabolismo celular local (BALBINO et

al., 2005; MENDONÇA e COUTINHO, 2009). Fatores como o FGF, VEGF e TGF- β são os principais agentes angiogênicos envolvidos nesse processo. Além disso, os mediadores como proteína quimiotática de monócitos (MCP-1), interleucina-8 (IL-8) e fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) também possuem atividade angiogênica (HATANAKA e CURI, 2007).

Com a fibroplasia e a angiogênese instaladas, inicia-se a formação do tecido de granulação, constituído por macrófagos, fibroblastos, células inflamatórias e componentes neovasculares, os quais são sustentados por matriz frouxa de fibronectina, AH, GAGs (glicosaminoglicanos) e colágenos tipos I e II (BAUM e ARPEY, 2005; HATANAKA e CURI, 2007).

A MEC, inicialmente formada por proteínas derivadas das plaquetas e plasma, passa por uma alteração em sua composição. Na fase inicial do reparo, os fibroblastos passam a depositar grandes quantidades de fibronectina e AH. Posteriormente, há aumento na produção de GAGs, que serão, em parte, substituídos por proteínas como colágeno, elastina, laminina e proteases responsáveis pelo remodelamento (BALBINO et al., 2005). Lentamente, o tecido de granulação é enriquecido com mais fibras colágenas, o que começa a dar à região lesada a aparência de cicatriz devido ao acúmulo de massa fibrosa. O pico de produção de colágeno tipo III ocorre neste período, e o conteúdo de água e GAGs permanece alto durante esta fase (OAKES, 2003).

Fase de remodelamento

Inicia por volta da 2ª semana pós-lesão e se estende por um período de um ano ou mais em rupturas totais, e cerca de 30 semanas em tenotomias parciais (POSTACCHINI e De MARTINO, 1980; TILLMAN e CUMMINGS, 1992). Tal fase é marcada por maturação dos elementos e alterações na MEC. (BALBINO et al., 2005; HATANAKA, CURI, 2007).

O remodelamento envolve etapas sucessivas de produção, digestão e orientação das fibras de colágeno. Inicialmente, a deposição de colágeno é feita de maneira aleatória, tendo como orientação a organização da fibronectina, e é dependente da natureza e direção das tensões aplicadas ao tecido. Subsequentemente, essas fibras são digeridas, ressintetizadas, rearranjadas conforme organização das fibras do tecido conjuntivo adjacente (BALBINO et al., 2005).

A etapa de remodelamento constitui-se pela mudança do tipo de colágeno que a compõe e de sua disposição. O colágeno tipo III, inicialmente mais abundante que o tipo I, vai sendo degradado mais ativamente com o decorrer do tempo, enquanto que o colágeno I vai tendo sua produção aumentada pelos fibroblastos, o que proporciona resistência ao tecido, em decorrência do aumento de ligações cruzadas entre as moléculas e da presença de fibras compactas e

espessas. O aumento na deposição e reorganização do colágeno, assim como o aumento da resistência da cicatriz propicia maior força tênsil ao tecido (PEREIRA et al., 2002; BROUGHTON et al., 2006).

A MEC não é estática, e mesmo no tecido normal é constantemente remodelada. A degradação dos seus componentes, como colágeno e de outras proteínas é realizada pelas MPPs, (CLUTTERBUCK et al., 2010), que consistem em collagenases intersticiais, gelatinases, estromelisinases e metaloproteinases da matriz ligadas à membrana. Entretanto, no reparo de tendão a degradação do colágeno é iniciada na MEC principalmente por gelatinases (MMP-2 e -9), as quais degradam colágenos desnaturados e fragmentos de colágeno (KJÆR, 2004). As collagenases (MMP-1, -3, -8 e -13) atuam degradando colágenos dos tipos I, II e III, além de outros componentes da matriz (CLUTTERBUCK et al., 2010). Tais enzimas são produzidas por diversos tipos celulares como, macrófagos, neutrófilos, fibroblastos e queratinócitos, e sua secreção é induzida por determinados estímulos, incluindo fatores de crescimento, como PDGF e FGF, e citocinas, como IL-1 e TNF- α (GILL e PARKS, 2008; TELLER e WHITE, 2011; KHOKHA et al., 2013).

O intenso processo de remodelamento no tendão é caracterizado pela presença de MMP-2 e 9. No final da fase inflamatória e fase proliferativa, ocorre declínio na produção de MMP-9 e aumento da produção de MMP-2 pelos fibroblastos (KAROUSOU et al., 2008). Entretanto, apesar de todo o processo de remodelamento, as propriedades bioquímicas e biomecânicas do tecido cicatrizado nunca se igualam às características de um tecido íntegro (SHARMA e MAFFULLI, 2016).

1.5 Mediadores Químicos e seus Efeitos no Processo de Reparo

Durante a evolução do processo de reparo, observa-se entre os mediadores, grande diversidade de natureza química, fontes produtoras e forma de influência sobre as células.

O TNF exerce uma variedade de efeitos biológicos incluindo produção de citocinas inflamatórias, regulação positiva de moléculas de adesão, proliferação, diferenciação e morte celular (KAMATA et al., 2005). Estudos tem demonstrado que TNF participa diretamente da angiogênese e induz a síntese do TGF- β , assim como proliferação de fibroblastos, componentes essenciais no processo de cicatrização. Ademais, induzem biossíntese de vários outros mediadores inflamatórios, incluindo interleucina 1 beta (IL-1 β) e cininas, que em sinergia podem amplificar a resposta inflamatória (FAHEY et al., 1990; HENRY e GARNER, 2003).

TNF- α foi originalmente identificado como fator que leva à necrose rápida de tumores transplantáveis em camundongos (CARSWELL et al., 1975) e tem sido considerada uma

citocina pró-inflamatória envolvida na resposta imune inata (CLARK, 2007). É produzida por células imunes como macrófagos e linfócitos (TIPPING et al., 1991; PARAMESWARAN e PATIAL, 2010) no entanto, estudos adicionais revelaram que também é produzido por células endoteliais e epiteliais (TIMOSHANKO et al., 2003).

Moléculas da superfamília TGF- β , também, participam ativamente deste processo, modulando uma série de eventos celulares vitais no desenvolvimento, diferenciação e homeostase dos tecidos (GORDON e BLOBE 2008). Seus membros compreendem TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β , proteína morfogenética óssea (BMP), inibinas e ativinas. Os membros da família TGF- β e PDGF são agentes quimiotáticos para neutrófilos e macrófagos. Além das atividades quimioatraentes do TGF- β , possui também papel importante na fibroplasia (SELLHEYER et al., 1993; HELDIN et al., 2002). Os mediadores como TGF- β , PDGF, tromboxanos e fator de ativação plaquetária (PAF) liberados pelas plaquetas ativadas, se difundem pela matriz provisória formando um gradiente quimiotático que orienta a migração das células envolvidas com a instalação da resposta inflamatória (BALBINO et al., 2005).

A regulação do VEGF é fundamental para a neovascularização em numerosos tecidos sob condições fisiológicas e patológicas. O VEGF possui múltiplas isoformas, criadas por *splicing* alternativo ou clivagem proteolítica, e caracterizadas por diferentes propriedades de ligação ao receptor e de ligação à matriz (VEMPATI et al., 2014). Atualmente a família do VEGF inclui VEGF-A, -B, -C, -D, -E e PLGF. VEGF, produzido por macrófagos, além de outros fatores de crescimento também sintetizados por tais células, como PDGF, TGF- β , e FGF se destacam como as principais citocinas necessárias para estimular a formação do tecido de granulação (SINGER e CLARK 1999).

Durante o processo de cicatrização, acredita-se que a IL-10 (Interleucina 10) seja o mais importante mediador com papel limitador e finalizador da resposta inflamatória. Foi originalmente descrita como um fator inibidor de síntese de citocinas, por sua capacidade de ativar funções de macrófagos / monócitos e diminuir a produção de citocinas pró-inflamatórias. Adicionalmente, não só regula o crescimento ou diferenciação de várias células do sistema imune, mas também de queratinócitos e células endoteliais (MOORE et al., 2001). Uma das suas formas de atuação se dá pela inibição da infiltração de neutrófilos e macrófagos aos sítios de injúria tissular (SATO et al., 1999). Além dos seus potentes efeitos anti-inflamatórios, a IL-10 demonstrou regular as citocinas fibrogênicas, como parte de seu papel na regulação do remodelamento tecidual (YAMAMOTO et al., 2001).

O processo de reparo tecidual é, em grande parte, regulado pela produção de mediadores/ moléculas que ordenam e controlam a ativação de genes responsáveis pelo

controle, proliferação e atividade celular. Antígeno de proliferação nuclear (PCNA) é uma proteína predominantemente conservada ao longo da evolução, e desempenha papéis essenciais em muitos processos celulares (MOLDOVAN et al., 2007; NARYZHNY, 2008). O monômero PCNA humano é uma proteína de 36 kDa que consiste em 261 resíduos de aminoácidos. A PCNA funcional é um homotrímero que forma uma estrutura de anel, em que três monômeros são unidos em interação antiparalela de cabeça para cauda, e atua como uma pinça de deslizamento, auxiliando a DNA polimerase na duplicação da fita do DNA (KELMAN e O'DONNELL, 1995 ; GULBIS et al., 1996 ; NARYZHNY, 2008).

Estudos revelaram uma notável característica do PCNA, sua habilidade de interagir com múltiplos fatores, estando assim envolvido na união do fragmento de Okazaki, reparo e metilação do DNA, e montagem da cromatina. A PCNA é expressa em quantidades diferentes durante o ciclo celular e apresenta sua taxa de síntese diretamente relacionada com o índice de células em proliferação. Como estas reações ocorrem durante a replicação do DNA, tal proteína tem sido utilizada como marcador para células em proliferação (ALBERTS et al., 1997).

Assim como a PCNA, as *Cysteine Aspartic Protease* (caspases) possuem suma importância no processo de reparo. São enzimas proteolíticas amplamente conhecidas por seu papel no controle da morte celular e inflamação (ELLIS, 1986). No entanto, evidências crescentes indicam múltiplas funções além da apoptose, que consiste em processo de morte celular ativo que ocorre no desenvolvimento, homeostase e condições patológicas de organismos multicelulares (GALLUZZI et., 2014). Existem dois tipos de caspases: caspases iniciadoras e caspases efectoras. Enquanto as primeiras especificam as pró-formas de caspases efectoras inativas, ativando-as, as caspases efectoras clivam substratos celulares, catalisando diversos conjuntos de fenômenos biológicos (GALLUZZI et., 2012). Dessa forma, com base na sua função, caspase-2, -3, -7, -8, -9 e -10 de mamífero são classificadas como caspases apoptóticas, enquanto as caspases-1, -4, -5, -11 e -12 estão envolvidas na inflamação (KUMAR, 2007).

1.6 Tratamentos

A fim de aliviar, curar e até mesmo alterar seu processo fisiológico e patológico, diversos tratamentos vêm sendo estudados com intuito de modular a cicatrização tendínea, buscando restabelecer a arquitetura original do tecido, assim como reduzir o tempo de recuperação e o retorno às atividades rotineiras (MURPHY e NIXON, 1997; SAINI et al., 2002; ARRUDA et al., 2007).

1.6.1 Células Tronco Mesenquimais derivadas de Tecido Adiposo (CTMA)

As CTA (células tronco mesenquimais) foram primeiramente descritas por Friendstein, em 1970, quando isolou células estromais da medula óssea de camundongo *in vitro*. As características morfológicas, de expansão e de diferenciação celular foram demonstradas em seu estudo (FRIEDENSTEIN et al., 1970). Mais tarde, sob diferentes condições de cultura, observou-se que as CTA da medula óssea foram capazes de se diferenciar em osteoblastos, condrócitos e adipócitos. Com base nessa capacidade de diferenciação em diversos tipos celulares, Caplan propôs, em 1991, o termo “célula tronco mesenquimal” (CTM), do inglês *mesenchymal stem cell*.

Atualmente, CTM têm sido isoladas da medula óssea de diversas espécies, incluindo roedores, humanos, gatos e cães (SIMMONS et al., 1991; PITTENGER et al., 1999; MARTIN et al., 2002). Apresentam como principal característica, capacidade de renovação e diferenciação em diversas linhagens de tecidos como conjuntivo, ósseo, cartilaginoso, adiposo, tendíneo e muscular (CAMPAGNOLI et al., 2001).

Uma alternativa promissora para o tratamento de lesões tendíneas e ligamentares é a obtenção de CTMA. Similarmente à medula óssea, as células tronco do tecido adiposo têm um amplo potencial de diferenciação nos variados tipos celulares, como adipogênica, condrogênica, osteogênica, miogênica, angiogênica, neurogênica e cardiomiogênica (STREM et al., 2005). Possui como vantagem uma taxa de isolamento de 100%, maior concentração de células mesenquimais (2%) quando comparada à medula óssea (0,002%) e apresenta uma taxa de proliferação *in vitro* superior à das células derivadas de medula (DAHLGREN, 2009). Além disso, a quantidade de células não parece diminuir com a idade, podem ser facilmente obtidas e em grandes quantidades por meio de métodos pouco invasivos e dolorosos, tornando esse tipo celular atraente para o isolamento de CTM (DIMUZIO e TULENKO, 2007).

Segundo Zannettino et al., (2008) o nicho das CTMA localiza-se na região perivascular, composta por vasos sanguíneos em associação com células de tecido conjuntivo, adiposas, estromais e células tronco. É possível dizer que o nicho das células tronco do tecido adiposo é perivascular, embora o termo “perivascular” signifique “em torno dos vasos sanguíneos”, as células tronco do tecido adiposo também foram encontradas no interior dos vasos, fazendo parte dos seus componentes. No entanto, devido à falta de marcadores específicos, a exata localização e a identidade celular ainda não são elusivas.

As CTM, em função das suas propriedades quimiotáticas possuem a capacidade de se acumular ao redor de processos inflamatórios quando administradas *in vivo*. À vista disso, essas células podem ser utilizadas como ferramentas terapêutica em diversas áreas como, por

exemplo, na terapia regenerativa (SOUZA et al., 2010). Estudos adicionais mostram que os fatores liberados por CTM podem suprimir o sistema imunológico local, modulando células T e B e induzindo a expressão de fatores anti-inflamatórios, como interleucina-10 (IL-10), antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra), ou prostaglandina E2 (PGE2) (CAPLAN e DENNIS, 2006; VERONESI et al., 2014).

As CTMA, surgiram como um elemento-chave das terapias de medicina regenerativa devido à sua capacidade de se diferenciar em uma variedade de linhagens celulares. Além disso, sua capacidade de secreção paracrina de uma ampla seleção de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento as torna altamente atrativas clinicamente. Mais especificamente, de particular interesse são os efeitos anti-apoptóticos, anti-inflamatórios, proangiogênicos, imunomoduladores e anti-cicatrices que foram demonstrados para CTMA, tornando essas células promissoras para terapia celular em medicina regenerativa (BERTOLINI et al., 2012). Hsiao et al., (2012) em seu estudo, mostrou que de todas as populações de CTMA examinadas representavam o tipo celular mais atraente para promover a angiogênese em aplicações de engenharia de tecidos, expressando em níveis mais altos alguns fatores paracrinicos, como fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1), fator vascular de crescimento endotelial-D (VEGF-D) e IL-8.

Nos últimos anos, diversos estudos vêm sendo realizados em ratos, cavalos e ovelhas entre outros modelos animais, utilizando CTMA a fim de buscar progresso no reparo tecidual e regeneração do tendão (JU et al., 2008; LACITIGNOLA et al., 2008; NIXON et al., 2008). A capacidade das CTMA em secretar grandes quantidades de fatores de crescimento específicos, citocinas ou outros fatores paracrinicos em seu ambiente alvo pode ser utilizada para aplicações regenerativas terapêuticas. Para este conceito, os estudos para elucidar, aumentar e explorar os mecanismos de células estaminais para a regeneração de tecidos tem sido altamente realizada (PHILLIPS e TANG, 2008).

Vários trabalhos têm sido realizados a fim de avaliar os efeitos proporcionados pela CTMA em tendões. Nixon et al. (2008), estudando tendão flexor digital superficial (TFDS) de cavalos com tendinite induzida por collagenase mostrou que a aplicação de CTMA melhorou a organização das fibras de colágeno e estrutura geral do tendão. Estudo realizado por Carvalho et al. (2016) avaliando os efeitos da CTMA no tratamento de tendinite induzida no TFDS em cavalos, mostrou uma melhora significativa na organização das fibras colágenas, diminuição do infiltrado inflamatório e aumento da expressão do colágeno tipo I no grupo tratado em comparação ao controle.

1.6.2 Estimulação Elétrica de Baixa Intensidade

A eletroterapia tem sido utilizada desde 2750 a.C. segundo retratos em templos egípcios indicando que já usavam o peixe gato do Nilo (*Malopterus electricus*), com propósitos terapêuticos (LEITÃO, 1967). Em 1791 Luigi Galvani publicou o tratado *De viribus electricitatis im motu muscularis* (sobre a ação da eletricidade no movimento muscular). Foi um dos primeiros fisiologistas a investigar as correntes de excitação nervosa. Através de seu experimento sobre a produção de eletricidade por meio químico, gerou em 1800 a construção da primeira pilha elétrica; como consequência, a corrente contínua foi balizada de corrente “galvânica” em homenagem a Galvani (LEITÃO, 1967).

Em 1830, 30 anos mais tarde, Matteucci provou que uma corrente iônica era observada no tecido ferido. Dubois-Reymond, em 1843, com aproximadamente 1 μ A de corrente em uma ferida de pele humana, observou experimentalmente a existência de corrente na lesão (JAFJE et al., 1984). Muitos tratados de eletroterapia registram que um dos autores mais importantes deste ramo da medicina no século XVI, foi o notável médico da rainha Elizabeth, Willian Gilbert, que escreveu vinte importantes trabalhos sobre o assunto, tornando-se assim, o pai da eletroterapia moderna. Estes fundamentos estão descritos na obra “De Magnete” (LEITÃO, 1979; LIANZA, 1985).

Segundo Robinson e Snyder-Mackler 2001 (*apud* BORGES, 2006), o procedimento correto para aplicação de microcorrente ocorre em níveis próximos do fisiológico e, como resultado, os pacientes não têm nenhuma sensação de formigamento, tão comumente associada a procedimentos eletroterapêuticos (estimulação subliminar). Starkey (2001), relata que esta forma de estimulação elétrica é aplicada em nível subsensorial ou sensorial muito baixo, com correntes inferiores a 1000 μ m.

De acordo com Carlucci (2004), o tecido saudável é o resultado do fluxo direto de correntes elétricas pelo nosso corpo. O balanço elétrico é alterado quando o corpo é lesado em determinado local, fazendo com que a corrente elétrica mude seu curso. A terapia com estimulação elétrica de baixa intensidade (microcorrente) sobre a lesão tem o objetivo de normalizar esse fluxo, colaborando para o reparo do tecido, sendo que alguns autores relatam que a terapia por microcorrente pode produzir sinais elétricos semelhantes aos que acontecem no corpo humano na recuperação de tecidos lesionados (CHENG et al, 1989; WING, 1989).

A microcorrente é uma modalidade que utiliza baixa frequência e intensidade na faixa de microampères, e não é projetada para produzir contração muscular (PRENTICE, 2004; BORGES, 2006). Sua aplicação é subsensorial, indolor, não apresentar efeitos colaterais, além de ser de baixo custo e de fácil aplicação (RODOPIANO et al., 2013). Os equipamentos de

microcorrente são projetados para imitar e ampliar os sinais bioelétricos do corpo humano. Isso aumenta a habilidade do corpo para transportar nutrientes e resíduos metabólicos das células na área afetada (CHENG et al, 1989). Seus efeitos eletroterapêuticos desencadeiam uma série de eventos, entre os quais: aumento do metabolismo celular, normalização do pH local, proliferação fibroblástica, aumento da síntese de colágeno, ações na contratilidade do tecido, incremento da síntese proteica (aumento da síntese de elastina), aumento da permeabilidade das membranas celulares e normalização da bioeletridade tecidual (FREITAS et al., 2013; RODOPIANO et al., 2013).

Segundo os autores, este tipo de corrente devido a oscilação entre cargas negativas e positivas, atua na bipolaridade das células, podendo ser vista como catalisadora nos processos iniciais e de sustentação em numerosas reações químicas e elétricas que ocorrem no reparo tecidual. Além disso, atua influenciando o transporte de íons de cálcio extracelular na membrana. Há um aumento no $\text{Ca}^{(2+)}$ citosólico e um aumento na calmodulina do citoesqueleto ativado. O nível mais alto de cálcio intracelular estimula o aumento da síntese de adenosina trifosfato (ATP), sendo essa molécula a grande responsável pela síntese proteica e regeneração tecidual devido a sua participação em todos os processos energéticos celulares (BRIGHTON et al., 2011; FREITAS et al., 2013; RODOPIANO et al., 2013).

Chan et al. (2007) estudando a aplicação da microcorrente e seus efeitos no tendão calcâneo de ratos 4 semanas após a lesão, mostrou que o tratamento melhora a resistência mecânica assim como o processo de cicatrização. Ahmed et al. (2012) utilizando a microcorrente no tendão calcâneo de coelhos por 30 minutos em 6x/semana, intensidade de $100 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ e frequência de 10 Hz, concluíram que os estímulos elétricos produzem redução da inflamação e promove alinhamento das fibras colágenas.

Buscando recuperar a integridade e a funcionalidade do tendão lesionado, avanços científicos proporcionaram intensificar estudos sobre o uso de estimulação elétrica com intuito de produzir efeitos terapêuticos no reparo tendíneo, bem como o uso de células tronco para a cura e restauração da funcionalidade do tendão. Devido lesões do tendão calcâneo serem a mais comuns entre as lesões tendíneas, além de sua grande incidência, estudos envolvendo tais pesquisas são de grande importância para a clínica, já que buscam reduzir o tempo de recuperação e o retorno às atividades rotineiras (BARRY e MCGUIRE, 1996; ARRUDA et al., 2007). Considerando a atuação em importantes eventos celulares de ambas terapias, a proposta do presente estudo foi analisar, separadamente e concomitantemente efeitos da microcorrente e das CTMA durante a fases proliferativa do processo de cicatrização.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar a presença das CTMA no 14º dia do processo de reparo após sua aplicação na região de transecção, assim como estudar seus efeitos e do tratamento com MC quando utilizados de forma isoladas ou associadas no reparo do tendão calcâneo.

2.2 Objetivo Específico

1. Observar a permanência das CTMA região de transecção dos tendões 14 dias após a lesão, através da microscopia de fluorescência;
2. Analisar a organização estrutural, através da microscopia ótica comum e de polarização, de tendões após a transecção parcial, em resposta ao tratamento com microcorrente e CTMA;
3. Identificar através de WB a presença dos colágenos tipos I e III, PCNA e caspase nos tendões de todos os grupos experimentais;
4. Quantificar hidroxiprolina em tendões dos grupos submetidos aos tratamentos propostos durante o processo de cicatrização;
5. Dosar citocinas anti e pró-inflamatória, IL-10 e TNF- α através do ensaio de ELISA;
6. Identificar em tendões dos grupos experimentais a presença e a atividade enzimática da metaloproteinases-2 e -9.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Grupos Experimentais

Foram utilizados 75 ratos Wistar machos, adultos jovens (120 dias), pesando em média 500 gramas, obtidos do Centro de Experimentação Animal do Centro Universitário Hermínio Ometto (UNIRARAS), onde os mesmos foram mantidos durante todo o procedimento experimental. Os animais foram agrupados e mantidos em gaiolas plásticas padrão, em cama de maravalha, água e ração *ad libitum* e temperatura ambiente de 23°C, com ciclo de claro e escuro de 12h.

Os animais foram divididos aleatoriamente em 5 grupos experimentais (n=15 para cada grupo) (Tabela 1): normal (N) – ratos com tendões sem transecção; transeccionado (T) – ratos com tendões transeccionados tratados com aplicação tópica de PBS na região lesionada; células-tronco derivadas de tecido adiposo (CT) – ratos com tendões transeccionados tratados com aplicação de CTMA na região lesionada; microcorrente (MC) – ratos com tendões transeccionados tratados com aplicação de microcorrente; e células-tronco derivadas de tecido adiposo em associação com microcorrente (CT+MC) – ratos com tendões transeccionados tratados com aplicação de células tronco derivadas de tecido adiposo e microcorrente na região lesionada. Os animais dos diferentes grupos experimentais foram eutanasiados 14 dias após a cirurgia.

Os procedimentos experimentais seguiram as condutas de cuidado e manipulação dos animais de acordo com as normas e aprovação do Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) da UNIRARAS (em anexo) sob protocolo 049/2016.

Tabela 1: Grupos experimentais

Grupos	Descrição
N	Ratos com tendão sem transecção
T	Ratos com tendão transeccionado
CT	Ratos com tendão transeccionado tratados com CTMA
MC	Ratos com tendão transeccionado tratados com microcorrente
CT+MC	Ratos com tendão transeccionado tratados com CT e microcorrente

3.2 Obtenção e Cultura das Células Tronco

Para obtenção das células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (CTMA), foram utilizados ratos Wistars machos com 3 meses de idade. Os animais foram eutanasiados com overdose de anestésico ketamina (100 µL/g) e Xylazina (300 µL/g). Após a eutanásia, foi realizada uma incisão na pele do animal na região inguinal para coleta do tecido adiposo, foi retirada cerca de 2g de gordura inguinal por animal.

A gordura extraída foi adicionada em uma placa de Petri com solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco modificado (DMPBS) estéril, e o material foi cortado em minúsculos pedaços, conforme Yang et al. (2011), com algumas modificações. Posteriormente retirou-se todo o líquido restante deixando somente o tecido adiposo. Para a digestão enzimática, adicionou-se em um tubo Falcon 4,9mL de DMBPS + 100µl de colagenase tipo I 0,2% (a cada 4 gramas de tecido adiposo foi adicionado 100µL de colagenase) suplementado com 50µl de antimicótico para cultura. Filtrou-se todo material com o auxílio de uma seringa, e o tubo foi mantido por 1 hora em estufa a 37 °C, homogeneizando por 1 minuto a cada 15 minutos. Após o processo, o tecido dissociado foi filtrado para remoção de detritos, obtendo pelo menos 5mL de tecido após a filtragem. A inativação da colagenase foi feita utilizando 5mL de Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) suplementada com 15% de soro fetal bovino (SFB).

A solução foi então centrifugada durante 10 minutos a 1.500 rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuscitado em 3mL de DMEM, suplementado com 15% de SFB e plaqueado em 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 entre a 6^a e a 7^a passagem (6P/7P).

3.3 Protocolo para a Transecção Parcial do Tendão Calcâneo e Aplicação Tópica de CTMA

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de Ketamina e Xylazina, e nas patas inferiores direitas foram realizadas tricotomia e antissepsia, para então iniciar os procedimentos cirúrgicos. Para exposição do tendão calcâneo, foi feita na pele do animal uma incisão longitudinal e posteriormente realizada uma transecção parcial transversal 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 e 2013). Foram aplicadas cerca de 4x10⁵ células (CTMA) por animal do grupo CT e CT+MC, ressuscitadas em 15 µL de PBS. No grupo T foi aplicado no local da lesão 15 µL de PBS; o grupo MC recebeu aplicação de 15 µL de PBS. Após a aplicação das CTMA e

do PBS, a pele dos animais foi suturada com fio de náilon (Shalon 5-0) e agulha (1,5 cm). Os animais cujo tendão não foi transeccionado pertenciam ao grupo normal, sem lesão. Todos os ratos foram operados em condições estéril.

3.4 Protocolo de Microcorrente

O tratamento proposto com microcorrente teve início 24 horas após a intervenção cirúrgica e foi mantido 3 vezes por semana durante doze dias. Os animais dos grupos tratados receberam aplicações de corrente elétrica contínua microgalvanica bifásica durante 4 min (Physiotonus Microcurrent – Bioset ® Indústria de Tecnologia Eletrônica Ltda, Rio Claro, São Paulo, Brasil). Em cada aplicação, utilizou-se 10 μ A/minuto. Para este procedimento, os animais não foram anestesiados. Durante a aplicação da corrente, dois eletrodos de metal, com uma extremidade esférica (10 mm), foram colocados no lado esquerdo e direito da lesão durante 2,0 min e, em seguida, a posição foi invertida e a corrente aplicada durante mais 2,0 min. Os animais do grupo controle foram submetidos da mesma maneira como o grupo tratado, no entanto, a corrente elétrica não foi aplicada. Todos os animais foram eutanasiados com uma overdose do anestésico Ketamina (100 μ L/g) e Xylazina (300 μ L/g) 14 dias após a lesão e os tendões foram retirados para análises histológicas e bioquímicas

3.5 Citometria de Fluxo

Após a expansão das CTMA na 6ª ou 7ª P, foram centrifugadas a 1800 rpm por 10 min, e em seguida contadas câmara de Neubauer. Feito isso, foram ressuspensas em DMPBS, em uma concentração mínima de 10^6 células/mL para cada 200 μ L de DMPBS/BSA 2%. Posteriormente foi realizada a incubação por 1h (37°C) 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), para a obtenção do painel imunofenotípico. Em seguida, foram lavadas 2x com 500 μ L de DMPBS e centrifugadas a 2000 rpm, durante 7 min. Dado o tempo foram então, ressuspensas em 500 μ L de DMPBS/BSA 2% e 50 μ L de paraformaldeído (4%) para a realização da análise por citometria de fluxo.

3.6 Dosagem de Hidroxiprolina

A hidroxiprolina foi utilizada como indicador da quantidade de colágeno total contido na RT (região de transecção) nos tendões dos diferentes grupos. A dosagem ocorreu em três etapas consecutivas. A primeira etapa consistiu na desidratação das amostras: as amostras foram picadas, e adicionadas dentro de um eppendorf, em seguida foram imersas em acetona, permanecendo na solução por 24 horas. Após esse tempo, descartou-se a acetona contida, e

adicionou-se novamente acetona por mais 24 horas. Dado o tempo, a acetona foi descartada e o material foi deixado por 24 horas em uma solução de Clorofórmio PA: Etanol PA (2:1). Descartou-se a solução novamente e deixou por 24 horas em uma nova solução de Clorofórmio PA: Etanol PA (2:1). As amostras foram armazenadas em geladeira até completar cada tempo da solução. Após descartar a última solução, as amostras foram secas em estufa a 60 °C por 2 horas. Cada amostra foi cuidadosamente pesada. A segunda etapa consistiu na hidrólise e neutralização das amostras: após ser pesadas as amostras foram submetidas a hidrólise em HCl 6N (1 mL/10 mg de tecido) por 4h à 130°C. Posteriormente as amostras foram neutralizadas com NaOH 6N (o volume de NaOH 6N foi igual ao volume de HCl 6N utilizado em cada tubo). Os tubos foram homogeneizados e centrifugados a 6.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e congelado a -20°C até a realização da 3ªetapa. A terceira etapa se deu pela oxidação da hidroxiprolina. Para preparo da microplaca (96 wells) foi utilizado 5µL de cada amostra + 15µL de água destilada, foi adicionado 50 µL de 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), e incubado por 20 minutos em temperatura ambiente. Dado o tempo, adicionou-se 50µL de solução de Ehrlich (2,5 g de 4-dimetilamino-benzaldeído, 15,4 mL de n-propanol e 4,6 mL de ácido perclórico a 70%). O material foi incubado por 15 min a 65°C e em seguida, resfriado até atingir temperatura ambiente. Absorbância das amostras foi medida a 550nm no espectrofotômetro (leitor de microplaca, Expert Plus, Asys®). Para a preparação da curva padrão foram utilizadas concentrações de 0,2 a 6 µg/mL de hidroxiprolina. 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.

3.7 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 12 µm. Os cortes foram fixados usando solução de formaldeído a 4% em tampão Millonig (fosfato de sódio monobásico 0.13 M e hidróxido de sódio 0.1 M, pH 7.4) durante 15 minutos em temperatura ambiente, em seguida, foram lavadas em água por mais 15 minutos. Posteriormente os cortes seguiram para as análises de birrefringência e coloração com hematoxilina-eosina (HE) e azul de toluidina (AT).

3.8 Histologia

3.8.1 Coloração HE e AT

Após a fixação, os cortes com amostras de tendões foram corados com HE permitindo diferenciar estruturas celulares como núcleo (corado pela hematoxilina) e citoplasma (corado pela eosina) e AT, utilizado para detecção de proteoglicanos. As lâminas foram analisadas sob um microscópio de luz Olympus Olympus BX-51 (Olympus America, Center Vallery, PA, USA).

3.8.2 Birrefringência

As lâminas contendo os cortes já fixados foram embebidas em água destilada e posteriormente, foi realizado o estudo da morfologia das fibras e feixes de colágeno pela sua birrefringência, a qual foi medida por análise de imagem capturada. Para esta análise, foi utilizado o microscópio Olympus BX-51 (Olympus America, Center Vallery, PA, USA) equipado com câmera Q-color 5 (Olympus America) e o software Image Pro-plus v.6.3 para Window™ (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

O maior eixo do tendão foi posicionado a 45° entre os polarizadores cruzados durante as medições. Usou-se uma padronização da fonte de iluminação para que as condições de análises fossem preservadas. Em termos ópticos, empregou-se a objetiva de 10x e luz monocromática com $\lambda = 546$ nm. Foram examinados e medidos cortes longitudinais dos tendões de todos os grupos. As medidas de birrefringência foram baseadas em relação a intensidade do brilho das imagens e expressas em Gray Average (pixels).

3.9 Extração e Dosagem de Proteínas Totais.

Para extração de proteínas totais, após o processo de pulverização das amostras, foi adicionado 300 μ L do reagente T-PER™ (Tissue Protein Extraction Reagent 78510-Thermo Fisher Scientific) associado ao inibidor de protease (protease inhibitor cocktail - 04693159001 SIGMA®). Em seguida, utilizando o aparelho de Politron (PTA 20S modelo PT 10/35; Brinkmann Instruments, Westbury, NY, USA) operado por cerca de 40 segundo, as amostras foram então homogeneizadas em banho de gelo (PTA 20S modelo PT 10/35; Brinkmann Instruments, Westbury, NY, USA). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm, a 4°C, por 40 min. O sobrenadante foi coletado para dosagem de proteínas através do método de Biureto (Método colorimétrico Protal, Laborlab, São Paulo, Brasil), o qual foi utilizado para quantificação de proteínas e seguiram para análises por WB, ELISA e zimografia.

3.10 Western Blotting (WB)

Após a extração das proteínas, as amostras foram incubadas a 100°C por 5 min em 20% do volume de Tampão de Laemmli (Azul de bromofenol 0.1%, fosfato de sódio 1M, glicerol 50%, SDS 10%). Para corrida eletroforética foi aplicado um volume correspondente a 50 µg de proteína em gel bifásico: gel de empilhamento (EDTA 4mM, SDS 2%, Trisma base 750mM, pH 6.7) e gel de resolução (EDTA 4mM, SDS 2%, Trisma base 50mM, pH 6.7). A corrida foi realizada a 90V por aproximadamente 2h com Tampão de Corrida (Trisma base 200mM, glicina 1.52M, EDTA 7.18mM e SDS 0.4%), diluído 1:4.

Em seguidas as amostras do gel foram transferidas para a membrana de PVDF (Immun-Blot®-BioRad) durante 2h a 120V em gelo, com Tampão de Transferência (Trisma base 25mM, glicina 192mM). Após transferência, as membranas foram bloqueadas com albumina bovina em solução basal por 1h30min em temperatura ambiente. Dado o tempo, as membranas foram lavadas com solução basal 3vezes por 10 minutos e incubadas overnight a 4°C com soluções basal acrescida de 3% de albumina bovina sérica contendo os com anticorpos específicos para as diferentes proteínas: Caspase III (ab13847, 1:500) PCNA ([PC10]ab29, 1:600) Colágeno I (C2456, 1:2.000) Colágeno III (C7805, 1:4.000) β-actina ((C4):sc-47778, 1:500)

Posteriormente, as membranas foram novamente lavadas 3 vezes por 10 minutos com solução basal e incubadas sob agitação por 2h em solução com os respectivos anticorpos secundário para Caspase III (IgG-HRP:sc-2004, 1:10.000) PCNA, Colágeno I, Colágeno III, β-actina (IgG1-HRP:sc-2060, 1:1.000). As membranas foram lavadas com solução basal e incubadas por 1 min com reagentes de quimioluminescência Thermo Scientific® foram então, fotografadas e documentadas em equipamento G:BOX. A intensidade das bandas foi avaliada por densitometria através do programa Image J (NIH, USA) 4.0.3.2.

3.11 Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay (ELISA)

A concentração das citocinas IL-10 e TNF-α, foram determinadas pelo teste de ELISA de captura, utilizando-se pares de anticorpos monoclonais para cada citocina murina (Pharmlingen ou RD Systems). Cada um dos anticorpos primário e secundário utilizado nesta técnica contra cada citocina, suas concentrações foram determinadas em nosso laboratório. Foi utilizada metodologia preconizada pelo fornecedor (Pharmlingen,BD) e adaptadas para nosso protocolo como descrito em Cano et al. (1998). Cada citocina teve sua concentração determinada baseada na reta de regressão linear feita para a curva padrão obtida como o padrão

adequado de citocina recombinante. Para análise estatística, o teste ANOVA e pós-teste de Tukey ($p < 0.05$) foram realizados em software GraphPadPrism® versão 3.0.

3.12 Fluorescência

A fim de identificar a presença de CTMA na lesão tendínea, foram utilizadas células tronco retiradas da região inguinal de ratos lewis homozigotos transgênicos portadores do gene para proteína GFP (*Green Fluorescent Protein*), tal proteína mediante fluorescência na zona verde do espectro visível, emite fluorescência, o que permite diferenciá-las de outras células presentes no tecido.

Para preparação das lâminas, cortes longitudinais de tendões foram fixados em acetona gelada -4°C durante 20 min. Em seguida, foram lavados duas vezes com tampão fosfato salino (PBS) mais 5 min. Foram então incubados com 4'6'-diamidino-2-29 fenilindol (DAPI) (0,1 mg/mL em metanol) por 5 min a 37°C para marcação dos núcleos. Posteriormente as lâminas foram analisadas no microscópio de fluorescência Zeiss Axio Imager.A2 na objetiva de 40x e as imagens capturadas pelo programa AxioVision REL. 4.8, e sobrepostas para visualização dos compartimentos celulares de forma conjunta. A análise realizada foi qualitativa.

3.13 Zimografia para Metaloproteinase-2 e -9

Para análises da presença e atividade da MMP-2 e -9, foi utilizado uma concentração de $1\mu\text{g}$ de proteína por amostra. As amostras foram diluídas em 20x em tampão de amostra, chegando a um volume final de 20 μL e então, aplicadas no gel de corrida contendo gelatina. A eletroforese contendo 0,1% de gelatina foi realizada a 4°C . Após a corrida, os géis foram lavados 2x por 20 minutos cada, com tampão de lavagem (2,5% de Triton X-100) e incubados durante 21h numa solução de Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), 0,1 M NaCl e 0,03% de azida de sódio a 37°C . Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R-250 por 1h. Dado o tempo, foram então descorados com uma solução contendo 30% de metanol e 10% de ácido acético para observação das bandas correspondentes às 3 isoformas da MMP-2 e as 2 isoformas da MMP-9.

3.14 Análises Estatísticas

Para as análises de hidroxiprolina, WB, ELISA e zimografia, os dados dos diferentes grupos foram analisados usando o Teste ANOVA e pós-teste de Tukey ($p < 0.05$). Para as análises de birrefringência, foi utilizado o Teste de Mann-Whitney ($p < 0.05$). Os valores foram expressos como média e desvio padrão, e na análise de birrefringência expresso como mediana.

Para todos os testes, foi utilizado o software GraphPad Prism® (Graph-Pad Software, La Jolla, CA, USA), versão 3.0. Para todas as análises foi realizado n=3 de animais.

4. RESULTADOS

A citometria de fluxo mostrou presença dos marcadores CD90 (cerca de 80%), CD105 (100%) e CD34 (em torno de 5%) nas CTMA entre a 6ª e 7ª passagem (Figura 2).

Através da microscopia de fluorescência, observou-se a presença de células tronco provenientes de ratos GFP (CTMA-GFP) na região transeccionada nas amostras de tendões dos grupos CT e CT+MC no 14º dia (Figura 3).

Através das análises por WB, a quantidade de colágeno I (Figura 4) mostrou-se aumentada no grupo MC ($2,39 \pm 2,00$) em relação aos grupos N ($1,40 \pm 0,26$), T ($1,12 \pm 0,0$) e CT ($0,76 \pm 0,8$), assim como ocorreu aumento no grupo CT+MC ($2,0 \pm 0,1$) comparado aos grupos N, T e CT. Por outro lado, observou-se diminuição deste tipo de colágeno no grupo CT comparado ao N. A análise do colágeno III (Figura 4), apresentou aumento somente no grupo MC ($0,60 \pm 0,10$) em relação ao grupo N ($0,05 \pm 0,00$). A quantidade do PCNA da região de transecção (Figura 4) aumentou nos grupos submetidos aos tratamentos CT ($0,66 \pm 0,06$), MC ($1,17 \pm 0,09$) e CT+MC ($0,98 \pm 0,17$) em relação ao grupo N ($0,14 \pm 0,04$). Além disso, houve aumento entre o grupo MC *versus* T ($0,78 \pm 0,01$), e aumento nos grupos MC e CT+MC em relação ao grupo CT. Com relação à quantidade de caspase III (Figura 4), não houve diferença entre os grupos.

Para avaliar as diferenças nas concentrações de colágeno total na MEC da RT dos tendões dos diferentes grupos, foi realizada a dosagem indireta de colágeno, através da quantificação de hidroxiprolina (Figura 5). Maior concentração de hidroxiprolina foi observada no grupo T ($105,1 \pm 20,16$) em comparação aos grupos CT ($67,25 \pm 7,30$), MC ($71,75 \pm 24,32$) e CT+MC ($60,90 \pm 10,18$).

Na zimografia para MMP-2, observou-se bandas correspondentes às isoformas latente (72 kDa), intermediária (68 kDa) e ativa (62 kDa) nos grupos N, T, CT, MC e MC+CT (Figura 6A). A densitometria das bandas (pixels) detectou maiores valores referentes à isoforma ativa nos grupos com tendões transeccionado, T ($40,89 \pm 6,12$), CT ($45,27 \pm 4,71$), MC ($45,02 \pm 2,54$) e CT+MC ($42,57 \pm 4,07$), em relação ao grupo N ($23,63 \pm 5,86$). Não houve diferença entre os grupos com relação às isoformas latente e intermediária (Figura 6B). Com relação a MMP-9, foram observadas às isoformas latente (92 kDa) e ativa (83 kDa) apenas no grupo N (Figura 6A).

Na análise por ELISA, considerando as citocinas IL-10 e TNF- α (Figura 7), as amostras de tendões dos grupos MC ($4572 \pm 278,7$) e CT+MC ($3997 \pm 522,0$) apresentaram níveis de IL-10 significativamente mais elevados, quando comparado ao N ($3022 \pm 559,5$), assim como

um aumento no grupo MC em relação ao T ($3162 \pm 134,9$). Na quantificação de $\text{TNF-}\alpha$ foi possível observar concentrações mais elevadas nos grupos CT ($2687 \pm 220,5$), MC ($3235 \pm 147,3$) e CT+MC ($2869 \pm 64,29$) em relação ao grupo N ($2222 \pm 45,83$), assim como nos grupos MC e CT+MC em comparação ao grupo T ($2255 \pm 136,0$). Também foi observado aumento nos grupos MC e CT+MC em relação ao CT.

Nos cortes histológicos corados com HE, não foram observadas diferenças marcantes entre os grupos com tendões transeccionados (Figura 8). Alta celularidade foi mostrada na RT dos grupos T, CT, MC e CT+MC em comparação ao grupo N, com presença de MEC desorganizada evidenciada pela fraca coloração pela eosina.

Nos cortes corados com AT (Figura 9) foi evidenciada maior quantidade de PGs nos grupos CT, MC e CT+MC quando comparado ao grupo N, devido a maior intensidade de coloração da matriz, porém sem diferenças expressivas entre os grupos tratados e o grupo T.

Na análise de imagens da RT de tendões submetidos à microscopia de polarização (Figura 10A), brilho mais intenso indicando maior birrefringência foi observado no grupo MC em relação aos grupos T, CT+MC e CT. Com relação às medidas de birrefringência (Figura 10F), maiores valores foram detectados no grupo MC ($39,25 \pm 11,42$), seguido pelos grupos CT+MC ($35,42 \pm 13,48$), CT ($21,62 \pm 8,18$) e T ($18,21 \pm 5,62$), respectivamente. O histograma mostra a frequência de distribuição dos valores de birrefringência nos diferentes grupos (Figura 10G).

FIGURAS

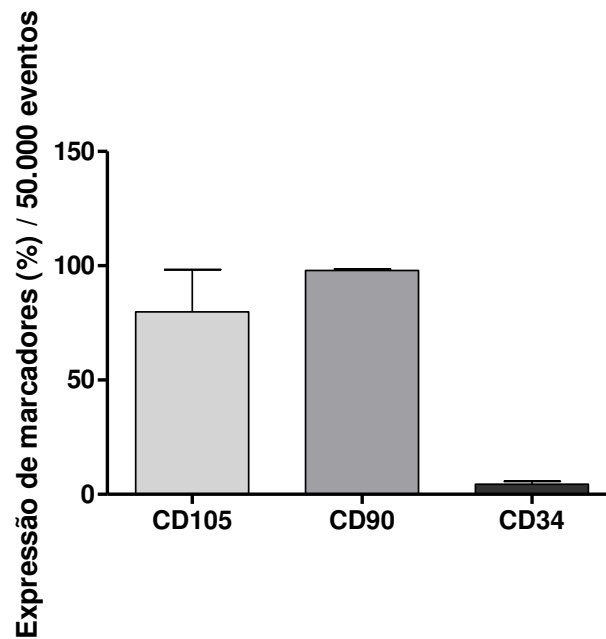


Figura 2: Citometria de fluxo para identificação dos marcadores de superfície celular típicos de CTMA: CD 105, CD 90. Note a alta porcentagem de marcação positiva para CD90, CD105 e baixa de CD34.

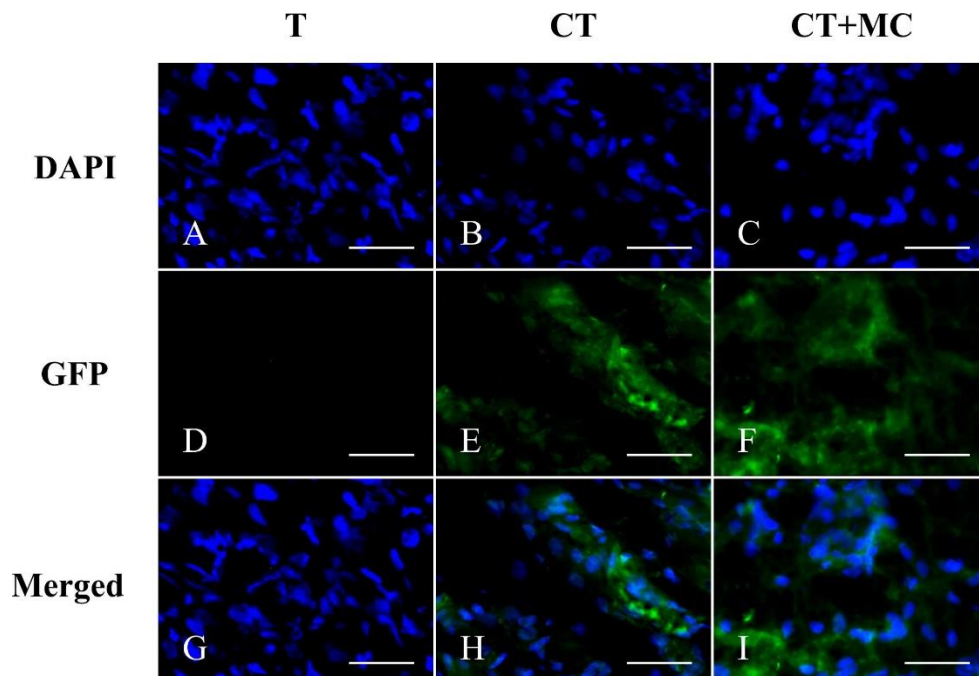


Figura 3: Microscopia de fluorescência para identificação das CTMA-GFP na região de transecção do tendão calcâneo dos grupos: T (A, D, G), CT (B, E, H) e CT+MC (C, F, I). Observe presença de CTMA-GFP nos grupos, CT (E) e CT+MC (F). DAPI: marcação núcleo. Barra = 50 μ m.

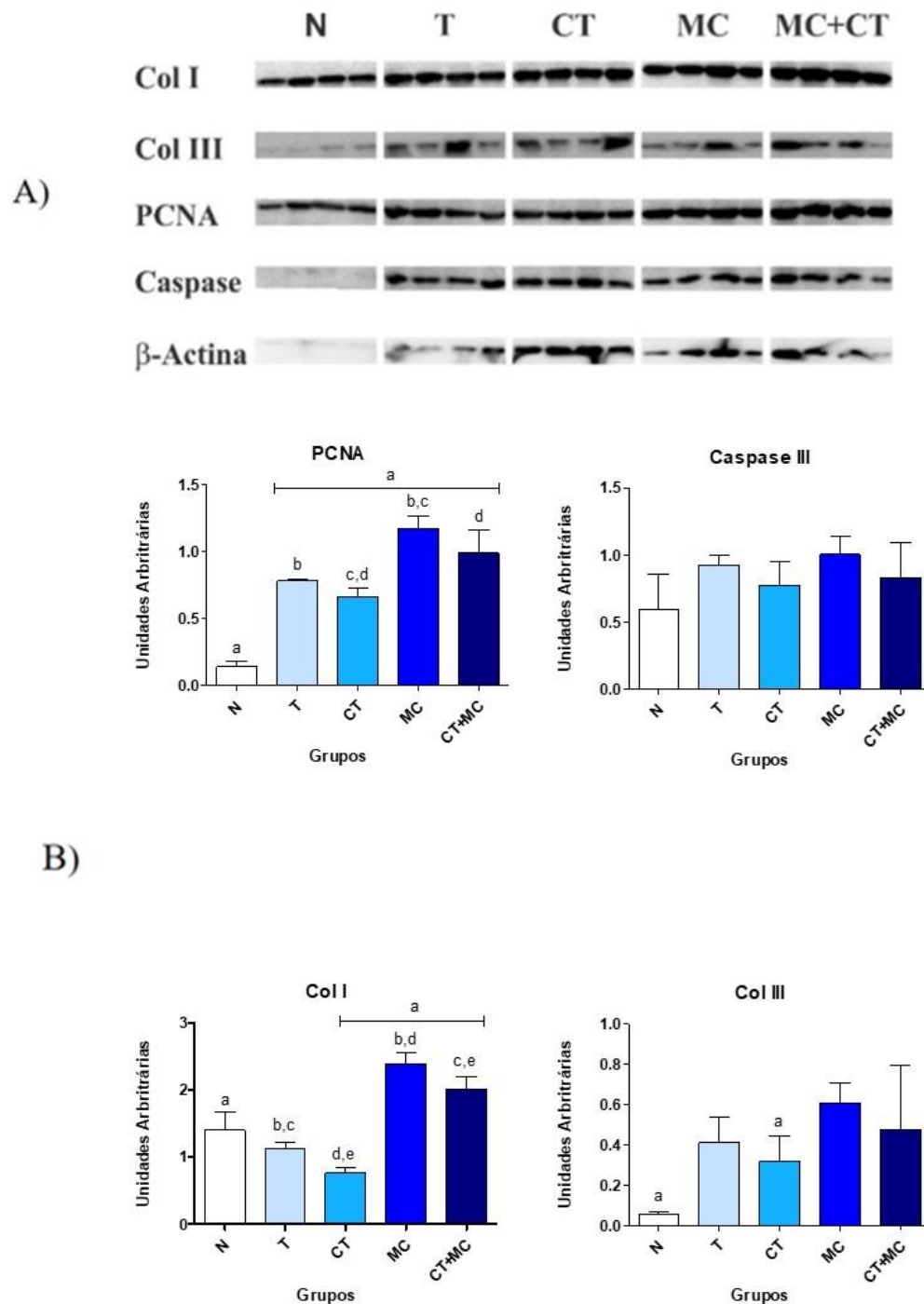


Figura 4: **A)** WB para colágeno I, colágeno III, PCNA e caspase III. β - Actina utilizada como controle endógeno. **B)** Densitometria referente à quantidade proteica de colágeno I: Note maiores valores para os grupos MC e CT+MC em relação aos grupos T e CT; Colágeno III: diferença significativa apenas no grupo N *versus* MC. PCNA: note maior valor no grupo MC em relação ao T e CT, assim como maior valor no grupo CT+MC em relação ao CT. Caspase III: não houve diferença entre os grupos. Letras iguais indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

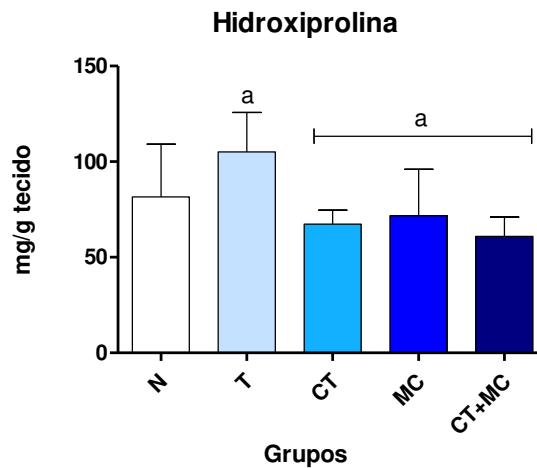
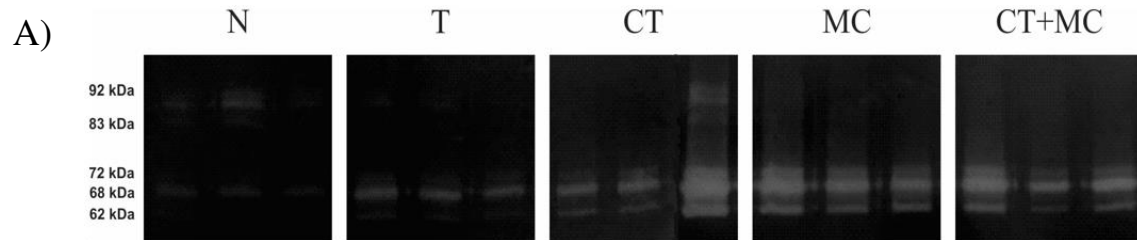


Figura 5: Concentração de hidroxiprolina (mg/g de tecido) da região de transecção dos tendões: observe maior valor no grupo T em relação aos grupos CT, MC e CT+MC ($p < 0,05$).



B)

Parâmetros	N	T	CT	MC	CT+MC
MMP-2 latente (72 kDa)	31.53 ± 4.66	35.27 ± 5.72	36.32 ± 9.92	41,93 ± 1.36	43.67 ± 2.27
MMP-2 intermediária (68 kDa)	41.42 ± 6.21	45.99 ± 2.16	47.35 ± 6.74	46,54 ± 1.93	47.56 ± 2.25
MMP-2 ativa (62 kDa)	23.62 ± 5.86*	40.89 ± 6.12*	45.26 ± 4.71*	45.02 ± 2.54*	42.57 ± 4.07*

*Diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tendões transeccionado em relação aos normais.

Figura 6: **A)** Zimografia para MMP-2 para a análise das isoformas latente, intermediária e ativa. **B)** Densitometria de bandas (pixels): nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos para as isoformas latente e intermediária. Observe maiores valores referentes à isoforma ativa nos grupos CT, MC, CT+MC e T em comparação ao grupo N.

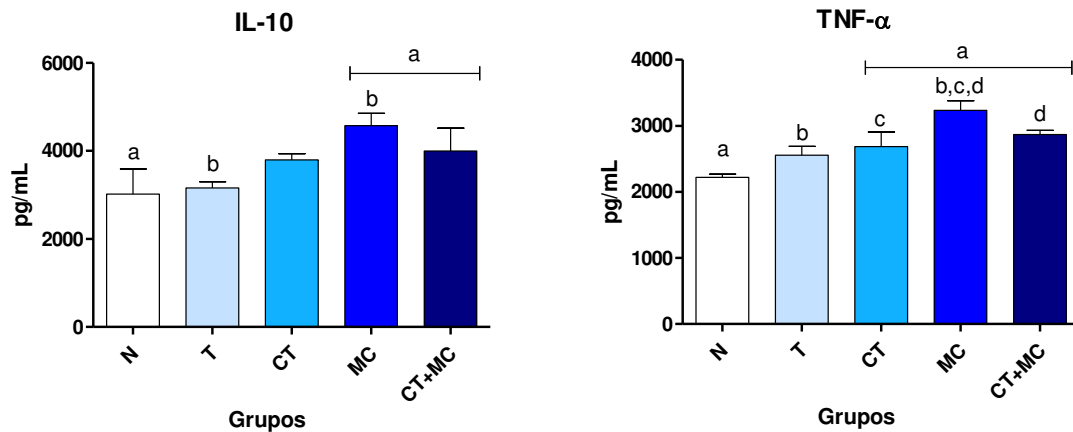


Figura 7: ELISA para quantificação de IL-10 e TNF- α (pg/mL). Observe diferença significativa nos níveis de IL-10 entre o grupo MC e T. TNF- α : note maior concentração no grupo MC em relação aos grupos T, CT e CT+MC. Letras iguais indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

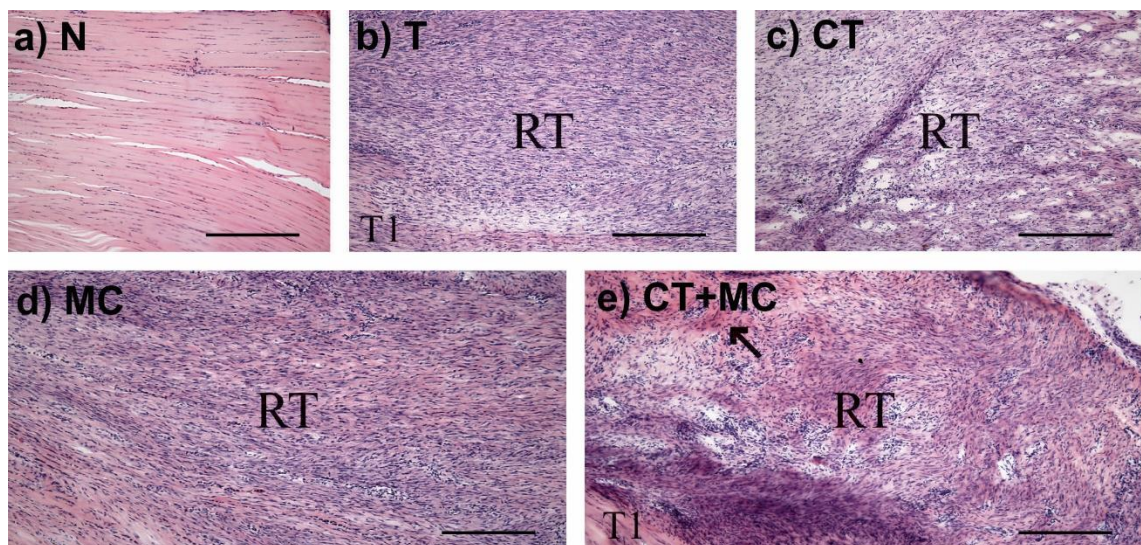


Figura 8: Cortes longitudinais de tendões corados com HE. Os tendões transeccionados de todos os grupos apresentaram alta celularidade e desorganização da MEC em comparação ao N. Note no grupo CT+MC ($\rightarrow$) matriz mais corada. Nos grupos com o tendão transeccionado, a distribuição de colágeno no tecido não é homogênea, dessa forma, na mesma imagem é possível observar regiões com diferentes colorações. No grupo N os feixes de colágeno estão orientados em apenas uma direção, com presença de fibroblastos dispostos entre a matriz densa e organizada evidenciada pela forte coloração da eosina. Barra = 200 μ m.

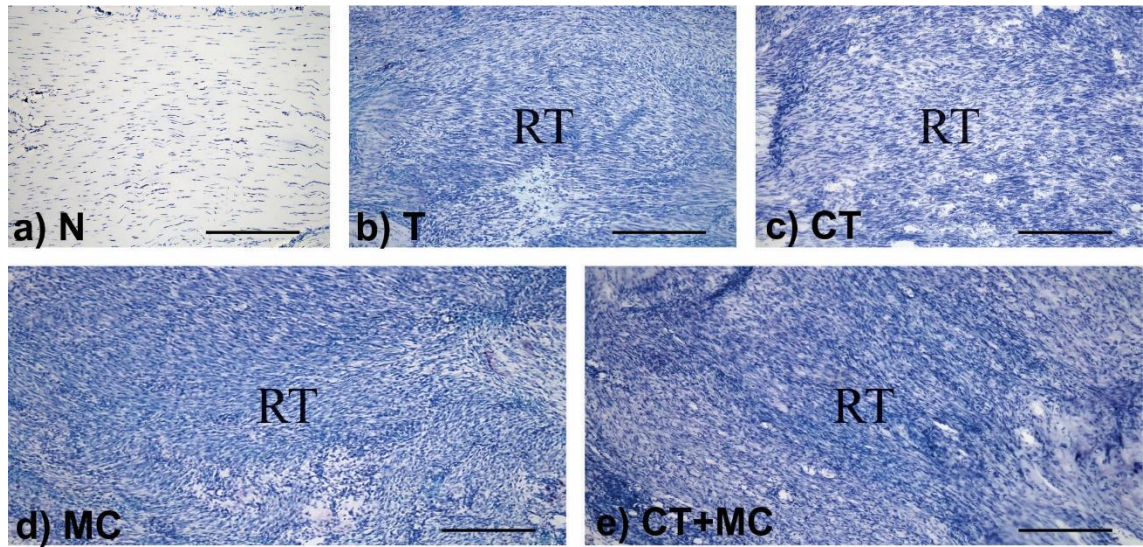


Figura 9: Cortes longitudinais de tendões corados com AT. Note maior intensidade de coloração na MEC nos grupos transeccionados em relação ao N, porém sem diferença marcante entre os tratamentos e o grupo T. Barra = 200 μ m.

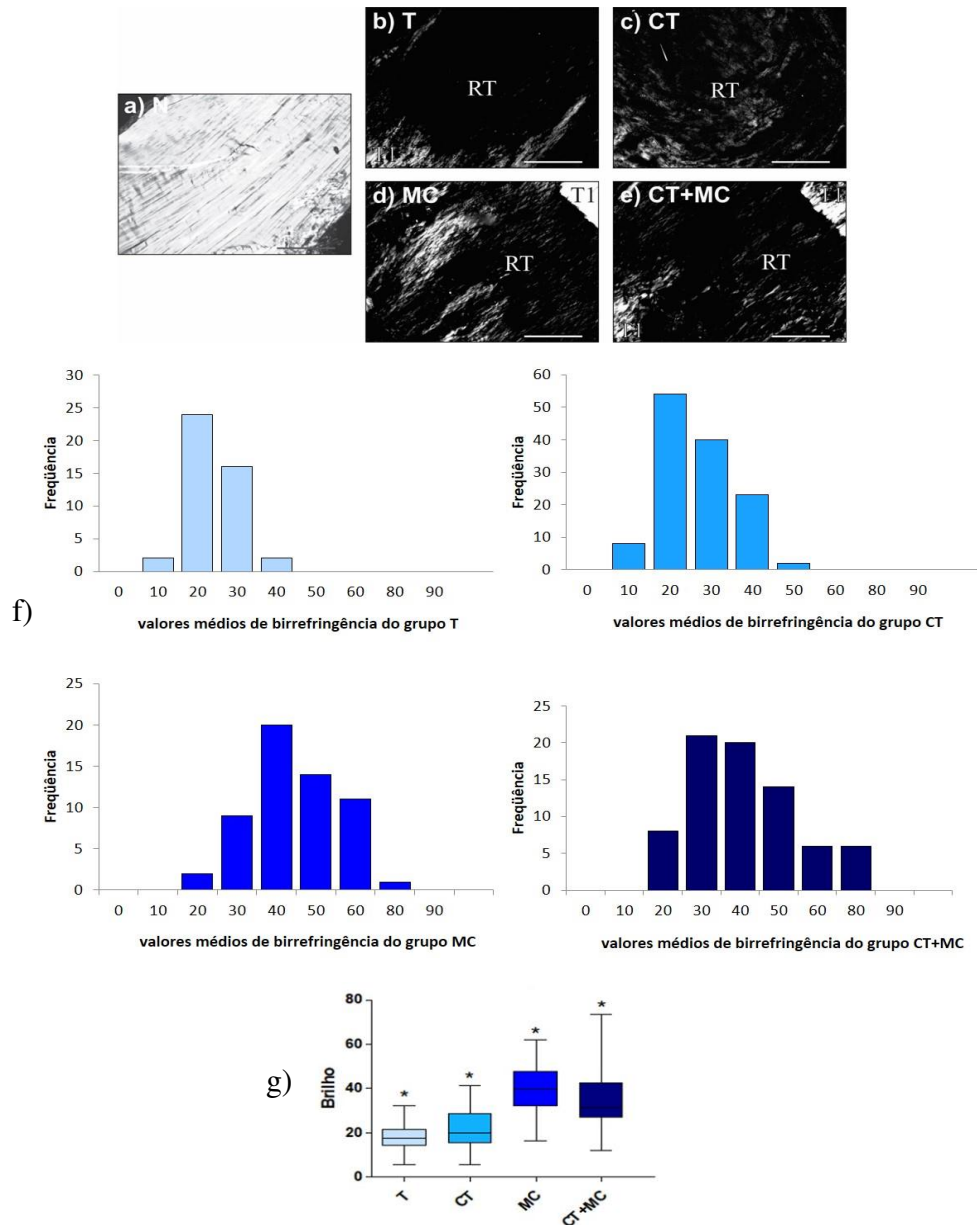


Figura 10: Imagens da região de transecção (RT) de tendões submetidos à microscopia de polarização. Note maior birrefringência representada pelo forte brilho das fibras de colágeno no grupo MC (d). Nos grupos CT (c) e CT+MC (e) observa-se birrefringência menos intensa em comparação ao grupo MC. O grupo T (b) apresenta uma área mais escura em função de uma completa desorganização das fibras de colágeno. O grupo N (a) mostrou intensa birrefringência devido à alta agregação e organização de feixes de colágeno na região proximal. T1: região adjacente à RT onde há um imbrincamento das fibras de colágeno. Barra= 200 μm . f) Histograma: observe a frequência de distribuição dos valores de birrefringência de cada grupo. Todos os grupos com tendões transecionados apresentaram valores < 50 megapixels, mas apenas os grupos MC e CT+MC apresentaram valores > 50 megapixels. g) Medidas de birrefringência (pixels) referente à organização dos feixes de colágeno na região de transecção do tendão dos diferentes grupos. O grupo MC apresentou maior organização das fibras de colágeno, seguido dos grupos CT+MC e CT. * Diferença significativa de cada grupo em relação aos demais ($p < 0.05$).

5. DISCUSSÃO

Na terapia celular utilizando-se CTM, a maior parte das células é perdida 24 h após a sua aplicação, pois há indícios que essas células possuem uma baixa capacidade de permanência no tecido onde foram liberadas (VON BAHR et al., 2012). Estudo de Hui et al. (2009) mostrou que após 24 h, 18% das células retidas no coração estavam mortas, e apenas 40% das células-tronco transplantadas no miocárdio ficaram retidas no coração. Estudo realizado pelo nosso grupo mostrou que a capacidade de permanência das CTMA foi em média de 40% e com viabilidade em torno de 85.3% no momento da aplicação (manuscrito submetido à publicação). No presente estudo, foi possível mostrar a migração das CTMA-GFP para o interior da região lesionada, mostrando a incorporação e a permanência das CTMA na RT no 14º dia após a lesão. Devido às diferenças na reorganização da MEC dos tendões observadas no presente estudo, constatamos que tanto as CTMA isoladas, assim quando associadas à auxiliam no processo de reparo dos tendões.

A cicatrização de tendões ocorre em diferentes fases caracterizadas pela predominância de diversos eventos celulares, os quais visam a recuperação da composição molecular e estrutura da MEC. O remodelamento da MEC permanece aumentado após algumas semanas da lesão, sendo caracterizado por uma diminuição da celularidade e da produção da matriz, uma vez que ocorre a substituição do colágeno tipo III pelo colágeno tipo I, tornando o tecido mais fibroso (DOCHEVA et al., 2015). Logo após a lesão, concomitante com outros eventos das fases inflamatória e proliferativa, inicia-se o processo de remodelamento da MEC. De modo que, na fase inflamatória encontra-se aumentada a síntese de colágeno tipo III, e de acordo com estudos realizados pelo nosso grupo (Tomiosso et al., 2009; Almeida et al., 2012; e Aro et al, 2012) são observados ainda na região lesionada de tal fase, aumento da concentração de GAGs e PNCs. Na fase subsequente, proliferativa com pico no 14º dia, ocorre a migração e proliferação de fibroblastos no sítio da lesão, bem como a síntese de outros componentes da MEC.

No presente estudo foi analisada a fase proliferativa, a qual inicia por volta do 3º dia após o trauma e perdura por 2 a 3 semanas, sendo o marco inicial da formação da cicatriz. Com a evolução do processo, a MEC passa por modificações em sua composição, ocorrendo migração e ativação de macrófagos e fibroblastos para a região lesionada, somada à presença de vasos neoformados, permitindo que os componentes da nova matriz passem a ser intensamente produzidos principalmente por estas células (BALBINO et al., 2005). Os fibroblastos dos tecidos vizinhos são ativados pelo PDGF e migram para o local da lesão. Em

seguida, o fator de crescimento transformante β -1 e-3 (TGF- β) é liberado estimulando essas células a produzirem colágeno tipo I (BROUGHTON et al., 2006; CAMPOS et al., 2007; PRYCE et al., 2009) durante o reparo tendíneo. Outros componentes de MEC também são sintetizados pelos fibroblastos, tais como os PGs, MMPs, proteínas não colagênicas, entre outros componentes (DIEGELMANN, 1997; HARTLAPP et al., 2001).

Considerando os efeitos da microcorrente no estímulo à síntese de colágeno, Nessler e Mass (1987) avaliaram o efeito da microcorrente no tendão de coelhos cirurgicamente lesionados. Os animais foram estimulados com 7 μ A de corrente, enquanto que os animais controles não foram estimulados. Foi demonstrado o aumento de 255% da taxa de hidroxiprolina depois de sete dias de estimulação, em referência ao grupo controle. Alvarez et al. (1983) verificaram que após a aplicação da microcorrente (300 μ A decaindo para 50 μ A após 24 horas) na cicatrização da pele de porcos, houve uma diferença estatisticamente significativa na produção de colágeno no 5º, 6º e 7º dias de tratamento, assim como o aumento dos níveis de hidroxiprolina e no número de fibroblastos. Nossos dados não corroboram com os estudos anteriormente citados, uma vez que houve diminuição da concentração de colágeno total nos grupos tratados com a microcorrente isolada ou associada às CTMA, em relação ao controle. É importante ressaltar que os parâmetros experimentais (tempo de aplicação, intensidade da microcorrente e modelo experimental) se distinguem em cada trabalho analisado. No presente estudo, foi utilizada intensidade de corrente de 10 μ A, por durante 4 minutos, com inversão dos eletrodos após um período de 2 minutos. Deve-se considerar também que a maior concentração de hidroxiprolina no grupo T, o qual apresentou menor quantidade de colágeno I, pode ser proveniente tanto de colágeno íntegro como degradado, considerando que este grupo apresentou, também, menor organização das fibras de colágeno.

Com relação à quantidade de colágeno do tipo I, nossos dados mostraram aumento no grupo tratado com microcorrente, assim como no grupo tratado com microcorrente e CTMA, corroborando com dados da literatura. Estudo realizado por Goldman e Pollack (1996) em estudos *in vitro* observaram que a aplicação de correntes elétricas estimula a proliferação de fibroblastos e a síntese de colágeno. Cruz e Bonvent (2008) utilizaram em seu estudo a corrente microamperada, com intensidade de 300 μ A com inversão de polaridade a cada 3 segundos na cicatrização de ratos. No grupo submetido ao tratamento, a cicatrização ocorreu mais rapidamente concomitante com o aumento do colágeno do tipo I em relação ao controle, demonstrando que a microcorrente é um recurso eficaz no processo de reparo.

Estudos tem demonstrado também que a utilização da terapia celular é uma alternativa promissora para o tratamento de lesões, tal como a utilização de equipamentos de microcorrente na busca de acelerar o reparo tecidual. Segundo Kim e colaboradores (2011), em seu estudo utilizando 30 μ L de CTMA injetadas subcutaneamente na pele dorsal de ratos, após duas semanas da aplicação, verificaram aumento da expressão do pró-colágeno tipo I. Outro estudo realizado por Uysal et al. (2012), utilizando CTMA aplicadas sobre a lesão do tendão calcâneo de coelhos, visto que a resistência à tração foi medida na 4ª semana, mostrou auxiliar no processo cicatricial do tendão, assim como aumentar a quantidade de colágeno tipo I. Nixon et al. (2008) estudaram equinos com tendinite induzida por collagenase, tratados com a fração vascular estromal do tecido adiposo, cuja eutanásia ocorreu na 6ª semana, observaram que houve uma melhora na organização tecidual, incluindo o alinhamento das fibras de colágeno dos tipos I e III, quando comparado ao grupo controle. Carvalho et al. (2016) estudaram o efeito do tratamento das CTMA na tendinite do TFDS de equinos até 3 semanas após a cirurgia. Observou-se redução da inflamação, bem como melhora na organização das fibras colágenas e aumento na expressão do colágeno do tipo I.

Observou-se, em nosso estudo, que aplicação de microcorrente, bem como, a presença das CTMA, estimularam a síntese de colágeno I. As análises realizadas no microscópio de polarização, mostraram que o intenso brilho de birrefringência encontrado no grupo MC, seguido dos grupos CT+MC e CT, refletem a maior organização dos feixes de colágeno nesses grupos. Dessa forma, a aplicação de microcorrente resulta no aumento da quantidade de colágeno I, assim como na maior reorganização dos feixes de colágeno. Considerando que o colágeno é o principal componente dos tendões e fornece integridade, tração, força e funcionalidade para tendões, sua síntese, secreção e organização desempenham papel fundamental no processo de reparo de tendões lesionados (CHITHRA et al., 1998; WANG et al., 2012).

A quantificação da citocina TNF- α mostrou níveis aumentados no grupo MC em relação aos demais. No entanto, no grupo com associação dos tratamentos, CT+MC, houve diminuição em relação ao grupo MC. Corroborando com esse resultado, o estudo de Kloth et al. (1996) mostra que a estimulação elétrica tem participação no aumento da síntese de mediadores imunológicos no reparo tecidual. Os eventos da angiogênese são regulados por meio de fatores de crescimento, entre eles o TNF- α , uma citocina pró-inflamatória, que possui importantes funções, tais como a indução de outras citocinas e mediadores lipídicos da inflamação, de proliferação, diferenciação celular e apoptose. Além disso, o TNF- α atua na fase inflamatória amplificando a quimiotaxia de neutrófilos e estimulação de macrófagos. Logo, o TNF- α

desempenha um papel fundamental não apenas na resposta inflamatória, mas também, na fase subsequente dos processos de reparo de tecidos lesionados (ULLOA e TRACEY, 2005; RAJA et al., 2007). A ligação do TNF- α aos receptores de superfície celular envolve múltiplos caminhos de transdução de sinal, de modo que a interação funcional entre essas vias de sinalização pode determinar o resultado fisiológico de suas respostas biológicas. As principais vias ativadas pelo TNF- α incluem caspases, fator nuclear Kappa β (NF-K β) e proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAP quinases) (JANES et al., 2006).

O TNF- α pode exercer seus efeitos pela interação com dois subtipos de receptores, TNFR1 (p55 ou CD120a) e o TNFR2 (p75 ou CD120b). O TNFR1, expresso em todas as células, com exceção dos eritrócitos, interage com o TNF- α na forma solúvel. O TNFR2, que é geralmente induzido e preferencialmente expresso em células endoteliais e em células hematopoéticas, interage com o TNF- α associado à membrana. Dessa forma, a interação do TNF- α com o seu receptor pode levar, alternativamente, à ativação de NF-K β , que controla a expressão de genes de mediadores inflamatórios, ou à ativação de uma via de caspases, causando apoptose (MACEWAN 2002). A sinalização via TNFR1 pode levar à proliferação celular ou a apoptose, enquanto a sinalização via TNFR2, não leva diretamente a apoptose, mas pode cooperar com o TNFR1 para induzi-la (WARZOCHA et al., 1995; GUPTA, 2002; TRACEY et al., 2008). De maneira geral, postula-se que o TNFR1 está associado com funções citotóxicas e pró-inflamatórias, causando injúria tecidual, enquanto o TNFR2 promove a ativação, migração e proliferação celular, atuando no reparo tecidual e angiogênese (AGGARWAL 2003; BRADLEY, 2008).

Portanto, os resultados obtidos pela quantificação de TNF- α corroboram com a quantificação de PCNA e caspase III, em que foi observado aumento de TNF- α e de PCNA após o tratamento com microcorrente. Tal resultado sugere a atuação do TNF- α pela via de sinalização que leva a proliferação celular, e não de morte celular, uma vez que não houve diferença na quantidade de caspase III após os diferentes tratamentos.

Considerando que a microcorrente estimula a proliferação de fibroblastos com consequente aceleração do processo de reparo (BAYAT et al, 2006; GASPI et al., 2011; SUGIMOTO, 2012; YU et al., 2014), esse recurso terapêutico tem sido investigado para otimizar processos de cicatrização. Conforme citado anteriormente, foi observado aumento da quantidade de PCNA nos grupos tratados com a microcorrente. Dentre as funções desempenhadas por essa proteína, também é conhecida sua atuação na maquinaria de replicação de DNA, tendo sido utilizada como um parâmetro da atividade proliferativa (WITKO-SARSAT, et al., 2010). Estudos realizados por Silva et al. (2007) demonstraram que a aplicação

de microcorrente proporciona efeitos positivo no processo cicatricial, pelo aumento do metabolismo, da proliferação e da maturação celular. Cheng e Goldman (1998) e Kloth (2005) observaram que as células expostas a campos elétricos apresentam variações na taxa de proliferação e metabolismo celular. Outros estudos demonstram ainda, que a aplicação da microcorrente no tecido induz a proliferação celular, assim como a síntese de proteínas, já que esses processos tornam-se aumentados quando aplicados estímulos elétricos às células constituintes da pele, tendões, cartilagem e ossos (LEFFMAN et al., 1994; CHENG e GOLDMAN, 1998). No presente estudo, vale ressaltar a possível atuação da via de sinalização através do TNF- α na proliferação celular, evidenciada pelo aumento da quantidade de PCNA, o que pode ter levado ao aumento da quantidade de colágeno I sintetizado por um maior número de fibroblastos no grupo tratado com a microcorrente.

Estudo analisando a regeneração hepática após uma hepatectomia parcial em ratos utilizando CTMA mostraram, com base no parâmetro da expressão de PCNA na proliferação do fígado, que a regeneração foi favorecida pelo transplante de CTMA (LIU, et al., 2016). Outra pesquisa realizada por Omar e Aboulkhair (2017) comparando os efeitos da aplicação endovenosa das CTMA, assim como das células mesenquimais derivadas da medula óssea (CTMO), na diabetes tipo I induzida em ratos albinos, os grupos tratados com CTMA apresentaram aumento na quantidade de PCNA, o que levou à maior proliferação celular das ilhotas pancreáticas e ácinos, em comparação aos grupos tratados com as CTMO. O mesmo resultado para PCNA e colágeno I foi observado para o grupo CT+MC em comparação ao grupo CT, mostrando sinergismo entre os tratamentos com efeitos no aumento dessas duas proteínas.

Maior concentração de IL-10 foi observada no grupo tratado com a microcorrente, sugerindo potencial anti-inflamatório dessa terapia. Estudos mostram que a microcorrente proporciona efeito anti-inflamatório, além de atuar no controle da dor, do edema e na cicatrização de feridas (GUIRRO e GUIRRO, 2002; KLOTH, 2005). McMakin et al. (2005) utilizando microcorrente em pacientes com fibromialgia mostraram que o tratamento atuou na redução da inflamação, bem como na diminuição da dor e dos sintomas da fibromialgia. Estudo realizado por Freitas et al. (2013) mostrou que estimulação elétrica no tratamento de queimaduras teve efeitos positivos sobre a aceleração do processo cicatricial atuando na diminuição da inflamação. Santos et al. (2004) também utilizando microcorrente no tratamento de queimaduras em ratos observaram efeitos benéficos relacionados ao processo cicatricial, como redução da inflamação e aumento do número de vasos sanguíneos e fibroblastos.

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória, a qual está envolvida no remodelamento tecidual. É produzida por uma variedade de tipos celulares, incluindo células T, monócitos e

macrófagos. Na pele, os queratinócitos também demonstraram ser capazes de produzir IL-10 após lesão (AN et al., 2010). Na regulação do reparo tecidual, a via de sinalização da IL-10 ocorre por meio da sua dimerização para se ligar a um complexo receptor de tetrâmero que compreende duas moléculas de IL-10R1 e duas moléculas de IL-10R2, permitindo dessa forma, após a interação IL-10 – receptor, a fosforilação e dimerização da JAK/STAT3, a qual é translocada para o núcleo ativando os genes alvo 3HA sintases (HAS1, HAS2 e HAS3), isoenzimas que possuem atividade glicosiltransferase, e que estão envolvidas na síntese do AH (VIGETTI et al., 2009; ZHANG et al., 2013). Estudo realizado por Balaji et al. (2015) relataram uma nova descoberta de que a IL-10 desencadeia um transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 (STAT3), uma via de sinalização dependente que regula o metabolismo do HA, e conduz fibroblastos adultos a sintetizar uma matriz rica em AH.

Vários estudos mostram os efeitos benéficos do AH na cicatrização de diversos tendões de diferentes modelos animais, devido à redução da formação da cicatriz, tecido de granulação e evita as aderências após o reparo do tendão (TATARI et al., 2004; JONES e FLANNERY, 2007; LIU et al., 2008; KOLODZINSKYI et al., 2013) contribuindo com a melhora na cicatrização do tecido. Logo, além dos seus efeitos anti-inflamatórios, a IL-10 possui relevante atividade na síntese de diferentes componentes da MEC. O estudo de Behrendt et al. (2017) mostra a atuação da IL-10 no aumento da quantidade de GAG em cartilagens bovinas submetidas a uma lesão axial e tratadas com diferentes doses de IL-10. No presente estudo, a microcorrente aumentou os níveis de IL-10 no 14º dia, fase em que o processo inflamatório está diminuído, sugerindo sua participação no remodelamento da MEC por meio de estímulos para a produção de componentes relacionados à reorganização da matriz, o que corrobora com a maior organização das fibras de colágeno neste grupo.

Durante o reparo tendíneo, as MMPs apresentam papel importante no remodelamento da MEC. A MMP-2 participa da degradação de vários componentes da MEC, incluindo colágenos fibrilares e não fibrilares, laminina, agrecan e vitronectina durante o remodelamento tecidual (AIMES e QUIGLEY, 1995; WOESSNER e NAGASE, 2000; MCCAWLEY e MATRISIAN, 2001). De acordo com Jung et al. (2009), a MMP-2 juntamente com outras MMPs e seus TIMPs, participam do crescimento lateral das fibrilas de colágeno durante o desenvolvimento do tendão, além disso, atuam removendo pequenos PGs e colágenos associados a fibrilas, permitindo a associação adjacente das fibrilas e o crescimento das fibras. Estudos anteriores do nosso grupo relacionaram a presença de MMP-2 ativa com maior remodelamento da MEC durante a cicatrização dos tendões (ARO et al., 2012; VIEIRA et al., 2012). Entretanto, não observamos diferenças na atividade da MMP-2 nos grupos com maior

organização das fibras de colágeno, sugerindo a participação de outras MMPs importantes no remodelamento da matriz em tais grupos. O tendão lesionado é caracterizado por um aumento de collagenases, tais como a MMP-1, que degrada principalmente colágeno tipo III, e MMP-13, a qual degrada principalmente colágenos do tipo II, além dos tipos I e III (KNAUPER et al., 1997; FU et al., 2013). Riley (2008) também mostrou aumento da expressão de MMP-13 em rupturas de tendões de ratos. As MMPs podem mediar as mudanças ocorridas na composição da MEC durante a lesão assim como no reparo, embora os processos celulares e moleculares ainda não estejam bem elucidados. A lisil-oxidase, outra enzima que também atua no reparo tendíneo, possui grande importância em tal período de reorganização da MEC, já que media a formação de ligações cruzadas entre as fibras de colágeno (KAGAN e LI, 2003), contribuindo para a reestruturação da matriz.

6. CONCLUSÃO

6.1 Conclusão Geral

Em conclusão, o tratamento de lesões tendíneas com microcorrente e microcorrente associada a CTMA é mais efetivo comparado ao tratamento com CTMA isoladas.

6.2 Conclusão Específica

1. As CTMA permaneceram na região de transecção 14 dias após a lesão;
2. O tratamento com microcorrente em tendão parcialmente lesionado induziu a melhora na organização estrutural das fibras de colágeno e aumento na quantidade de colágeno tipo I. Quando ocorre associação da microcorrente com CTMA, o resultado é bom, mas menos pronunciado quando comparado a aplicação isolada da microcorrente.
3. A associação de CTMA e microcorrente aumentou a quantidade de PCNA e colágeno tipo I quando comparado ao grupo tratado somente com CTMA;
4. O tratamento com microcorrente aumentou os níveis de IL-10 e TNF- α ;
5. Não houve diferença na quantidade de MMP2 nos grupos submetidos aos diferentes tratamentos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K. et al. **Imunologia celular e molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2008.
- AGGARWAL, B. B. Signalling pathways of the TNF superfamily a doubleedged sword. **Nat Rev.**, v. 3, p. 745-755, 2003.
- AHMED, A.F.; ELGAYED, S.S.A.; IBRAHIM, I. M. Polarity effect of microcurrent electrical stimulation on tendon healing: biomechanical and histopathological studies. **J. Advanced Research**, n. 3, p. 109-117, 2002.
- AIMES, R.T.; QUIGLEY, J.P. Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments. **J Biol Chem.**, v. 270, p. 5872-5876, 1995.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Biologia Molecular da célula**- 3a ed. Artes Medicas, cap.24, 1997.
- ALMEIDA, M.S.; ARO, A.A.; GUERRA, F.D.R.; VIEIRA, C.P.; VIDAL, B.C.; PIMENTEL, E.R. Electroacupuncture Increases the Concentration and Organization of Collagen in a Tendon Healing Model in Rats. **Connective Tissue Research**, v. 53, p. 542-547, 2012.
- ALVAREZ, O. M. et al. The healing of superficial skin wounds is stimulated by external electrical current. **J. Invest Dermatol**, v. 81, n. 2, p. 144-148, 1983.
- AN, L.; DONG, G.Q.; GAO, Q. et al. Effects of UVA on TNF-alpha, IL-1beta, and IL-10 expression levels in human keratinocytes and intervention studies with an antioxidant and a JNK inhibitor. **Photodermatol Photoimmunol Photomed**, p. 26-28, 2010.
- ARO, A.A.; NISHAN, U.; PEREZ, M.O.; RODRIGUES, R.A.; FOGLIO, M.A.; CARVALHO, J.E.; GOMES, J.E.; VIDAL, B.C.; PIMENTEL, E.R. Structural and biochemical alterations during the healing process of tendons treated with Aloe vera. **Life Sciences**, v. 91, p. 885-893, 2012.
- ARO, A.A.; SIMÕES, G.F.; ESQUISATTO, M.A.M.; FOGLIO, M.A.; CARVALHO, J.E.; OLIVEIRA, A.L.R.; GOMES, L.; PIMENTEL, E.R. Arrabidaea chica extract improves gait recovery and changes collagen content during healing of the Achilles tendon of rats. **Injury**, v. 44, p. 884-892, 2013.
- ARRUDA, E.R.B.; RODRIGUES, N.C.; TACIRO, C.; PARIZOTTO, N.A. Influência de diferentes comprimentos de onda da laserterapia de baixa intensidade na regeneração tendínea do rato após tenotomia. **Rev Bras Fisioter.**, v.11, n. 4, p. 283-288, 2007.
- BALAJI S., KING A., MARSH E., LESANT M., BHATTACHARYA S. S., HAN N., DHAMIJA Y., RANJAN R., LE L. D., BOLLYKY P. L., CROMBLEHOLME T. M., KESWANI S. G. The role of interleukin-10 and hyaluronan in murine fetal fibroblast function *in vitro*: implications for recapitulating fetal regenerative wound healing. **PLoS One**, v.10, n.5, e0124302, 2015.
- BALBINO, C.A.; PEREIRA, L.M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 4, n. 1, p. 27-51, 2005.
- BARRY, N.M.; MCGUIRE, J.L. Overuse Syndromes in adult athletes. **Musculoskeletal Medicine**, v. 22, p. 515-529, 1996.

- BAUM, C.L.; ARPEY, C.J. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. **Dermatologic Surgery**, v. 31, p. 674-686, 2005.
- BAYAT, M.; ASGARI-MOGHADAM, Z.; MAROUFI, M.; REZAIE, F.S.; RAKHSHAN, M. Experimental wound healing using microamperage electrical stimulation in rabbits. **J. of Rehabilitation Research Development**, v. 43, n. 2, p. 219-226, 2006.
- BEHRENDT, P.; FELDHEIM, M.; PREUSSE-PRANGE, A.; WEITKAMP, J.T.; HAAKE, M.; EGLIN, D.; ROLAUFFS, B.; FAY, J.; SEEKAMP, A.; GRODZINSKY, A.J.; KURZ, B. Chondrogenic potential of IL-10 in mechanically injured cartilage and cellularized collagen ACI grafts. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 26, n. 2, p. 264-265, 2017.
- BENEVIDES, G.P.; PIMENTEL, E.R.; TOYAMA, M.H.; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S.; GOMES, L. Biochemical and biomechanical analysis of tendons of caged and penned chickens. **Connect. Tissue Res.**, v.45, 206-215, 2004.
- BENJAMIN, M.; KAISER, E.; MILZ, S. Structure–function relationships in tendons: a review. **J. Anat.**, v. 212, p. 211-228, 2008.
- BERTOLINI, F.; LOHSIRIWAT, V.; PETIT, J.Y.; KOLONIN, M.G. Adipose tissue cells, lipotransfer and cancer: A challenge for scientists, oncologists and surgeons. **Biochim Biophys Acta**, v. 1826, p. 209–214, 2012.
- BORGES, F. S. **Modalidades Terapêuticas nas Disfunções Estéticas**. São Paulo: Editora Phorte, 2006.
- BRADLEY, J. TNF-mediated inflammatory disease. **J Pathol.**, v. 214, n. 2, p.149- 160, 2008.
- BRAMONO, D.S.; RICHMOND, J.C.; WIETZEL, P.P.; et al. Matrix metalloproteinases and their clinical applications in orthopaedics. **Clin Orthop.**, v. 428, p. 272-285, 2004.
- BRIGHTON, C. T. et al. Signal trasnduction in electrically stimulated bone cells. **J Bone Joint Surg Am**, v. 83, n. 10, p. 1514-1523, 2001.
- BROUGHTON, G.; JANIS, J.E.; ATTINGER, C.E. The basic science of wound healing. **Plast Reconstr Surg.**, v. 117, n. 7, p.12-34, 2006.
- CAMPAGNOLI, C.; ROBERTS, A.G.; KUMAR, S.; BENNETT, P.R.; BELLANTUONO, I.; FISK, N.M. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. **Blood**, v. 98, n. 8, p. 2396-2402, 2001.
- CAMPOS, A. C. L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A. K. Cicatrização de feridas. **Arquivo Brasileiro de Cirurgia Digestiva**, v. 20, n. 1, p. 51- 58, 2007.
- CANTY, E.G.; KADLER, K.E. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. **J Cell Sci.**, v. 1, n. 118, p. 1341-1353, 2005.
- CAPLAN, A.I. Mesenchymal stem cells. **J Orthop Res.**, v. 9, p. 641–650, 1991.
- CAPLAN, A.I.; DENNIS, J.E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 98, n. 5, p. 1076–1084, 2006.
- CARLUCCI, A. **Programa de restauração da face com microcorrentes: Atualização em cirurgia plástica**. São Paulo: Robe; 2004.
- CARSWELL, E.A.; OLD, L.J.; KASSEL, R.L.; GREEN, S.; FIORE, N.; WILLIAMSON, B. An endotoxin induced serum factor that cuases necrosis of tumors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 72, n.9, p. 3666–3670, 1975.

- CARVALHO, A.M.; ALVES, A.L.; OLIVEIRA, P.G.; ÁLVAREZ, L.E.; AMORIM, R.L.; HUSSNI, C.A.; DEFFUNE, E. Use of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells for Experimental Tendinitis Therapy in Equines. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 31, p. 26-34, 2016.
- CARVALHO, H.F.; RECCO-PIMENTEL, S.M. **A Célula**, 3a Ed. Editora Manole, 2013.
- CHAKRAVARTI, S. Functions of lumican and fibromodulin: lessons from knockout mice. **J. Glycoconj.**, v. 19, n. 4-5, p. 287-293, 2002.
- CHAN, H.K.; FUNG, D.T.; NG, G.Y. Effects of low-voltage microamperage stimulation on tendon healing in rats. **J Orthop Sports Phys Ther.**, v. 37, n. 7, p. 399- 403, 2007.
- CHENG K. S.; GOLDMAN R. J. Campos elétricos e proliferação em um modelo de ferida cutânea: cinética do ciclo celular. **Bioelectromagnetics**, v. 19, n. 2, p. 68-74, 1998.
- CHENG, N.; VANHOO, F. H.; BOCKX, E. The Effects of Electrical Currents on ATP Generation, Protein Synthesis, and Membrane Transport in Rat Skin. **Clin. Orthop.**, v. 171, p. 264-72, 1989.
- CHITHRA, P.; SAJITHLAL, G.B.; CHANDRAKASAN, G. Influence of Aloe vera on the healing of dermal wounds in diabetic rats. **J Ethnopharmacol**, v. 59, p. 195–201, 1998.
- CLARK, I.A. How TNF was recognized as a key mechanism of disease. **Cytokine and Growth Factor Reviews.**, v. 18, n. 3-4, p. 335–343, 2007.
- CLUTTERBUCK, A.L.; HARRIS, P.; ALLAWAY, D.; et al. Matrix metalloproteinases in inflammatory pathologies of the horse. **The Veterinary Journal**, v. 183, p. 27-38, 2010.
- CRUZ, A. N. N.; BONVENT, J. J. Estimulação elétrica neuromuscular por microcorrente, na cicatrização cutânea pós-operatória. **Análise De Colágeno Em Ratos. In: Congresso Brasileiro De Engenharia Biomédica**. Salvador, BA, 2008.
- CULAW, E. M.; CLARK, C. H.; MERRILEES, M. J. Connective tissue: Matris composition and its relevance to physical therapy. **Physical Therapy**, v. 79, n. 3, p. 308-319, 1999.
- DAHLGREN, L.A. Fat- derived mesenchymal stem cells for equine tendon repair. **Regen. Med.**, v. 4, n. 2, p. 14, 2009.
- DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**. 4 ed. Porto Alegre (RS): Artmed; 2010
- DANGELO, J.G.; FATTINI, C.A. **Anatomia Humana sistêmica e segmentar**. 3ed. São Paulo: Atheneu, 2007.
- DERWIN, K.A.; SOSLOWSKY, L.J.; KIMURA, J.H.; PLAAS, A.H. Proteoglycans and glycosaminoglycan fine structures in the mouse tail tendon fascicle. **J. Orthop. Res.**, v. 19, p. 269-277, 2001.
- DIEGELMANN, R.; EVANS, M.C. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. **Frontiers in Bioscience**, v. 9, n. 1, p. 283-289, 2004.
- DIMUZIO, P.; TULENKO, T. Tissue engineering applications to vascular bypass graft development: the use of adipose derived stem cells. **J Vasc Surg.**, v. 45, p. A99-103, 2007.
- DOCHEVA, D.; MULLER, S.; MAJEWSKI, M.; EVANS, C. Biologics for tendon repair. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 84, p. 222-239, 2015.
- ELLIS, H.M.; HORVITZ, H.R.; Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. **Cell**, v. 44, p. 817–829, 1986.

EMING, S.A.; KRIEG, T.; DAVIDSON, J.M. Gene therapy and wound healing. **Clin Dermatol.**, v. 25, p. 79-92, 2007.

FAHEY, T. J.; SHERRY, B.; TRACEY, K.J.; DEVENTER, V.S.; JONES, W.G.; MINEL, J.P.; MORGELLO, S.; SHIRES, G.T.; CERAMI, A. Cytokine production in a model of wound healing: The appearance of MIP-1, MIP-2, cachectin/TNF- α and IL-1, **Cytokine**, v. 2, p. 92-99, 1990.

FREITAS, R.P.A.; BARCELOS, A.P.M.; NÓBREGA, B.M.; MACEDO, A.B.; OLIVEIRA, A.R.; RAMOS, A.M.O.; VIEIRA, W.H.B. Laserterapia e microcorrente na cicatrização de queimadura em ratos. Terapias associadas ou isoladas? **Fisioter Pesq.**, v. 20, p. 1, 2013.

FRIEDENSTEIN, A.J.; CHAILAKHJAN, R.K.; LALYKINA, K.S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. **Cell Tissue Kinet**, v. 3, n. 4, p. 393-403, 1970.

FU, S.C.; HUI, C.W.C.; LI, L.C.; CHEUKA, Y.C.; QINA, L.; GAOB, J.; CHANA, K-M. Total flavones of Hippophae rhamnoides promotes early restoration of ultimate stress of healing patellar tendon in a rat model. **Medical Engineering & Physics**, 27:313-321, 2005.

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.**, v. 47, p. 763-768, 2013.

GALLUZZI, L.; BRAVO-SAN PEDRO, J.M.; VITALE, I.; AARONSON, S.A.; ABRAMS, J.M.; ADAM, D. Essential *versus* accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015 **Cell Death Differ** 2014.

GALLUZZI, L.; VITALE, I.; ABRAMS, J.M.; ALNEMRI, E.S.; BAEHRECKE, E.H.; BLAGOSKLONNY, M.V, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death Differ**, v. 19, p. 107–120, 2012.

GASPI, F.O.G.; FOGLIO, M.A.; CARVALHO, J.E.; SANTOS G.M.T.; TESTA, M.; PASSARINI, J.R. et al. Effects of the topical application of hydroalcoholic leaf extract of *Oncidium flexuosum* Sims. (Orchidaceae) and microcurrent on the healing of wounds surgically induced in Wistar rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p.1-9, 2011.

GERSZTEN, R.E.; GARCIA-ZEPEDA, E.A.; LIM, Y.C.; YOSHIDA, M, et al. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. **Nature**, v. 398, p. 718-723, 1999.

GHOSH, K.; CLARK, R.A.F. Wound repair. In: LANZA, R.; LANGER, R.; VACANTI, J. **Principles of Tissue Engineering**. 3. ed. New York: Elsevier/Academic Press, p. 1149-1166, 2007.

GILL, S. E.; PARKS, W. C. Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v.40, p. 1334-1347, 2008.

GOLDMAN, R.; POLLACK, S. Campos elétricos e proliferação em um modelo de feridas crônicas. **Bioelectromagnetics**, v. 17, n. 6, p. 450-457, 1996.

GORDON, K.J.; BLOBE, G.C. Role of transforming growth factor- β superfamily signaling pathways in human disease. **Biochim Biophys Acta** 1782, p. 197–228, 2008.

- GUIRRO, E. C. O.; GUIRRO, R. **Fisioterapia dermatofuncional: fundamentos, recursos, patologias**. 3a ed. São Paulo: Manole; p. 560, 2002.
- GULBIS JM, KELMAN Z, HURWITZ J, O'DONNELL M, KURIYAN J. Structure of the C-terminal region of p21(WAF1/CIP1) complexed with human PCNA. **Cell**, v. 87, p. 297–306, 1996.
- GUPTA, S. A decision between life and death during TNF α -induced signaling. **J Clin Immunol**, v. 22, n. 4, p. 185-194, 2002.
- HARTLAPP, I. et al. Fibrocytes induce an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and promote angiogenesis in vivo. **The FASEB Journal**, v. 15, p. 2215-2224, 2001.
- HATANAKA, E.; CURI, R. Fatty acids and wound healing: a review. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 88, n. 2, p. 53-58, 2007.
- HELDIN, C.H.; ERIKSSON, U.; OSTMAN, A. New members of the platelet-derived growth factor family of mitogens. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 398, p.284-290, 2002.
- HENRY,G.; GARNER, W.L. Inflammatory mediators in wound healing. **Surg. Clin. N. AM.**, v. 83, p. 483-507, 2003.
- HSIAO, S.T.; ASGARI, A.; LOKMIC, Z. Comparative analysis of paracrine factor expression in human adult mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose, and dermal tissue. **Stem Cells and Development**, v. 21, n. 12, p. 2189–2203, 2012.
- HUI Q.; SULEMAN, S.; SEOK, R. C.; KARTHIK, R.; HUALEI, Z.; DATTA E.; HANK, F.; KUNG1, J. K.; RONG, Z. Death and Proliferation Time Course of Stem Cells Transplanted in the Myocardium. **Mol Imaging Biol.**, v. 11, n. 6, p. 408–414, 2009.
- JAFFE, L.F.; VANABLE, J.W. Electric fields and wound healing. **Clin Dermatol.**, v. 2, p. 34-44, 1984.
- JAMES, R.; KESTURU, G.; BALIAN, G.; CHHABRA, A.B. Tendon: Biology, Biomechanics, Repair, Growth Factors, and Evolving Treatment Options. **JHS**, v. 33^a, p. 102-112, 2008.
- JANES, K.A.; GAUDET, S.; ALBECK, J.G.; NIELSEN, U.B.; LAUFFENBURGER, D.A.; SORGER, P.K. The response of human epithelial cells to TNF involves an inducible autocrine cascade. **Cell**, v.124, p. 1225–39, 2006.
- JONES, A.R.; FLANNERY, C.R. Bioregulation of lubricin expression by growth factors and cytokines. **Eur Cell Mater**, v. 13, p. 40, 2007.
- JÓZSA, L.G.; KANNUS, P. Human tendons: anatomy, physiology and pathology. In: Structure and Metabolism of Normal Tendon. Human. **Human Kinetics**, p. 46-97, 1997.
- JU, Y.J.; MUNETA, T.; YOSHIMURA, H.; KOGA, H.; SEKIYA I. Synovial mesenchymal stem cells accelerate early remodeling of tendon-bone healing. **Cell Tissue Res.**, v. 332, n. 3, p. 469-78, 2008.
- JUNG, J.C.; WANG, P.X.; ZHANG, G.; EZURA, Y.; FINI, M.E.; BIRK, D.E. Collagen fibril growth during chicken tendon development: matrix metalloproteinase-2 and its activation. **Cell Tissue Res.**, v. 336, p. 79-89, 2009.
- KAGAN, H.M.; LI, W. Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell. **J Cell Biochem.**, v. 88, p. 660–672, 2003.

- KAMATA, H.; HONDA, S.; MAEDA, S.; CHANG, L.; HIRATA, H., KARIN, M. Reactive oxygen species promote TNF α -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. **Cell.**, v. 120, p. 649-661, 2005.
- KANNUS, P. Structure of the tendon connective tissue. **Scand. J. Med. Sci. Sports**, v.6, p. 312-320, 2000.
- KAROUSOU, E.; VIGETTI, D.; MAFFULLI, N. Collagens, Proteoglycans, MMP-2, MMP-9 and TIMPs in Human Achilles Tendon Rupture. **Clin Orthop Relat Res.**, v. 466, p. 1577–1582, 2008.
- KELMAN, Z.; O'DONNELL, M. Structural and functional similarities of prokaryotic and eukaryotic DNA polymerase sliding clamps. **Nucleic Acids Res.**, v. 23, p. 3613–3620, 1995.
- KHOKHA, R.; MURTHY, A.; WEISS, A. Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, p. 649-665, 2013.
- KIM, J.H.; JUNG, M.; KIM, H.S.; KIM, Y.M.; CHOI, E.H. Adipose-derived stem cells as a new therapeutic modality for ageing skin. John Wiley & Sons A/S, **Experimental Dermatology**, v. 20, p. 383-387, 2011.
- KIRKENDALL, D.T.; GARRET, W.E. Function and biomechanics of tendons. **Scand J Med Sci Sports**, v. 7, p. 62-66, 1997.
- KJAER, M. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. **Physiological Reviews**, v. 84, n. 2, p. 649-689, 2004.
- KLOTH L. C. Electrical stimulation for wound healing: a review of the evidence from in vitro studies, the animal experiment, and clinical trials. **Int J. Low Extrem Wounds**, v. 4, n. 1, p. 23-44, 2005.
- KLOTH, L.C.; MCCULLOCH, J.M. Promotion of wound healing with electrical stimulation. **Adv.wound Care**, v. 5, n. 9, p.42-45, 1996.
- KNAUPER, V.; LÓPEZ-OTÍN, C.; SMITH, B.; KNIGHT, G.; MURPHY, G. Biochemical characterization of human collagenase-3. **J. Biol. Chem.** v. 271, p. 1544-1550, 1997.
- KOŁODZINSKYI, M.N.; ZHAO, C.; SUN, Y.L., et al. The effects of hylan g-f 20 surface modification on gliding of extrasynovial canine tendon grafts in vitro. **J. of Hand Surgery**, v. 38, n. 2, p. 231–236, 2013.
- KOSKINEN, S.O.A; KJAER, M.; MOHR, T.; BIERING SORENSEN, F.; SUURONEN, T.; TAKALA, T.E.S. Type IV collagen and its degradation in paralyzed human muscle: effect of functional electrical stimulation. **Muscle Nerve**, v. 23, p. 580-589, 2004.
- KUMAR, S. Caspase function in programmed cell death. **Cell Death Differ**, v. 14, p. 32–43, 2007.
- LACITIGNOLA, L.; CROVACE, A.; ROSSI, G.; FRANCIOSO, E. Cell therapy for tendinitis, experimental and clinical report. **Vet Res Commun**, v. 32, p. 33-38, 2008.
- LATARJET, M.; LIARD, A.R. **Anatomia Humana**. 2 ed. São Paulo: Panamericana, 1996.
- LEFFMANN, D. J. et al. Effect of microamperage stimulation on the rate of wound healing in rats: a histological study. **Physical Therapy**, v. 74, n. 3, p. 195-200, 1994.
- LEITÃO, A. R.E. **Elementos da fisioterapia**. 2.ed. São Paulo: J.C. Santos Editora de Livros Técnicos e Científicos, 1967.
- LEITÃO, A.R.E. Fisiatria clínica. São Paulo: Atheneu, 1979.

- LEPPILAHTI, J.; PURANEN, J.; ORAVA, S. Incidence of Achilles tendon rupture. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, v. 67, p. 277-279, 1996.
- LIANZA, S. **Medicina de Reabilitação**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1985.
- LIMA, R.O.L.; RABELO, E.R.; MOURA, V.M.B.D.; SILVA, L.A.F., TRESVENZOL, L.M.F. Cicatrização de feridas cutâneas e métodos de avaliação. Revisão de literatura. **Revista CFMV**, v. 56, p. 53-59, 2012.
- LIU, T.; UM, H.; SHEN, Z.; SONG, Z.; CHEN, X.; WANG, Y. Autologous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells are involved in rat liver regeneration following repeat partial hepatectomy. **Molecular Medicine Reports**, v. 13, n. 3, p.2053-2059, 2016.
- LONGO, U.G.; RONGA, M.; MAFFULLI, N. Achilles tendinopathy. **Sports Med Arthrosc.**, v. 17, p. 112-126, 2009.
- MACEWAN, D. J. TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. **Cell Signal**, v. 14, n. 6, p. 477-492, 2002.
- MAFFULLI, N.; EWEN, S.W.B.; WATERSTON, S.W.; 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.**, v. 28, n. 4, p. 499-505, 2004.
- MAGNUSSON, S. P.; HANSEN, P.; KJAER, M. Tendon properties in relation to muscular activity and physical training. **Scand J Med Sci Sports**. v. 13, n. 4, p. 211-223, 2003.
- MARTIN, D.R.; COX, N.R.; HATHCOCK, T.L.; NIEMEYER, G.P.; BAKER, H.J. Isolation and characterization of multipotentialmesenchymal stem cells from feline bone marrow. **Experimental Hematology**, v. 30, n. 8, p. 879-886, 2002.
- MCCAWLEY, L.J.; MATRISIAN, L.M. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore. **Curr Opin Cell Biol.**, v. 13, p. 534-540, 2001.
- MCMAKIN, C.; GREGORY, W.; PHILIPS, T. Cytokine changes with microcurrent treatment of fibromyalgia associated with cervical spine trauma. **J. of Bodywork and Movement Therapies**, v. 9, p. 169-176, 2005.
- MENDONÇA, R.J.; COUTINHO NETTO J. Aspectos celulares da cicatrização. **An Bras Dermatol.**, v. 84, n. 3, p. 257-262, 2009.
- MOLDOVAN, G.L.; PFANDER, B.; JENTSCH, S. PCNA, the maestro of the replication fork. **Cell**, v. 129, p. 665-679, 2007.
- MOORE, K.W.; DE WAAL MALEFYT, R.; COFFMAN, R.L. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu Rev Immunol.**, v. 19, p. 683, 2001.
- MURPHY, D.J.; NIXON, A.J Biochemical and site-specific effects of insulin-like growth factor I on intrinsic tenocyte activity in equine flexor tendons. **Am J Vet Res.**, v. 58, p. 103-109, 1997.
- MURPHY, G. & NAGASE, H. Progress in matrix metalloproteinase research. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 29, p. 290-308, 2008.
- NARYZHNY, S.N. Proliferating cell nuclear antigen: a proteomics view. **Cell Mol Life Sci.**, v. 65, p. 3789-3808, 2008.
- NESSLER, J.P.; MASS, D.P. Direct current electrical stimulation of tendon healing in vitro. **Clin Orthopedics and Related Research.**, v. 217, p.303-312, 1987.

- NEKLYUDOV, A. D. Nutritive fibers of animal origin: Collagen and its fractions as essential components of new and useful food products. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 229-238, 2003.
- NIXON, A. J.; DAHLGREN, L. A.; HAUPT, J. L.; YEAGER, A. E.; WARD, D. L.; Effect of adipose-derived nucleated cell fractions on tendon repair in horses with collagenase-induced tendinitis. **AJVR**, v. 69, n. 7, p. 928- 937, 2008.
- OAKES, B.W. Tissue healing and repairs: tendons and ligaments. In: Frontera WR, editor. **Rehabilitation of Sports Injuries: Scientific basis**. Boston: **Blackwell Science**, p. 56-98, 2003.
- OMAR, A. I.; ABOULKHAIR, G. A. Effect of Bone Marrow Versus Adipose Tissue Derived Mesenchymal Stem Cells on the Pancreas of Streptozotocin-Induced Diabetes Mellitus Type I in Adult Male Rats (Histological Study). **The egyptian journal of histology**, v. 40, n. 1, p. 12-24, 2017.
- OSHIRO, W.; LOU, J.; XING, X.; TU, Y.; MANSKE, P.R. Flexor tendon healing in the rat: a histologic and gene expression study. **J Hand Surg [Am]**., v. 28, p. 814-823, 2003.
- PAJALA, A.; KANGAS, J.; OHTONEN, P.; LEPPILAHTI, J. Rerupture and deep infeccion following treatment of total Achilles ruptures. **The Journal of Bone and Joint Sugery**, v. 84^a, p. 2016-2021, 2002.
- PALMER, M. Assessment and Management of Patients With Achilles Tendon Rupture. **Advanced Emergency Nursing Journal**, v. 29, p. 249-259, 2007.
- PARAMESWARAN, N.; PATIAL, S. Tumor necrosis factor-alpha signaling in macrophages. **Crit Rev Eukaryot Gene Expr.**, v. 20, p. 87–103, 2010.
- PARK, J.E.; BARBUL, A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. **The American Journal of Surgery**, v.187, p.11S-16S, 2004.
- PEREIRA, A.N.; EDUARDO, C.P.; MATSON, E.; MARQUES, M.M. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. **Laser in Surgery and Medicine**, v.31, p. 263-267, 2002.
- PHILLIPS, M.I.; TANG, Y.L. Genetic modification of stem cells for transplantation. **Adv Drug Deliv Rev.**, v. 60, p. 160–172, 2008.
- PITTENGER, M.F.; MACKAY, A.M.; BECK, S.C.; JAISWAL, R.K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J.D.; MOORMAN, M.A.; SIMONETTI, D.W.; CRAIG, S.; MARSHAK, D.R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, Pennsylvania, v.284, n.5411, p.143-147, 1999.
- POSTACCHINI, F.; DE MARTINO, C. Regeneration of rabbit calcaneal tendon maturation of collagen and elastic fibers following tenotomy. **Connective Tissue Research**, v. 8, p. 41-47, 1980.
- PRENTICE, W. **Modalidades terapêuticas para fisioterapeutas**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- PRESTES, R. C. Colágeno e seus derivados: características e aplicações em produtos cárneos. Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, RS. UNOPAR. **Cient Ciênc Biol Saúde**, v. 15, n. 1, 2013.
- PRYCE, B. A. et al. Recruitment and maintenance of tendon progenitors by TGF β signaling are essential for tendon formation. **Development**, v. 136, p. 1351–1361, 2009.

- RAFFETTO, J.D.; KHALIL, R.A. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. **Biochem Pharmacol.**, v. 75, p. 346–359, 2008.
- RAISER, A.G.; PIPPI, N.L.; GRAÇA, D.L.; SILVEIRA, D.S.; BORDINI, I.; BAIOTTO, G.C. O fio de poliamida como substituto de perda segmentar do tendão calcâneo comum em cães. **Rev Bras Med Vet.**, v.1, p. 23-29, 2003.
- RAJA, S.K.; GARCIA, M.S.; ISSEROFF, R.R. Wound re-epithelialization: modulating keratinocyte migration in wound healing. **Front Biosci**, v. 12, p. 2849–68, 2007.
- RAMASASTRY, S. S. Acute wounds. **Clinics In Plastic Surgery**, v. 32, p. 195-208, 2005.
- REDDY, G.K.; ENWEMEKA, C.S. A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues. **Clin Biochem.**, v. 29, n. 3, p. 225-229, 1996.
- RILEY, G. Tendinopathy from basic Science to treatment. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.*, v. 4, n. 2, p. 82-89, 2008.
- RODOPIANO, N.; CHAGAS, F.; SILVA, S.A.; SANTOS, M.C.B. **Intervenção da fisioterapia dermatofuncional com microcorrente e drenagem linfática na úlcera venosa.** Anais do 10º Fórum Científico da Faculdade de Ciências Médicas da Paraíba. Campus I da Faculdade de Ciências Médicas da Paraíba-FCM/PB, 2013.
- SAINI, N.S.; ROY, K.S.; BANSAL, P.S.; SINGH, B.; SIMRAN, P.S. A preliminar study on the effect of ultrasound therapy on the healing of surgically severed achilles tendons in five dogs. **J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.**, v. 49, n. 6, p. 321-328, 2002.
- SALOMÃO, O.; CARVALHO, A.E.; FERNANDES, T. D.; TRALDI, I. H.; CARVALHO, J. N. Lesões tendíneas no pé e no tornozelo do esportista. **Revista Brasileira de Ortopedia**; v. 28, n. 10, p. 731-736, 1993.
- SANTOS, V.N.S.; FERREIRA, L.M.; HORIBE, E.K.; DUARTE, I.S. Electric microcurrent in the restoration of the skin undergone a trichloroacetic acid peeling in rats. **Acta Cir Bras.**, v.19, n. 5, p. 466-470, 2004.
- SATO, Y.; OHSHIMA, T.; KONTO, T. Regulatory role of endogenous interleukin-10 in cutaneous inflammatory response of murine wound healing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 256, p. 194-199, 1999.
- SCHULZ, R. Intracellular targets of matrix metalloproteinase-2 in cardiac disease: rationale and therapeutic approaches. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.**, v. 47, p. 211-242, 2007.
- SELLHEYER, K.; BICKENBACH, J. R.; ROTHNAGEL J. A., BUNDMAN, D.; LONGLEY, M. A.; KRIEG, T.; ROCHE, N. S.; ROBERTS, A. B.; ROOP D. Inhibition of skin development by overexpression of transforming growth factor beta 1 in the epidermis of transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 90, p. 5237–5241, 1993.
- SHARMA, P.; MAFFULLI, N. Biology of tendon injury: healing, modeling and remodeling. **J Musculoskelet Neuronal Interact.** v. 6, p. 181-190, 2016.
- SILVA, E.M. et al. Avaliação histológica da laserterapia de baixa intensidade e microcorrente na cicatrização de tecidos epitelial, conjuntivo e ósseo: estudo experimental em ratos. **Rev Sul-Bras Odontol.**, v. 4, p. 29-35, 2007.
- SIMMONS, D.J.; SEITZ, P.; KIDDER, L.; KLEIN, G.L.; WAELTZ, M.; GUNDBERG, C.M.; TABUCHI, C.; YANG, C.; ZHANG, R.W. Partial characterization of rat marrow stromal cells. **Calcified Tissue Internacional**, v.4 8, n. 5, p. 326-334, 1991.

- SINGER, A.D.; CLARK, R.A.F. Cutaneous wound healing. **New Engl J Med.**, v. 46, p. 341-738, 1999.
- SOUZA, C. F.; NAPOLI, P.; HAN, S.W.; LIMA, V.C.; CARVALHO, A.C.C. Células-tronco mesenquimais: células ideais para a regeneração cardíaca. **Rev Bras Cardiol Invasiva**, v. 18, n. 3, p. 344-53, 2010.
- STARKEY, C. **Recursos Terapêuticos em Fisioterapia**. 2.ed. São Paulo: Manole, 2001.
- STREM, B.M.; HICOK, K.C.; ZHU, M.; WULUR, I.; ALFONSO, Z.; SCHREIBER, R.E, et al. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. **Keio J Med.**, v. 54, n. 3, p. 132-41, 2005.
- SUGIMOTO, M.; MAESHIGE, N.; HONDA, H.; YOSHIKAWA, Y.; UEMURA, M.; YAMAMOTO, M.; TERASHI, H. Optimum microcurrent stimulation intensity for galvanotaxis in human fibroblasts. **Journal Wound Care**, v. 21, n. 1, p. 5–10, 2012.
- SUMMERS, A. P.; KOOB, T.J. Tendon-bridging the gap. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, v. 133, n. 4, p. 905-909, 2002.
- TATARI, H.; SKIAK, E.; DESTAN, H., et al. Effect of hylan G-F 20 in Achilles' tendonitis: an experimental study in rats. **Arch Phys Med Rehabil.**, v. 85, p. 1470–1474, 2004.
- TAYLOR, S.H.; AL-YOUHA, S.; AGTMAEL, T.; LU, Y.; WONG, J.; MCGROUTHER, D.A.; KADLER, K.E. Tendon is covered by a basement membrane epithelium that is required for cell retention and the prevention of adhesion formation. **PLoS One**, v. 6, n. 1, e16337, 2011.
- TELLER, P.; WHITE, T. K. The physiology of wound healing: injury through maturation. **Perioperative Nursing Clinics**, v. 6, p. 159-170, 2011.
- TITLE, C.; SCHON, L. Achilles tendon disorders including tendinosis and tears. In: Porter D, Schon L. *Baxter's The Foot and Ankle in Sport*. 2nd ed. Philadelphia: Mosby Elsevier;2007. Ramasastry SS. Acute wounds. **Clin Plast Surg.**, v. 32, n. 2, p. 195-208, 2007.
- THOMOPOULOS, S.; HATTERSLEY, G.; ROSEN, V.; MERTENS, M.; GALATZ, L.; WILLIAMS, G.R.; SOSLOWSKY, L.J. The localized expression of extracellular matrix components in healing tendon insertion sites: an in situ hybridization study. **J Orthop Res.**, v. 20, n. 3, p. 454-463, 2002.
- THORNTON, G.M.; HART, D.A. The interface of mechanical loading and biological variables as they pertain to the development of tendinosis. **J Musculoskelet Neuronal Interact**, v. 11, n. 2, p. 94-105, 2011.
- TILLMAN, L. J.; CUMMINGS, G. S. Remodeling of dense connective tissue in normal adult tissue. *Dynamics of Human Biologic Tissue*, Philadelphia: F.A. Davis Company, cap. 2, p. 45-69, 1992.
- TIMOSHANKO, J.R.; SEDGWICK, J.D.; HOLDSWORTH, S.R.; TIPPING, P.G. Intrinsic renal cells are the major source of tumor necrosis factor contributing to renal injury in murine crescentic glomerulonephritis. **J Am Soc Nephrol.**, v. 14, p. 1785–1793, 2003.
- TIPPING, P.G.; LEONG, T.W.; HOLDSWORTH, S.R. Tumor necrosis factor production by glomerular macrophages in anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis in rabbits. **Lab Invest.**, v 65, p. 272–279, 1991.
- TIZARD, I.R. **Imunologia Veterinária: uma introdução**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 587, 2005.

- TOMIOSSO, T.C.; NAKAGAKI, W.R.; GOMES, L.; HYSLOP, S.; PIMENTEL, E.R. Organization of collagen bundles during tendon healing in rats treated with L-NAME. **Cell and Tissue Research**, v. 337, p. 235-242, 2009.
- TRACEY, D.; KLARESKOG, L.; SASSO, E. H.; SALFELD, J. G.; TAK, P. P. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: A comprehensive review. **Pharmacol Ther**, v. 117, n.2, p. 244-279, 2008.
- UEDA, H.; MEGURI, N.; MINAGUCHI, J.; WATANABE, T.; NAGAYASU, A.; HOSAKA, Y.; TANGKAWATTANA, P.; KOKAI, Y.; TAKEHANA, K. Effect of collagen oligopeptide injection on rabbit tenositis. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 70, n. 12, p. 1295-1300, 2008.
- ULLOA, L.; TRACEY, K.J. The 'cytokine profile': a code for sepsis. **Trends Mol Med.**, v. 11, p.56–63, 2005.
- UYSAL, C. A. et al. Stem cells derived from adipose tissue improve tendon repair: biomechanical and immunohistochemical evaluation. **J. of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery**, 2012. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1748681512003385>.
- VEMPATI, P.; POPEL, A.S.; MAC GABHANN, F. Extracellular regulation of VEGF: isoforms, proteolysis, and vascular patterning. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 25, p. 1–19, 2014.
- VERONESI, F.; MAGLIO, M.; TSCHON, M.; ALDINI N.; FINI, M. Adipose-derived mesenchymal stem cells for cartilage tissue engineering: state-of-the-art in in vivo studies. **Journal of Biomedical Materials Research. Part.**, v. 102, n. 7, p. 2448–2466, 2014.
- VIDAL, B.C.; CARVALHO, H.F. Aggregational state and molecular order of tendons as a function of Age. **Matrix**, v. 10, p. 48-57, 1990.
- VIDAL, B.C.; MELLO, M.L.S. Optical anisotropy of collagen fibers of rat calcaneal tendons: an approach to spatially resolved supramolecular organization. **Acta Histochem**, v. 112, p. 53–61, 2010.
- VIEIRA, C.P.; ARO, A.A.; ALMEIDA, M.S.; MELLO, G.C.; ANTUNES, E.; PIMENTEL, E.R. Effects of Acute Inflammation Induced in the Rat Paw on the Deep Digital Flexor Tendon. **Connect Tissue Res.**, v. 53, n. 2, p. 160-168, 2012.
- VIGETTI, D.; RIZZI, M.; VIOLA, M.; KAROUSOU, E.; GENASETTI, A.; CLERICI, M.; BARTOLINI, B.; HASCALL, V. C.; DE LUCA G.; PASSI, A. The effects of 4-methylumbelliferone on hyaluronan synthesis, MMP2 activity, proliferation, and motility of human aortic smooth muscle cells. **Glycobiology**, v. 19, p. 537–546, 2009.
- VOLETI, P.B.; BUCKLEY, M.R.; SOSLOWSKY, L.J. Tendon healing: repair and regeneration. **Annu Rev Biomed Eng.** v. 14, p. 47-71, 2012.
- VON BAHR, L. et al. Analysis of tissues following mesenchymal stromal cell therapy in humans indicates limited long-term engraftment and no ectopic tissue formation. **Stem Cells**, v. 30, p.1575-1578, 2012.
- WAGGETT, K.G.; RALPHS, J.R.; KWAN, A.P.L.; WOODNUTT, D.; BENJAMIM, M. Characterization of collagens and proteoglycans at the insertion of the human Achilles tendon. **Matrix Biol.**, v. 16, p. 457-470, 1998.
- WANG, J. H. Mechanobiology of tendon, **J. Biomech.**, v. 39, p. 1563–1582, 2006.
- WANG, J.H.; GUO, Q.; LI B. Tendon biomechanics and mechanobiology a minireview of basic concepts and recent advancements. **J Hand Ther**, v. 25, n. 2, p. 133–141, 2012.

WARZOCHA, K.; BLENVENU, J.; COLFFIER, B.; SALLES, G. Mechanisms of action of the tumor necrosis factor and lymphotoxin ligand-receptor system. **Eur Cytokine Netw**, v. 6, n.2, p. 83-96, 1995.

WING, T. Modern Low Voltage Microcurrent Stimulation: A comprehensive overview. **Chiropractic Economics**, v. 37, p. 265-71, 1989.

WITKO-SARSAT, V.; MOCEK, J.; BOUAYAD, D.; TAMASSIA, N.; RIBEIL, J. A.; CANDALH, C. et al. Proliferating cell nuclear antigen acts as a cytoplasmic platform controlling human neutrophil survival. **J. Exp. Med.**, v. 207, p. 2631–2645, 2010.

WOESSNER, J.F.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and TIMPs. Oxford University Press; Oxford: 2000.

YAMAMOTO, T.; ECKES, B.; KRIEG, T. Effect of interleukin-10 on the gene expression of type I collagen, fibronectin, and decorin in human skin fibroblasts: differential regulation by transforming growth factor-beta and monocyte chemoattractant protein-1. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 281, p. 200, 2001.

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. **J. of Biomedical Science**, v. 18, p. 59, 2011.

YOUNGSTROM, D.W.; BARRETT JG. Engineering Tendon: Scaffolds, Bioreactors, and Models of Regeneration. **Stem Cells International**. p. 1-11, 2016.

YU, C.; HU, Z.Q.; PENG, R.Y. Effects and mechanisms of a microcurrent dressing on skin wound healing: a review. **Military Medical Research**, v. 24, n. 1, p. 1-8, 2014.

ZANNETTINO, A.C.; PATON, S.; ARTHUR, A.; KHOR, F.; ITESCU, S.; GIMBLE J.M, et al. Multipotential human adipose-derived stromal stem cells exhibit a perivascular phenotype in vitro and in vivo. **J Cell Physiol.**, v. 214, n. 2, p. 413-21, 2008.

ZHANG, C.; LI, Y.; WU, Y. et al. Interleukin-6/signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) pathway is essential for macrophage infiltration and myoblast proliferation during muscle regeneration. **J Biol Chem**, p. 288 -1489, 2013.

ANEXOS

**CEUA- 2015-2016**

Fundação Herminio Ometto

Título: Efeito combinado da aplicação de células tronco e microcorrente na cicatrização do tendão calcâneo de ratos após transecção parcial

Orientador Responsável: Andrea Aparecida de Aro

Aluno(s)

Fernanda Oriani Bortolazzo

Curso: Mestrado em Ciências Biomédicas

Nº de Inscrição no CEP: 049/2016

Data Avaliação do CEP: 20/09/2016

O Comitê de Ética e Mérito Científico informa que o projeto acima especificado foi registrado em seus arquivos.

Araras, 20 de março de 2018.

Doutor Rodrigo Augusto Dália
Coordenador(a) do CEUA- 2015-2016

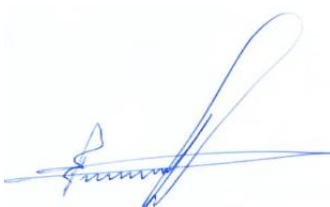
FHO|Uniararas
Av. Dr. Maximiliano Baruto, 500 Jd.
Universitário - Araras/SP
CEP:13.607-339

ESTE DOCUMENTO FOI GERADO E ARMAZENADO EM
AMBIENTE DIGITAL. PARA CONSTATAR A SUA
AUTENTICIDADE, ACESSE:
<http://school.uniararas.br/autenticador/> VIA
INTERNET FORNECENDO O NÚMERO:
511065 E A SENHA: BOT3XAT7

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 E MICROCORRENTE NA CICATRIZAÇÃO DO TENDÃO CALCANEAR DE RATOS APÓS TRANSECÇÃO PARCIAL”**, 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) autor(a): Fernanda Oriani Bortolazzo


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

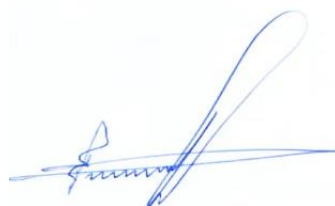
Data: 27/04/2018

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 E MICROCORRENTE NA CICATRIZAÇÃO DO TENDÃO CALCANEAR DE RATOS APÓS TRANSECÇÃO PARCIAL**”, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 27 de abril de 2018.

Assinatura: 
Nome do(a) autor(a): Fernanda Oriani Bortolazzo
RG n.º 47.335.000-2


Assinatura: _____
Nome do(a) orientador(a): Edson Rosa Pimentel
RG n.º 5017230