



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE NEUROFARMACOLOGIA EXPERIMENTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

**O TRATAMENTO COM MEIO CONDICIONADO EM CULTURA PRIMÁRIA
DE TENÓCITOS ACELERA O REPARO TENDÍNEO EM MODELO DE LESÃO
TOTAL DO TENDÃO CALCÂNEO**

ANALÚ ALVES MACIEL

Belém

2022

ANALÚ ALVES MACIEL

**O TRATAMENTO COM MEIO CONDICIONADO EM CULTURA PRIMÁRIA
DE TENÓCITOS ACELERA O REPARO TENDÍNEO EM MODELO DE LESÃO
TOTAL DO TENDÃO CALCÂNEO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará como requisito final para obtenção do título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva.

Belém

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a)
autor(a)

- M152t Maciel, Analú.
 O Tratamento com Meio Condicionado em cultura
 primária de tenócitos acelera o reparo tendíneo em modelo
 de lesão total do tendão calcâneo / Analú Maciel. — 2022.
 61 f. : il. color.
- Orientador(a): Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano
 Oliveira da Silva
 Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará,
 Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-
 Graduação em Neurociências e Biologia celular, Belém,
 2022.
1. Terapia Celular. 2. Tendinopatia. 3. Tenócitos. I.
 Título.

CDD 571.6

ANALU ALVES MACIEL

**O TRATAMENTO COM MEIO CONDICIONADO EM CULTURA PRIMÁRIA
DE TENÓCITOS ACELERA O REPARO TENDÍNEO EM MODELO DE LESÃO
TOTAL DO TENDÃO CALCÂNEO**

Defesa do trabalho de Mestrado submetido ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular – área de concentração em Biologia Celular

Banca examinadora:

Prof. Dr Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva – Orientador

Instituto de Ciências Biológicas – UFPA.

Profa. Dra. Suellen Alessandra Soares de Moraes – Membro da Banca

Instituto de Ciências da Saúde – UFPA.

Profa. Dra. Karen Renata Herculano Matos Oliveira

Instituto de Ciências Biológicas – UFPA.

Belém

2022

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Neurofarmacologia Experimental do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará sob orientação da Profº. Drº. Anderson Manoel Herculano. A realização da pesquisa contou com o apoio das seguintes instituições de fomento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) e Fundação Amazônia Amparo a Estudos e Pesquisas (FAPESPA).

Dedico este trabalho para todos aqueles que passaram por um momento de fraqueza ou vulnerabilidade emocional e, ainda assim, persistiram em seus sonhos. Pois a dor é momentânea, mas desistir é para sempre.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, pelo dom da vida. Pela fé que me foi concedida até aqui e por sua infinita misericórdia em me permitir alcançar essa conquista.

Aos meus avós, Maria de Lourdes, Ivan Pereira e Graça Almeida. Por nunca hesitarem ou medirem esforços para me oferecer uma educação digna. Por serem os maiores incentivadores de minha formação e por todo amor, carinho e acolhimento ao longo de minha vida.

A minha mãe, Ana Beatriz, por me ensinar o que é resiliência e persistência quando se almeja alcançar sonhos. A Minha tia, Gyselle Almeida, pela acolhida, empatia e ternura oferecidas durante toda a minha vida. Os princípios que vocês me ensinaram, foram fundamentais para me tornar quem hoje sou.

Ao Gabriel Geordan, cujo o apoio para este momento se iniciou no instante em que meu nome foi divulgado na seleção de mestrado. Sempre altruísta, empático e amoroso. Obrigada por todo apoio, suporte e amor.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano. Por ser uma grande inspiração e incentivador de minha formação acadêmica. As oportunidades e experiências vivenciadas em minha jornada científica foram fundamentais para minha construção pessoal e profissional. Obrigada por todos os ensinamentos e conversas que me instruíram e contribuíram para minha jornada.

A minha coorientadora e mãe científica, Martha Souza, por ser uma grande inspiração. Para além de me instigar a ser uma cientista melhor, sua presença e acolhida me inspiram a ser alguém melhor. Obrigada por todas as conversas; por todo apoio e, sobretudo, por sua calma, que frente as dificuldades nos amparava com músicas, conselhos e momentos as quais serei eternamente grata. Obrigada por cada orientação, que para além da bancada, levarei para a vida inteira.

Ao meu grupo de pesquisa, Diego Rodrigues, Thalita Moura e Martha Souza, em que carinhosamente nos denominamos tendinosos. Obrigada pelo apoio que para mais

de um elo científico, transformou-se em uma amizade e companheirismo constante. Vocês foram fundamentais não só para a realização deste trabalho, mas como incentivadores para que eu conseguisse chegar até aqui.

A todos os meus colegas de laboratório, sobretudo, Nadyme, Brenda, Nívia, Jéssica, Patrick, Yuri e Gabriel. Obrigada pelo companheirismo desenvolvido ao longo desses anos, por dividirem os perrengues e dobrarem as alegrias. Graças a vocês, essa árdua jornada também foi repleta de histórias e risadas incríveis que lembrarei para sempre.

Aos professores do LNE: Karen Oliveira, Evander Batista, Adelaide Passos, Luana Leão. Pelo incentivo incansável na formação dos alunos do laboratório. Cada ensinamento, parceria, cobrança e contribuição foi fundamental para minha formação. Agradeço, em especial, a professora Suellen Moraes, que no primeiro semestre da graduação me apresentou sua pesquisa e fomentou em mim o desejo de fazer parte do grupo de pesquisa em que hoje estou. Obrigada por todo apoio e incentivo ao longo desses anos.

Ao bioterista amado, seu Amarildo Gomes. Pela simpatia, pela paciência e por contribuir diretamente para realização deste trabalho.

Aos meus amigos plantonistas do HPSM-HMP, Rangel Braga, Thaynah Nunes e Açucena Furtado. Pela compreensão e paciência nesse período final.

Ao CNPq e CAPES pelo apoio financeiro.

Agradeço a Universidade Federal do Pará e ao PPNBC, pelo apoio estrutural e formação oferecida.

RESUMO

Os tratamentos convencionais para as tendinopatias são pouco eficazes e as intervenções clínicas atuais não proporcionam melhora adequada, deixando este tecido suscetível a novas lesões. Recentemente, o uso de terapias mediadas por células tem-se mostrado eficaz para o tratamento de lesões em tecidos conectivos como os tendões. Nosso objetivo é avaliar se o tratamento local com meio condicionado em culturas de tenócitos é capaz de promover melhoras teciduais e funcionais no tendão calcâneo de camundongos tenotomizados. As células do tendão calcâneo de camundongos Swiss foram cultivadas para condicionamento celular do meio de cultivo que posteriormente será aplicado como tratamento. Os animais foram submetidos à tenotomia do tendão direito e tratados com solução salina (SAL), DMEM sem soro (DMEM) e DMEM condicionado em cultura primária de tenócitos (MC) e comparadas ao grupo controle (CTRL). A funcionalidade tendínea foi mensurada através do Índice Funcional de Aquiles (IFA) e a sensibilidade mecânica através do limiar de retirada de pata (PWT) pelo teste de Von Frey. Todas as análises foram realizadas em 7, 14 e 21 dias pós lesão (dpl). Para análise histológica, os tecidos foram corados com HE. Estatística foi realizada por ANOVA de duas vias seguida do pós teste de Tukey, $p < 0,01$. O grupo MC apresentou melhora funcional em 7° e 14°dpl ($-40,4 \pm 12,6$; $-36,6 \pm 10,4$) se comparado aos grupos DMEM ($-76,5 \pm 11,7$; $-71,6 \pm 7,9$, $p < 0,01$) e SAL ($-88,8 \pm 15$; $-71,4 \pm 12,6$ $p < 0,01$). O grupo MC apresentou melhora no limiar de retirada da pata em 7°e 14°dpl ($2,24 \pm 1,15$; $2,66 \pm 1,06$) se comparado aos grupos DMEM ($0,15 \pm 0,07$; $0,45 \pm 0,76$ $p < 0,01$) e SAL ($0,13 \pm 1,15$; $0,77 \pm 0,95$ $p < 0,01$). Na análise histológica o grupo MC apresentou uma melhor organização tecidual com células apresentando um formato mais semelhante ao controle, enquanto os grupos SAL e DMEM se diferem bastante deste. Concluímos que o tratamento com o meio condicionado em cultura primária de tenócitos acelera a recuperação do tendão de camundongos, promovendo melhora na sensibilidade mecânica, na funcionalidade e na organização tecidual no modelo de lesão proposto.

Palavras-chave: Terapia celular, tendinopatia, tenócitos.

ABSTRACT

Conventional treatments for tendinopathies are ineffective and most clinical interventions do not provide adequate recovery leaving this tissues more likely to suffer reinjures. Recently, cell based therapies has been shown to be effective for the treatment in connective tissue injuries, such as tendons. Our aim is to evaluate if local treatment with tenocytes conditioned medium promotes tissue and functional improvements in the calcaneal tendon of tenotomized mice. The calcaneal tendon cells of Swiss mice were cultured for conditioning culture medium that will be used as a treatment. The animals were subjected to right calcaneal tenotomy and treated with saline solution (SAL), DMEM without serum (DMEM) and DMEM conditioned in primary tenocyte culture (MC) and compared to the control group (CTRL). Tendon functionality was measured using the Achilles Functional Index (AFI) and mechanical sensitivity through the paw withdrawal threshold (PWT) using the Von Frey test. All analyzes were performed at 7, 14 and 21 days post-injury (dpi). For histological analysis, tissues were stained with HE. Statistics were performed by ANOVA-2 followed by Tukey's post test, $p < 0.01$. The MC group showed functional improvement at 7° and 14°dpi (-40.4 ± 12.6 ; -36.6 ± 10.4) compared to the DMEM groups (-76.5 ± 11.7 ; $-71, 6 \pm 7.9$, $p < 0.01$) and SAL (-88.8 ± 15 ; -71.4 ± 12.6 $p < 0.01$). The MC group showed improvement in the paw withdrawal threshold at 7° and 14°dpi (2.24 ± 1.15 ; 2.66 ± 1.06) compared to the DMEM groups (0.15 ± 0.07 ; 0.45 ± 0.76 $p < 0.01$) SAL (0.13 ± 1.15 ; 0.77 ± 0.95 $p < 0.01$). In the histological analysis, the MC group showed better tissue organization with cells presenting a format more similar to the control group, while the SAL and DMEM groups were more different from this one. We conclude that treatment with tenocytes conditioned medium accelerates tendon recovery, promoting improvement in mechanical sensitivity, functionality and tissue organization in the proposed injury model.

Keywords: Cell therapy, tendinopathy, tenocytes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Representação esquemática das diferenças histológicas e estruturais entre o tendão saudável e lesionado.....	18
Figura 02 – Estrutura e organização do tendão. Ilustração representativa entre as fibras de colágeno, fascículos, unidades do tendão e tecidos circundantes	20
Figura 03 – Fases de reparo da lesão tendínea. Indicação do período que ocorre cada fase e algumas características referentes às mesmas	25
Figura 04 – Comparativo da estrutura anatômica entre tendão calcâneo humano e de camundongo	26
Figura 05 – Diferença na pegada durante a marcha livre de animais saudáveis e com lesão tendínea.....	27
Figura 06 – Imagem representativa de cirurgia experimental para modelo de lesão no tendão calcâneo seguida de sutura.....	37
Figura 07 - Imagem esquemática do desenho experimental desenvolvido.....	38
Figura 08 – Imagem da realização do teste de avaliação da funcionalidade do tendão calcâneo e os elementos a serem analisados.....	40
Figura 09 – Imagem representativa da realização do teste de Von Frey através dos filamentos de Nylon.....	41
Figura 10 – Imagem de microscopia de campo claro de cultura primária de tenócitos obtidos do tendão de Aquiles de camundongos com 1 ou 2 dias de idade.....	42
Figura 11 – Efeitos do tratamento com meio condicionado em cultura primária de tenócitos na recuperação funcional da marcha.....	45
Figura 12 – Fotomicrografias representativas do efeito do tratamento com meio condicionado em cultura primária de tenócitos na organização tecidual em 7, 14 e 21 dias pós-lesão.....	47
Figura 13 – Efeitos do tratamento com meio condicionado de tenócitos na sensibilidade mecânica dos camundongos.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CMF – Calcium Medium Free

COMP - Proteína de matriz oligomérica da cartilagem

CTRL – Grupo Controle

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium

FBS - Fetal Bovine Serum

FGF - Fator de Crescimento fibroblástico

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

IFA – Índice Funcional de Aquilles

IL-1 β - Interleucina 1b

MC – Grupo Meio Condicionado

MMPs – Metaloproteinases

NGF - Fator de Crescimento Nervoso

PDGF - Fator de crescimento derivado de plaquetas

PGs – Proteoglicanos

PLF - Fator de comprimento da pegada

PRP – Plasma enriquecido em plaquetas

TGF - Fator de Crescimento Transformador

TNF- α - Fator de Necrose tumoral

TSF- Fator de espalhamento dos dedos do pé

UFPA – Universidade Federal do Pará

VEGF - Fator de crescimento vascular endotelial

VEIC – Grupo Veículo

SUMÁRIO

1	CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	Tendinopatias	16
2.2	Histologia e fisiologia dos tendões sadios.....	19
2.3	Fisiopatologia da lesão tendínea	22
2.4	Intervenções terapêuticas na lesão tendínea	28
2.5	Terapias Mediadas por células em lesões musculó-esqueléticas.....	29
3	OBJETIVOS	34
3.1	Objetivo geral	34
3.2	Objetivos específicos.....	34
4	MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1	Animais Experimentais	35
4.2	Cultura celular de tenócitos	35
4.3	Suplementação do meio de cultivo celular	36
4.4	Modelo de lesão	36
4.5	Grupos Experimentais	37
4.6	Análise Histológica	38
4.6.1	Cortes histológicos	38
4.6.2	Coloração com Hematoxilina e Eosina.....	39
4.7	Avaliação do Índice Funcional de Aquiles	39
4.8	Avaliação da Sensibilidade Mecânica	41
4.9	Análise Estatística	42
5	RESULTADOS.....	43
5.1	Padronização cultura primária de tenócitos.....	43
5.2	O Tratamento com meio condicionado em cultura primária de tenócitos induz melhora funcional em camundongos tenotomizados	44
5.3	O Tratamento com meio condicionado em cultura primária de tenócitos induz melhora histológica em tendões lesionados	46
5.4	O Tratamento com meio condicionado em cultura primária de tenócitos melhora o limiar de sensibilidade mecânica em camundongos tenotomizados	48

6	DISCUSSÃO	50
7	CONCLUSÕES	56
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os tendões são tecidos que compõem o sistema musculoesquelético e fornecem estabilidade à articulação durante a realização de diferentes movimentos, conectando e facilitando a transferência de carga entre o músculo e osso (KANNUS, 2000). As lesões tendíneas, conhecidas como tendinopatias, são distúrbios musculoesqueléticos comuns que afetam um amplo espectro da sociedade (LIPMAN et al., 2018; RILEY, 2004).

A complexidade estrutural do tecido tendíneo, peculiaridades teciduais e a falta de compreensão do mecanismo exato que ocasiona as lesões desse tecido têm sido grandes obstáculos para o desenvolvimento de métodos e terapias eficazes na reabilitação destas lesões (LIPMAN et al., 2018). As diferentes complexidades do quadro clínico e múltiplos fatores que podem desencadear as lesões também são apontados como possíveis obstáculos para o processo de tratamento dessas doenças (LINDERMAN et al., 2016; RILEY, 2008). Por isso, pesquisas direcionadas ao estudo das tendinopatias tem sido desenvolvidas dentro da área das terapias regenerativas (NIXON; WATTS; SCHNABEL, 2012a; PAREDES; ANDARAWIS-PURI, 2016).

Nesse sentido, diversas abordagens terapêuticas vêm sendo testadas. No entanto, os resultados de tais intervenções ainda não são suficientes para possibilitar uma recuperação satisfatória. Visto que, a persistência do quadro algico e ocorrências de novas lesões teciduais são muito prevalentes, assim como o surgimento de outras lesões degenerativas em tecidos circundantes decorrentes de sobrecargas por compensações (COOK; KHAN; PURDAM, 2002; RILEY, 2004). Deste modo, torna-se evidente a necessidade de mais estratégias direcionadas para esse campo de pesquisa.

Muitos estudos se direcionam para compreensão das alterações estruturais, funcionais e dos fatores que modulam a manutenção das injúrias tendíneas (REES; MAFFULLI; COOK, 2009; RILEY, 2008). Entretanto, acreditamos que estes também

devem se voltar para a busca de estratégias terapêuticas a fim de beneficiar os indivíduos lesionados e promover uma recuperação mais rápida e eficaz.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 TENDINOPATIAS

As tendinopatias são definidas como lesões que afetam os tendões e que possuem como principal característica a dor e degeneração tecidual (REES; MAFFULLI; COOK, 2009). Os diagnósticos variam do menos grave - representado por quadro inflamatório e ruptura parcial ocorrida mais frequentemente - até o mais grave, cuja ruptura total é observada e ganha maiores proporções ao apresentar limitações no movimento nos indivíduos acometidos (XU; MURRELL, 2008a). A lesão é associada a tecidos que estão expostos à altas cargas mecânicas. Por isso, os tendões mais acometidos por essas lesões são: tibial posterior, cabeça longa do bíceps braquial, patelar, manguito rotador e tendão calcâneo (ou de Aquiles) (COOK; KHAN; PURDAM, 2002).

Apesar de não existirem dados consistentes acerca da prevalência dessas lesões na população em geral, alguns levantamentos epidemiológicos direcionados a compreensão da incidência de lesões entre atletas demonstram que essas lesões são comuns em indivíduos que realizam diferentes modalidades esportivas de forma profissional ou recreativa (CLARK et al., 2020; MAFFULLI; WONG; ALMEKINDERS, 2003).

Um estudo realizado no Reino Unido evidenciou que a ruptura do tendão calcâneo tem incidência de 11,3 casos por 100.000 pessoas por ano (CLAYTON & COURT-BROWN, 2002). Em um estudo epidemiológico, foram verificadas altas taxas de lesões principalmente em atletas, de modo que 68% apresentavam tendinopatia do tendão calcâneo, enquanto 3% relataram a ruptura completa. Atualmente, estima-se que as tendinopatias possuam incidência de 30 a 50% entre todas as lesões no esporte (DE JONGE et al., 2011; MAFFULLI; WONG; ALMEKINDERS, 2003; SCOTT et al., 2013).

As tendinopatias podem ser induzidas por um processo inflamatório, gerando alterações que podem se manifestar de forma aguda ou crônica (EGGER; BERKOWITZ, 2017). Essas lesões estão mais associadas a indivíduos que são expostos a altas cargas mecânicas e ao uso excessivo dessa estrutura, que o predispõe a microrrupturas tornando esse tecido susceptível a lesões. Uma consequência comum da tendinopatia do tendão de Aquiles, é a ruptura deste tecido que pode ocorrer de forma parcial ou total (RILEY et al., 2002; KNAPIK, POPE, 2020).

A etiologia da doença ainda não está totalmente caracterizada e muitos agentes atribuídos à injúria ainda são classificados apenas como hipóteses. Os principais fatores associados à lesão são comumente divididos entre fatores intrínsecos ou extrínsecos, porém, a interação entre esses dois fatores é comumente observada no surgimento da doença. Fatores extrínsecos como idade, obesidade, uso excessivo e sobrecarga do tendão podem acabar induzindo inflamação e alterações degenerativas que eventualmente podem ocasionar o quadro (KANNUS, 2000; REES; MAFFULLI; COOK, 2009).

As causas intrínsecas envolvidas no processo de degeneração da matriz ainda vêm sendo teorizadas sob diversas hipóteses, como hipóxia, dano isquêmico, estresse oxidativo, predisposição genética, hipertermia, ativação de mediadores inflamatórios entre outros. Considerando que a interação entre múltiplos fatores é mais comum no desenvolvimento do quadro clínico se faz necessário uma investigação mais cuidadosa e compreensão da progressão da injúria para criação de estratégias terapêuticas mais eficazes (KANNUS, 2000; PUFE ET AL., 2005; SHARMA; MAFFULLI, 2006).

Além de possuir uma etiologia complexa e pouco elucidada, e recuperação pós lesão torna-se mais complicada devido algumas peculiaridades do tecido tendíneo (REES; WILSON; WOLMAN, 2006). Devido sua baixa vascularização, oxigenação e nutrição seu processo de reparo torna-se lento e frequentemente acompanhado de intenso quadro álgico. Frente a lesão, o tendão cuja matriz é composta majoritariamente por feixes de fibras de colágeno que se organizam de forma paralela, torna-se desorganizado, com uma perda drástica do colágeno tipo I e aumento da quantidade de vasos e inervação local (Figura 01). Para uma melhor compreensão das demais mudanças decorrentes da lesão ao tecido tendíneo, é necessário primeiramente explanar as características do tecido sadio (DORAL et al., 2010; EGGER; BERKOWITZ, 2017; XU; MURRELL, 2008a, 2008b).

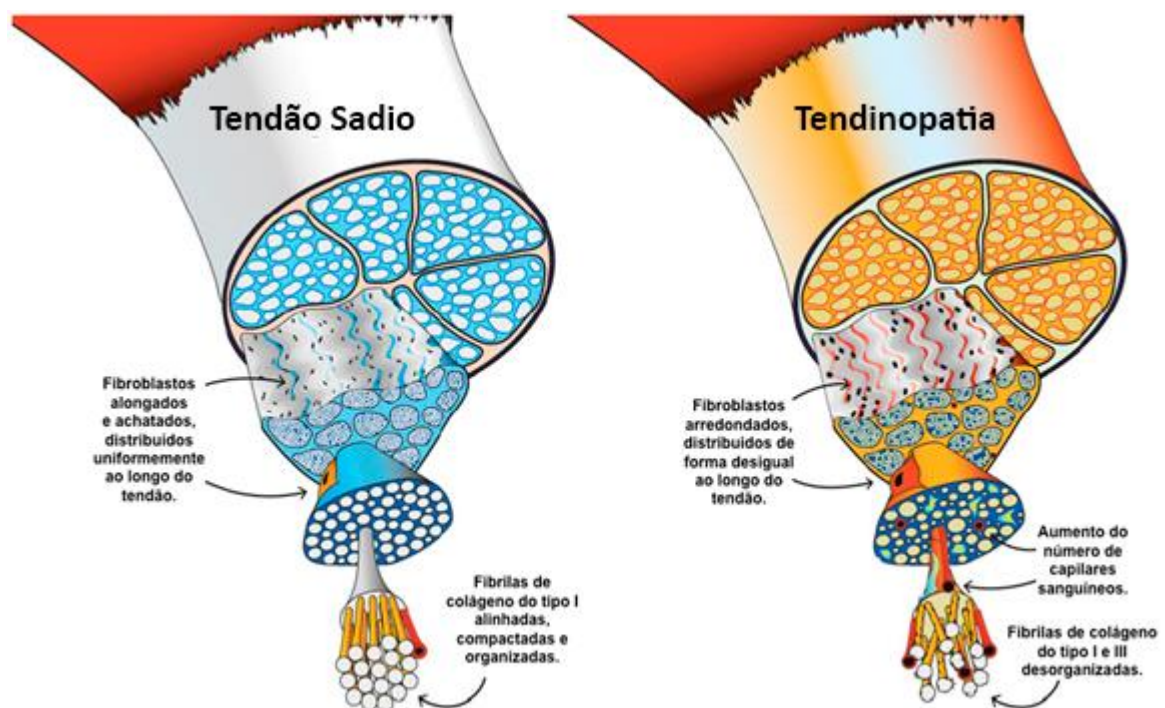


Figura 01 – Representação esquemática das diferenças histológicas e estruturais observadas no tecido tendíneo entre o tendão saudável e o tendão lesionado. Fonte: Adaptado, acesso em: www.msdlatinamerica.com

2.2 HISTOLOGIA E FISIOLOGIA DOS TENDÕES SADIOS

O tendão é tecido conjuntivo composto essencialmente por fibras de colágeno e é a estrutura anatômica e funcional que liga a superfície óssea - o periósteo - ao músculo, na sua fáscia. Apresentam uma textura fibroelástica e composição predominante de colágeno, tenócitos - fibroblastos especializados do tendão, proteoglicanos e glicoproteínas (DORAL et al., 2010; KANNUS, 2000; SHARMA; MAFFULLI, 2006).

O colágeno que compõe a matriz do tendão corresponde a 65 a 80% da massa do peso seco do tecido, dos quais, 95% é de colágeno tipo I, característico por atribuir resistência e elasticidade aos tecidos que compõe, e os 5% restante de colágeno do tipo III, IV e V. A matriz extracelular também inclui a proteína elastina, estimada entre 2 a 5% e que confere grande capacidade elástica e de deformação ao tecido (DEL BUONO; CHAN; MAFFULLI, 2013; SHARMA; MAFFULLI, 2006).

Os feixes de fibras que compõem o tendão resultam da união de fibrilas de colágeno individuais que se organizam de forma hierárquica. As fibras de colágeno são arranjadas em fascículos que serão envoltos pelo endotendão, uma fina rede de tecido conectivo localizada mais internamente. Mais externamente, estes serão envoltos pelo epitendão - uma camada fina de tecido conjuntivo que contém o suprimento vascular, linfático e neural do tecido. A unidade de tendão é rodeada pelo tecido conjuntivo chamado paratendão o qual possui uma camada interna de líquido sinovial que protege o tecido evita a fricção contra tecidos circundantes (COOK; KHAN; PURDAM, 2002; O'BRIEN, 2005).

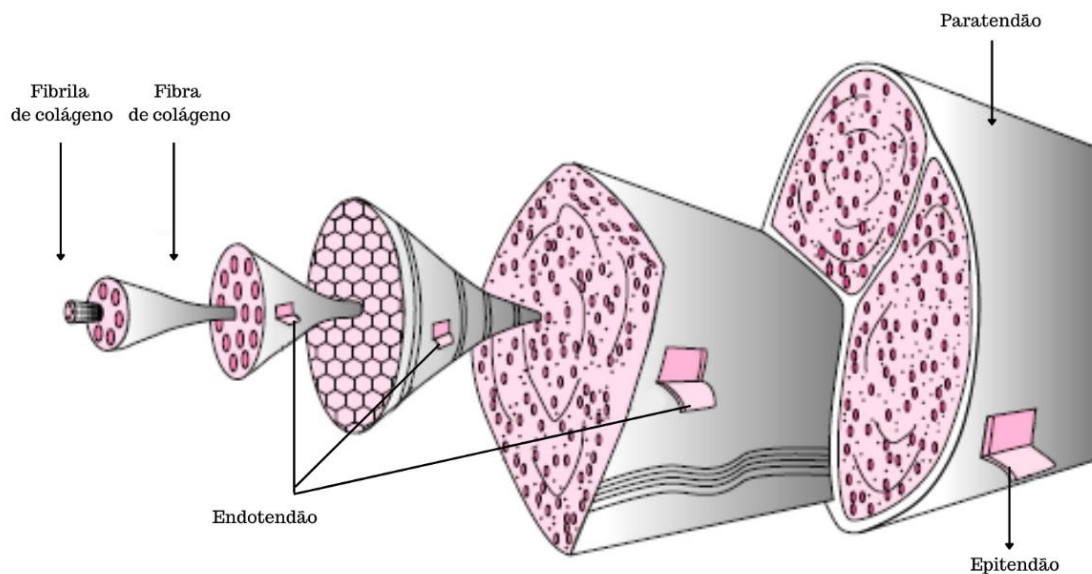


Figura 02 – Ilustração representativa entre as fibras de colágeno, fascículos, unidades do tendão e tecidos circundante que compõem a estrutura e organização do tecido tendíneo. Fonte: Khan, 1999. Adaptado.

O componente celular é formado por tenócitos e tenoblastos em até 95% dos seus elementos. Os tenoblastos são células imaturas que possuem diferentes formas e tamanhos, alguns são alongados, outros arredondados ou poligonais. Com o amadurecimento dessas células, todas tornam-se semelhantes apresentando forma de fuso e, a partir de então, são denominadas tenócitos. Essas células estão dispostas entre as fibras de colágeno em pouca quantidade em cadeias longas e paralelas. Os tenócitos possuem como principal função a síntese da matriz colágena que compõe o tecido tendíneo (DEL BUONO; CHAN; MAFFULLI, 2013; LUI, 2013).

A regulação das atividades celulares é feita pelos proteoglicanos (PGs), que representam cerca de 1% da composição do tecido. Além dos PGs a matriz não colágena também é composta por outras moléculas de glicoproteínas, como proteína de matriz oligomérica da cartilagem (COMP), lubricina e a tenascina-C. Embora estas proteínas não colagenosas sejam conhecidas por estarem presentes no tendão, há

relativamente pouco conhecimento da localização precisa ou a função de proteínas específicas no interior da matriz extracelular de tendão (SMITH *et al*, 1997; KINSELLA *et al*, 2004; YOON; HALPER, 2005; SCHAEFER; IOZZO, 2008; SAMIRIC, 2009; THORPE, 2013).

O tendão é pouco vascularizado, sua vascularização se dá por dois meios principais: o sistema muscular intrínseco da junção músculo-tendínea e um sistema vascular extrínseco no paratendão. Na junção músculo tendínea, vasos sanguíneos provenientes do perímio dos ventres musculares adentram o tendão para suprir o tecido. De maneira geral, a vascularização do tecido tendíneo não é homogênea e tendões de maiores proporções possuem seu terço médio menos suprido. Essa área de vascularização diminuída coincide com as principais áreas de lesão, uma vez que a ausência de um suprimento sanguíneo adequado pode propiciar o desenvolvimento de alterações degenerativas (ANDERSSON *et al.*, 2011; DE JONGE *et al.*, 2011; KANNUS, 2000; PUFE *et al.*, 2005).

A inervação tendínea se dá por ramos nervosos provenientes dos tecidos cutâneo e muscular que adentram o tecido tendíneo. As terminações nervosas mielinizadas atuam como mecanorreceptores, especializados em detectar mudanças na pressão ou tensão. Já as fibras não mielinizadas agem como nociceptores que detectam e transmitem informação de dor. Deste modo, já é evidenciado que frente a lesão o apresenta-se com uma maior quantidade de nervos e este aumento está associado a dor característica da injúria (FREDBERG; STENGAARD-PEDERSEN, 2008; LIAN *et al.*, 2006).

Com exceção de alguns grupos musculares específicos, toda a tensão produzida nos músculos é transmitida pelos tendões até os ossos com a finalidade de gerar o movimento articular. Além disso, este possui a capacidade de absorver grandes choques e proteger músculos de possíveis estiramentos. Para isso, o tendão é dotado de uma grande resistência a cargas mecânicas e grande função proprioceptiva, possuem terminais nervosos como os corpúsculos de Ruffini (tipo I), corpúsculos de Vater-Pacini (tipo II), órgão tendinoso de Golgi (tipo III) e terminações

nervosas livres (tipo IV). Dessa forma, o tendão é sensível à pressão, tensão, aceleração e desaceleração e dor (ABATE *et al.*, 2009) funções que garantem a funcionalidade biomecânica do tendão sem gerar impactos nocivos à sua estrutura. (BIRCH, 2007a; DORAL *et al.*, 2010; SILBERNAGEL *et al.*, 2006; THORPE *et al.*, 2013)

Quando submetido a altas cargas, juntamente com outros fatores, o tendão fica passível a ocorrências de lesões (SHARMA; MAFFULLI, 2006). Por isso, os mais acometidos são aqueles expostos a grandes sobrecargas mecânicas, sendo as lesões no tendão calcâneo as de maior incidência e foco de nossa proposta. O processo de reparo após a lesão implica em alterações bioquímicas, histológicas e funcionais que demandam semanas e são fundamentais para a recuperação desse tecido (RILEY, 2008).

2.3 FISIOPATOLOGIA DA LESÃO TENDÍNEA

Frente a lesão tendínea, visualmente, o tendão lesionado apresenta-se em aspecto opaco e acinzentado. O processo de reparo inicia logo após a ocorrência da lesão, na presença de vários mediadores que chegam ao local para atuar especificamente na reconstituição do tecido, como enzimas, metaloproteinases (MMPs), neurotransmissores, neuropeptídeos, fatores de crescimento entre outros (ABATE *et al.*, 2009; ANDERSSON *et al.*, 2011; FARCIC, 2011; MORAES *et al.*, 2013; RILEY, 2008).

Inicialmente, as principais mudanças ocorridas ao tecido refletem-se no dano das fibras colágenas, que se tornam desorganizadas e com mudanças em seu diâmetro e orientação. Microscopicamente, é possível delinear três fases histológicas distintas. Entretanto, nos períodos de transição algumas características podem se sobrepor (COOK; KHAN; PURDAM, 2002).

Na fase inicial, denominada fase inflamatória (0 a 2 semanas), monócitos e macrófagos se introduzem no local da lesão. Logo após o trauma, inicia-se uma

resposta vascular intensa, primeiramente com uma vasoconstricção por ação da contração do endotélio seguida de vasodilatação que promove a chegada de células inflamatórias para o local. Com isso, ocorre alteração da permeabilidade vascular formando o edema - característico da inflamação aguda (FREDBERG; STENGAARD-PEDERSEN, 2008; XU; MURRELL, 2008a).

Os macrófagos que se introduzem na lesão iniciam a atividade fagocítica e a expressão de agentes pró- inflamatórias como Interleucina 1b (IL-1 β), o Fator de Necrose tumoral (TNF- α) e outras citocinas que destroem a matriz extracelular. Com o aumento da permeabilidade vascular ocorrem a liberação de fatores vasoativos e quimiotáticos. Além disso, observa-se grande perda de tecido conectivo que se reflete especialmente na desorganização da matriz colágena (FREDBERG; STENGAARD-PEDERSEN, 2008; RILEY, 2008; XU; MURRELL, 2008b).

Alguns eventos da fase inflamatória se sobrepõem aos eventos da fase proliferativa (2 a 4 semanas) caracterizada principalmente pela migração de tenócitos e mais células inflamatórias ao local da lesão para então iniciar a síntese de colágeno e reposição da matriz degradada. Além disso, ocorre angiogênese e as concentrações de glicosaminoglicanos e conteúdo de água nesse estágio permanecem elevados (SHARMA; MAFFULLI, 2006; BRING, 2007; RILEY, 2008).

Após a injúria, especialmente na fase proliferativa, a vascularização local sofre mudanças pela expressão do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), cuja presença fisiológica é pouco evidente. O VEGF é expresso na tentativa de promover a angiogênese com a finalidade de reparo, tornando o tecido hipervascularizado. Paralelamente a vascularização, surgem ramos nervosos que penetram as fibras de colágeno. Com isso, ocorre a expressão de neuropeptídeos sensoriais, como Substância P e Glutamato - ambos relacionados à dor crônica presente na injúria, sugerindo que estes têm um papel importante na regulação do reparo e homeostase do tecido tendíneo (DAKIN; DUDHIA; SMITH, 2014; LIN et al., 2001; SCHIZAS et al., 2010).

A fase de remodelamento (4 a 10 semanas) é iniciada com o objetivo de redimensionar e remodelar o tecido em cicatrização. Nesse estágio, glicosaminoglicanos são sintetizados, ocorre um decréscimo de células e estas apresentam uma forma mais alongada entre os feixes de colágeno, que por sua vez, encontram-se mais organizadas. Uma boa força tensiva pode ser reestabelecida em um período de quatro meses a um ano, variando de acordo com o tendão acometido e gravidade da lesão, porém, acredita-se que a função biomecânica e a morfologia dificilmente atingirão a capacidade e estrutura de um tendão normal (COOK; KHAN; PURDAM, 2002; DAKIN ET AL., 2018; DEAN ET AL., 2016).

Com as alterações ocorridas em sua matriz celular no período de lesão, algumas alterações biomecânicas ocorrem no tendão limitando, principalmente, a funcionalidade dos indivíduos acometidos e manifestando-se especialmente com dor e rigidez (LIPMAN et al., 2018a). Após o quadro de ruptura tendínea a matriz colágena torna-se especialmente comprometida, a organização inadequada das fibras faz com que o tecido seja menos resistente a forças de tração e maiores estiramentos. Esse atributo é bem caracterizado em diversos experimentos biomecânicos que sugerem que o alinhamento adequado das fibras colágenas após a lesão tendínea é essencial para que a função seja reestabelecida (BIRCH, 2007b; DORAL et al., 2010; EGGER; BERKOWITZ, 2017; FRANCHI et al., 2007).

Nesse sentido, pesquisas visando caracterizar as alterações funcionais ocasionadas pelas injúrias são fundamentais para compreensão do desenvolvimento e prognóstico da doença. O estudo da tendinopatia em modelos experimentais tem sido amplamente utilizado para este objetivo, uma vez que, análise de biopsias humanas além de possuírem um alto custo são tradicionalmente provenientes de intervenções cirúrgicas de indivíduos com longo período de evolução. O uso de modelo murino tem representado um modelo eficaz por mostrar compatibilidades bioquímica, histológica e funcional com o tendão humano. A figura 04 ilustra a estrutura do tendão calcâneo de camundongo demonstrando a semelhança anatômica com o tendão calcâneo de humanos (CANTY; KADLER, [S.D.]; DEL BUONO; CHAN; MAFFULLI, 2013; EGGER; BERKOWITZ, 2017).

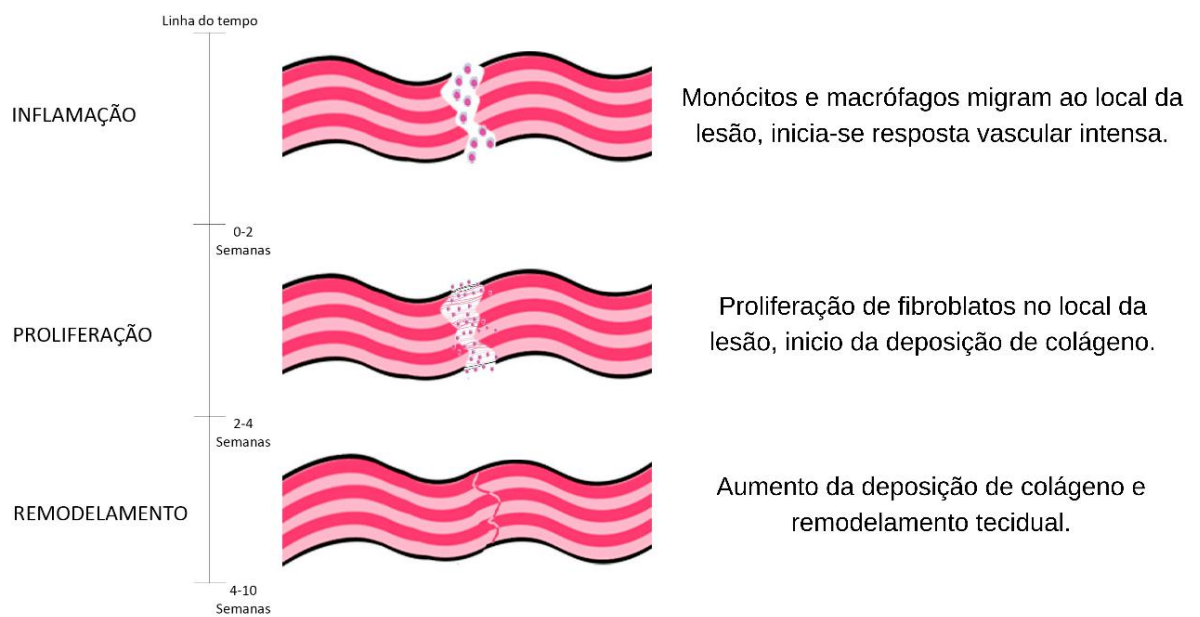


Figura 03 – Ilustração representativa das fases de reparo da lesão tendínea. Fase inflamatória, proliferativa e de remodelamento. Indicação do período que ocorre cada fase e algumas características histológicas encontradas em cada período. Ilustração elaborado pelo próprio autor em Biorender.com

O tempo constituinte das fases de reparo pode variar de acordo com o indivíduo acometido pela lesão (BOSWORTH, 2004). Em humanos, o período que abrange todo processo cicatricial pode variar entre meses e anos. Entretanto, nos modelos animais em que essas lesões são frequentemente estudadas o tempo de reparo apresenta-se mais curto (LUI et al., 2011). No modelo murino, a fase inflamatória e inicial apresenta-se em um período de 0-7 dias. A fase proliferativa pode se interpor a alguns eventos da fase inflamatória e durar de 14-20 dias após a lesão. Enquanto a fase de remodelamento se dá, em média, 21 dias após a lesão (LAKE; ANSORGE; SOSLOWSKY, 2008). Ainda que existam diferenças na progressão

temporal entre humanos e modelos animais, os aspectos de cada fase de reparo permanecem semelhantes (WARDEN, 2007).

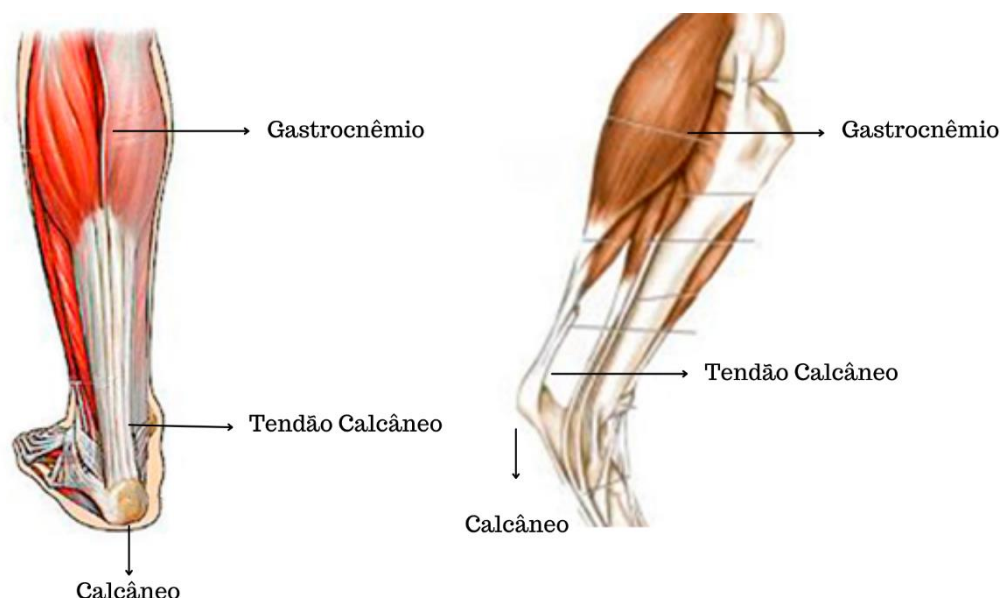


Figura 04 – Comparativo da estrutura anatômica entre tendão calcâneo humano e de modelo murino. Semelhança entre estrutura anatômica e funcional das estruturas do complexo musculotendíneo. Fonte: Adaptado, acesso em www.cram.com.

Diante das alterações ocorridas na matriz colágena decorrentes da injúria, ocorrem transtornos e limitações biomecânicas que podem ser elucidados pelo declínio das propriedades funcionais do tecido (EGGER; BERKOWITZ, 2017; PADANILAM, 2009). Estudos demonstram que as alterações estruturais decorrentes à lesão prejudicam as propriedades e funcionalidade tendínea quando equiparadas a tendões não lesionados (SEREYSKY; FLATOW; ANDARAWIS-PURI, 2013). As pesquisas apontam por exemplo, que após uma lesão no tendão calcâneo a marcha apresentava uma nítida alteração indicada pela diferença de pegada, tornando-se consideravelmente mais longa e estreita no membro afetado (Figura 05). Elucidando como as lesões ao tecido podem ocasionar alterações funcionais significativas (MURRELL et al., 1992)

Para além das alterações biomecânicas, a funcionalidade também pode encontrar-se comprometida devido a sintomatologia do quadro. A dor é o principal sintoma, estando presente independente da gravidade da lesão (ALFREDSON; LORENTZON, 2002). Estudos apontam que mesmo passado o tempo correspondente a recuperação total do tecido, o quadro álgico característico da lesão pode permanecer manifestando-se de forma crônica durante meses ou até anos(ALFREDSON; LORENTZON, 2002; FRANKLIN et al., 2014; FREDBERG; STENGAARD-PEDERSEN, 2008).

As pesquisas sustentam a afirmativa de que o tendão uma vez lesionado, sofre alterações em sua estrutura que o deixam mais suscetíveis a novas lesões, mesmo após a aplicação dos tratamentos (ALONSO, 2021; GONÇALVES et al., 2013). Por isso, estudos direcionados para elaboração e investigação de tratamentos mais eficazes tornam-se cada vez mais abundantes e necessários na criação de estratégias mais efetivas aos métodos comumente utilizados.



Figura 05 – Diferença na pegada durante a marcha livre de animais sadios e com lesão tendínea em fase inicial. A; Padrão da pegada durante a marcha de um animal não lesionado. B: Padrão de pegada durante a marcha de um animal frente a lesão experimental. Fonte: Adaptado Murrel et al., 1994.

2.4 INTERVENÇÕES TERAPÊUTICAS NA LESÃO TENDÍNEA

A reconstituição da matriz colágena, reestabelecimento das funções do tecido e diminuição do quadro algico característico da lesão, constituem os principais objetivos de tratamento no manejo das lesões tendíneas. Devido as peculiaridades já apresentadas do tecido tendíneo, uma avaliação e intervenção terapêutica adequada são imprescindíveis para estabelecer estratégias que alcancem tais objetivos (BIRCH, 2007a; XU; MURRELL, 2008a).

Ainda que existam diferenças na progressão da doença de acordo com a gravidade da lesão, existem práticas terapêuticas frequentemente utilizadas. Dentre elas, a imobilização e uso de anti-inflamatórios locais ou orais ainda são as mais comuns, especialmente nos períodos iniciais da lesão (PAREDES; ANDARAWIS-PURI, 2016; RILEY, 2008).

Já é descrito que após um trauma ou lesão tendinosa, ocorre um extravasamento de exsudado fibrinoso para fora do tecido. Com o membro imobilizado por um período prolongado, esse exsudato rico em proteína e fibrina se organiza dificultando o deslizamento das partes moles e devido a proliferação fibroblástica, resulta em uma aderência tendinosa (RILEY, 2004). As aderências ocasionam limitações articulares e prejuízo no mecanismo de deslizamento dos tendões, comprometendo a biomecânica tecidual e o deixando suscetíveis a novas lesões (BRING et al., 2009; CANTY; KADLER, [s.d.]; DORAL et al., 2010; FRANCHI et al., 2007).

Existem várias propostas terapêuticas não farmacológicas utilizadas no reparo das lesões tendíneas. Tais terapias incluem as diferentes modalidades de eletroterapias, exercícios excêntricos e injeções de terapias como o plasma enriquecido em plaquetas (PRP). A aplicabilidade dessas terapias varia de acordo com os objetivos do tratamento e período de intervenção na lesão (PAREDES; ANDARAWIS-PURI, 2016). Entretanto, nenhuma terapia isolada foi consistentemente mais eficaz do que as outras (LEONG 2020; PETROU et al., 2014). Acredita-se que

isso ocorra devido à complexidade que envolve patogênese da tendinopatia e evidências científicas limitadas e conflitantes sobre qual seria o melhor manejo ou período mais adequado para aplicação dos tratamentos atualmente disponíveis.

Por isso, as pesquisas direcionam-se cada vez mais ao desenvolvimento de propostas que otimizem o tempo de reparo reestabelecendo adequadamente as funções do tecido (REES; WILSON; WOLMAN, 2006). Nesse contexto, o uso de terapias mediadas por células no manejo terapêutico de lesões musculoesqueléticas tem se destacado nas últimas décadas, especialmente na prática esportiva tornando-se uma estratégia promissora da reabilitação de diferentes injúrias.

2.5 TERAPIAS MEDIADAS POR CÉLULAS EM LESÕES MUSCULOESQUELÉTICAS

As terapias mediadas por células são definidas como um conjunto de métodos e abordagens que visam a utilização de células e seus produtos para o reparo de inúmeras doenças sem tratamento específico ou efetivo (KASSEM et al., 2004; ZAGO et al, 2006). Por meio de uma abordagem terapêutica, as terapias mediadas por células visam a recuperação e ou regeneração de tecidos mediante o uso de diferentes tipos celulares, grupos de células, fatores de crescimento, biomateriais ou enxertos biológicos que permitem ao próprio organismo reparar tecidos lesionados (KASSEM; KRISTIANSEN; ABDALLAH, 2004; ZAKRZEWSKI et al., 2019).

Seu uso na prática clínica começou a ganhar destaque após ser evidenciado através de modelos experimentais que sua utilização promove uma cicatrização mais rápida e eficaz para diferentes lesões (PETROU et al., 2014). Essa modalidade terapêutica tornou-se objeto de investigação de diversos estudos. Destacando-se, especialmente, nas diferentes modalidades de medicina regenerativa, com a perspectiva que seu uso em uma área de lesão iriam acelerar o metabolismo celular, liberar uma grande quantidade de fatores de crescimento locais e

consequentemente estimular a cicatrização e uma recuperação precoce (NIXON; WATTS; SCHNABEL, 2012; OLIVEIRA; LUÍS; EDITORS, 2017).

A aplicação destas modalidades terapêuticas se dá por diferentes maneiras sendo possível realizar a injeção direta de células ou grupo de células ao local da lesão (GASPAR et al., 2015b; NIXON; WATTS; SCHNABEL, 2012b). Tal como, a utilização de enxertos, biomateriais e meio condicionados que também se constituem de modalidades desenvolvidas pelas terapias medidas por células. A escolha do material e modo de aplicação varia de acordo com os objetivos e peculiaridades de cada lesão (GASPAR et al., 2015b; GREINER; LAWTON; VOSS, 2022; KASSEM; KRISTIANSEN; ABDALLAH, 2004).

A utilização de terapias mediadas por células ganha destaque em estudos direcionados ao tratamento de lesões esportivas (NÖTH et al., 2010). Visto que, essas injúrias frequentemente acometem tecidos que são expostos a grandes cargas mecânicas e que possuem um processo de reparo mais lento, como articulações, ligamentos e tendões (BROWN et al., 2013).

Em lesões musculoesqueléticas, algumas práticas de terapias mediadas por células ganham mais destaque. Tal como a injeção de células autólogas, que compõem uma vasta gama de tratamentos atualmente em uso para o reparo de lesões desse sistema. Já foi evidenciado que a aplicação celular ao local da lesão é capaz de atenuar o processo inflamatório, acelerar o processo de reparo e estimular a cicatrização tecidual em diferentes lesões musculoesqueléticas (BURKE et al., 2016; CHEN et al., 2011a; GASPAR et al., 2015a; PETROU et al., 2014).

Carmona et al, 2009 evidenciou que aplicação de células autólogas do plasma sanguíneo diminuiu o processo inflamatório e apresentou melhoras significativas no derrame articular de cavalos com osteoartrite. Falanga et al., demonstrou que a aplicação de células tronco mesenquimais acelerou o processo de reparo e diminuiu a quantidade de mediadores inflamatórios em modelo de lesão tendínea em camundongos. (CARMONA et al., 2009; FALANGA et al., 2007;

JAVAZON et al., 2007) Tais dados evidenciam, a efetividade desta modalidade terapêutica em injúrias do sistema musculoesquelético.

Ainda que, bons resultados nas terapias mediadas por células já tenham sido descritos, existem eventos adversos decorrentes deste tipo de terapia. As recusas teciduais frente a aplicação de células ao local da lesão se manifestam com a presença de inflamação local e possível presença aderências cicatriciais (GREINER; LAWTON; VOSS, 2022). Estes eventos ocorrem, especialmente, frente a escolha de células não diferenciadas e não autólogas ao indivíduo que receberá o tratamento (GASPAR et al., 2015a).

Com objetivo de reduzir possíveis complicações e efeitos colaterais da terapia celular, estudos direcionaram-se para o desenvolvimento de abordagens que empregam apenas fatores solúveis produzidos por células e que poderiam contribuir diretamente para o reparo tecidual (GREINER; LAWTON; VOSS, 2022; NÖTH et al., 2010). Após alguns dias de cultivo in vitro, cada população de células libera fatores tróficos no meio, que é chamado de meio condicionado (MC). Estes fatores contidos no meio condicionado poderiam iniciar eventos de sinalização regenerativa, sem o uso ou aplicação direta de células ao local da lesão (VERONESI et al., 2018).

Nesse sentido, o uso de meio condicionado por células apresenta algumas vantagens perante a aplicação direta destas. Primeiramente, nos meios condicionados preconiza-se a utilização de substratos fornecidos pelas células como fatores de crescimento e citocinas. Reduzindo assim, possíveis recusas teciduais. Além disso, como não há necessidade de estoque celular, há uma redução de custos que facilitam a replicação da prática (BOGATCHEVA; COLEMAN, 2019a; PLATAS et al., 2013; VERONESI et al., 2018).

Uma vez que, nas terapias mediadas por células é importante manter as características fenotípicas de seus tecidos de origem, priorizam-se formas de cultivos que agridam minimamente a conformação e diferenciação celular. Por isso, as culturas do tipo explante destacam-se por manter aspectos que se assemelham mais

aos tecidos in vivo. Já que, com a ausência de dissociações, os substratos oferecidos pelas células cultivadas permanecem mais íntegros (HENDIJANI, 2017; YOON et al., 2013).

Diante da variabilidade de materiais celulares e diferentes modos de aplicação, a escolha do material que será a base das terapias mediadas por células é fundamental para um bom prognóstico e boa recuperação tecidual (NÖTH et al., 2010). Estudos apontam que os fibroblastos desempenham papéis importantes na recuperação de diferentes tecidos do sistema musculoesquelético, que abrangem tecidos como osso, cartilagem, músculos, ligamentos e tendões. Com sua boa capacidade de diferenciação, essas células tem função de sintetizar e depositar componentes da matriz, permitindo o reparo do tecido acometido. Por isso, são preconizadas nas terapias mediadas por células em lesões de tecidos musculoesqueléticos (COSTA-ALMEIDA; SOARES; GRANJA, 2018).

Os tenócitos, fibroblastos diferenciados do tecido tendíneo, além de serem as principais células responsáveis pela realização da síntese da matriz colágena do tendão, já são evidenciados como fontes de fatores de crescimento e citocinas que podem contribuir diretamente para o reparo tecidual deste tecido. Nestes, destacam-se o Fator de crescimento vascular e endotelial (VEGF); Fator de Crescimento Transformador (TGF); Fator de Crescimento fibroblástico básico (FGF); Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o Fator de Crescimento Nervoso (NGF) (GONÇALVES et al., 2013; MOLLOY; WANG; MURRELL, 2003).

Ao contexto da lesão tendínea, com a maior quantidade de tenócitos locais afim de reestabelecer a matriz extracelular, há também um aumento de diferentes fatores de crescimento (GONÇALVES et al., 2013). Estes desempenham papéis em todas as fases de reparo e atingem seu pico na fase proliferativa. O aumento do VEGF local estimula a angiogênese para fornecer as células nutrientes e fatores de crescimento adicionais para a área da lesão. O TGF- β é responsável por regular a atividade de proteinases e estimular a produção de colágeno enquanto o FGF e PDGF estimulam a proliferação celular e o reestabelecimento da matriz colágena

degradada(MOLLOY; WANG; MURRELL, 2003). A regulação da expressão desses fatores de crescimento é realizada por macrófagos, recrutados ao tecido em consequência a lesão, e, majoritariamente, por tenócitos locais (COSTA-ALMEIDA; SOARES; GRANJA, 2018).

Já é evidenciado que os tenócitos participam ativamente do reparo de tendinopatias, desempenhando diversas funções para manutenção da homeostase e restauração tendínea. Alguns estudos já demonstraram que a aplicação dessas células autólogas contribui para uma melhor recuperação em alguns modelos de tendinopatia (BUCHER et al., 2017a; CHEN et al., 2011b). Entretanto, não existem evidências sobre a eficácia dos substratos celulares liberados por estas células na recuperação de lesões tendíneas. O presente trabalho propõe avaliar os efeitos do tratamento com um meio condicionado por essas células no reparo tendíneo.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do tratamento local com meio condicionado em culturas primárias de tenócitos no reparo tendíneo em modelo de lesão total do tendão calcâneo de camundongos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar a cultura primária de tenócitos de camundongos da linhagem Suíço (P1 e P2)
- Avaliar o efeito do tratamento local com meio condicionado em cultura primária de tenócitos no desempenho funcional da marcha através do Índice Funcional de Aquiles em 7, 14 e 21 dias após a lesão;
- Avaliar o efeito do tratamento local com meio condicionado em cultura primária de tenócitos na organização tecidual em 7, 14 e 21 dias após a lesão;
- Analisar o efeito do tratamento local com meio condicionado em cultura primária de tenócitos na sensibilidade tátil com filamentos de Von Frey em 7,14 e 21 dias após a lesão.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Para o desenvolvimento da pesquisa, o presente trabalho foi dividido em dois momentos: primeiramente, as células tendíneas foram cultivadas *in vitro* para posteriormente serem utilizadas como base da intervenção terapêutica proposta no modelo de tendinopatia.

4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Para cultivo celular *in vitro* das células derivadas do tendão foram utilizados camundongos da linhagem *Swiss* com 1 a 2 dias pós-natal, adquiridos do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal do Pará (UFPA). Para análise da eficácia do tratamento *in vivo* foram utilizados 36 camundongos jovens adultos, com massa corporal na faixa de 30 ± 5 g provenientes do biotério central do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará (ICB-UFPA). Os animais permaneceram em gaiolas de polipropileno padrão, mantidas em ambiente controlado com ciclo claro/escuro de 12 horas, além de receberem água e ração à vontade. Todos os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Pará (CEUA UFPA 4512080418).

4.2 CULTURA CELULAR DE TENÓCITOS

Para cultivo celular de tenócitos, foi utilizado o protocolo adaptado proposto por Wunderli *et al.*, 2019 (WUNDERLI; BLACHE; SNEDEKER, 2020). Após anestesia, os animais foram decapitados na base do forame magno, e em seguida, ambos os tendões calcâneos foram dissecados para então serem dispostos em solução de CMF (meio livre de cálcio e magnésio). Por tratar-se de um modelo de cultivo do tipo explante, os tecidos não foram submetidos a nenhum tipo de dissociação química ou mecânica. Uma vez separados das demais estruturas adjacentes, os tecidos foram transferidos inteiramente para uma placa de cultura estéril onde foram adicionados 6/ml de meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com 10% de Fetal Bovine Serum (FBS). As culturas permaneceram incubadas em

estufa a 37°C, com atmosfera constituída de 95% de ar e 5% de CO₂. O meio foi trocado a cada dois ou três dias durante dez dias de cultivo, tempo necessário para que as culturas atingissem total confluência celular.

4.3 CONDICIONAMENTO DO MEIO DE CULTIVO CELULAR

Para condicionamento do meio de cultivo que posteriormente será aplicado como tratamento, utilizamos o protocolo adaptado de Veronesi *et al.*, 2018. Para isso, após 10 dias, o meio de cultivo foi removido totalmente para então adicionar-se 6ml de DMEM sem soro ou qualquer outro tipo de suplementação durante 6h, para que, seu condicionamento seja realizado pelas próprias células tendíneas. Posteriormente, este meio foi retirado e centrifugado durante 5 minutos em 1500/rpm. O sobrenadante foi recolhido e estocado em -40°C até o momento de sua aplicação como tratamento *in situ*.

4.4 MODELO DE LESÃO

Para simular a lesão tendínea, foi realizado o modelo de lesão experimental utilizado por Souza *et al.*, 2019 de cirurgia de tenotomia seguida de sutura. Os animais foram anestesiados com ketamina 10% (40mg/kg) e cloridrato de xilazina a 2% (10mg/kg) com aplicação intraperitoneal. A pele sobre a região dorsal da tíbia do membro posterior direito foi tricotomizada manualmente.

Após assepsia local, foi realizada uma incisão longitudinal na pele acima da inserção calcânea para ter acesso ao tendão do tríceps-sural e isolá-lo. Após a dissecação foi realizada a sutura simples, ocorrida antes da ruptura devido ao tamanho pequeno do tecido. O mesmo foi seccionado totalmente por cisalhamento transversal. Posteriormente, o tendão e a pele foram suturados com fio de poliamida monofilamento não absorvível número 4.0, e submetidos novamente à assepsia local, como demonstrado na figura 06. Após a lesão não houve nenhuma restrição ou imobilização do segmento, apenas higienização diária com solução fisiológica até a cicatrização da pele

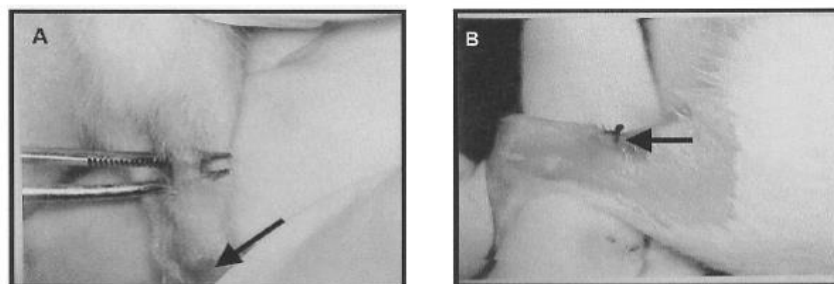


Figura 06 – Imagem representativa do modelo de lesão no tendão calcâneo. A: Acesso ao tendão calcâneo e separação das demais estruturas adjacentes. B: Representação de sutura após tenotomia do tecido. Fonte: ARRUDA, 2007.

4.5 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Esta pesquisa propõe três grupos experimentais divididos igualmente de acordo com o tratamento local recebido. O primeiro foi composto pelos animais que foram submetidos a tenotomia do tendão calcâneo e receberam tratamento *in situ* com solução salina 0,9% (SAL). Os que receberam tratamento com meio cultivo celular DMEM, sem nenhum tipo de suplementação, compuseram o grupo DMEM (DMEM) e aqueles que receberam tratamento com meio condicionado em cultura primária de tenócitos compuseram o grupo Meio Condicionado (MC). Todos foram comparados ao grupo controle (CTRL), composto por animais que não foram submetidos a nenhum tipo de intervenção cirúrgica.

GRUPO	TRATAMENTO LOCAL
Salina (SAL)	10/ μ l de solução salina 0,9%
DMEM (DMEM)	10/ μ l de Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) sem suplementação.
Meio condicionado (MC)	10/ μ l de meio condicionado em cultura primária de tenócitos

O volume de 10/ μ l de cada solução foi administrado na região peritendínea com uma seringa calibre 26G a cada dois dias a partir do 2º dia pós-lesão, estendendo-se até o 20º dia. Para que, deste modo, as injeções perdurem todas as fases constituintes do reparo tendíneo no modelo experimental. No 7º, 14º ou 21º dia, os animais foram anestesiados e sacrificados por deslocamento cervical, conforme demonstrado abaixo no delineamento experimental (Figura 07)

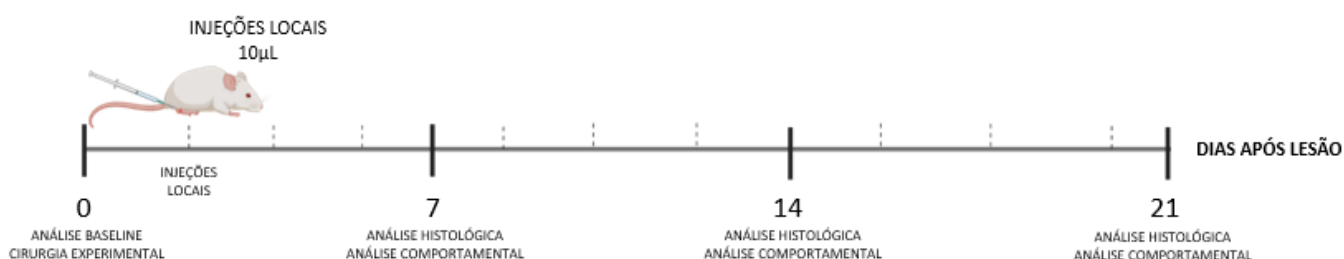


Figura 07 – Imagem esquemática do desenho experimental desenvolvido. As análises de baseline foram realizadas antes da cirurgia experimental. Após isso, os animais receberam os tratamentos locais a cada dois dias após a lesão. As análises histológicas foram realizadas em 7, 14 e 21 dias após lesão. Ilustração elaborada pelo próprio autor em Biorender.com

4.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA

4.6.1 Cortes histológicos

Para análise da organização tecidual, os tendões foram destinados ao corte em criostato. Inicialmente, os tecidos foram fixados em paraformaldeído 4% por 12 horas e em seguida lavados em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4, por 3 vezes. As amostras foram armazenadas e mantidas em tampão fosfato a 4°C. 24h antes da execução dos cortes, o tecido passou por processo de crioproteção em soluções crescentes de sacarose (10%, 20% e 30%) em temperatura ambiente e depois mantidos na solução a 30% até o momento da criomicrotomia.

Após a crioproteção, o material foi embebido em Tissue Tek® (Sakura Finetek, Inc., Califórnia, USA) para ser cortado em 7µm de espessura com orientação longitudinal em criostato (Leica, CM3050 S) ajustado para -24°C.

Os cortes foram transferidos para lâminas histológicas previamente gelatinizadas sendo mantidas congeladas a -20°C em caixas até o momento do uso.

4.6.2 Coloração com Hematoxilina e Eosina

Na avaliação de organização tecidual, utilizamos a técnica de coloração por hematoxilina e eosina. Para essa coloração as lâminas foram inicialmente imersas em água destilada mantendo-as por 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram imersas em hematoxilina de Harris por 30 segundos e lavadas em água destilada corrente. Após isso, as lâminas foram imersas em eosina por mais 30 segundos e então lavadas em água destilada corrente. Por fim, as lâminas foram imersas em álcool 70% e montadas em Permount®(Fisher Scientific. New Jersey, USA). Um microscópio de luz (Nikon, Eclipse E800 Yokohama, Japan) com câmera digital (Nikon, DXM 1200, Japan) acoplada foi usado para análise histológica e captura de imagens, as quais foram armazenadas para posterior análise qualitativa onde avaliou-se a organização tecidual e a integridade da matriz do tendão frente as alterações teciduais decorrentes da lesão no tecido tendíneo.

4.7 AVALIAÇÃO DO ÍNDICE FUNCIONAL DE AQUILLES

Para análise funcional foi utilizado o Índice Funcional de Aquiles (IFA), proposto por Murrell *et al.*, 1992 (MURRELL *et al.*, 1992). Esse teste foi conduzido em todos os animais no período pré- operatório, assim como na fase pós-operatória em 7, 14 e 21 dias.

Os animais foram avaliados em uma passarela de 10 cm de largura por 60 cm de comprimento previamente forrada com um papel branco. Após terem suas patas traseiras pintadas com tinta atóxica, os animais foram colocados no aparato para caminhar em linha reta, deixando no papel as pegadas impressas, como

demonstrado na figura 08. O papel foi devidamente identificado pelo número do animal e estocado para digitalização e mensuração por um único avaliador com auxílio do programa Image J®. As medidas foram tomadas a partir da segunda passada de marcha do animal e o índice calculado de acordo com a equação:

$$\text{IFA} = 74(\text{PLF}) + 161(\text{TSF}) + 48(\text{ITF}) - 5.$$

Conforme os elementos da equação, o máximo comprimento da pegada é definido como o fator de comprimento da pegada (PLF), e obtido por $\text{PLF}_{\text{esquerda}} - \text{PLF}_{\text{direita}} / \text{PLF}_{\text{direita}}$. A distância entre o primeiro e o quinto dedo é chamado de fator de espalhamento dos dedos do pé (TSF), e obtido por $\text{TSF}_{\text{direita}} - \text{TSF}_{\text{esquerda}} / \text{TSF}_{\text{esquerda}}$ e a distância entre o segundo e o quarto dedo é o fator teste intermediário (ITF), calculado por $\text{ITF}_{\text{direita}} - \text{ITF}_{\text{esquerda}} / \text{ITF}_{\text{esquerda}}$. Esses fatores, previamente obtidos serão calculados e usados para a equação do IFA.

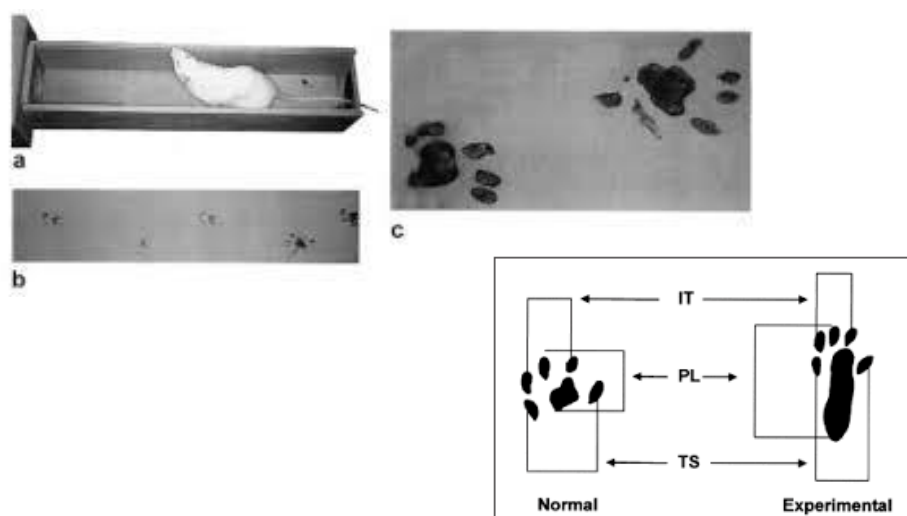


Figura 08 – Imagem da realização do teste de avaliação da funcionalidade do tendão calcâneo, o Índice Funcional de Aquiles (IFA) demonstrando o aparato em que foi realizado o experimento e os elementos da marcha a serem analisados no teste. Fonte: MURREL *et al.*, 1992.

4.8 TESTE DE SENSIBILIDADE DE VON FREY

A hiperalgesia dos animais foi avaliada através do teste de Von Frey, pelo protocolo adaptado de Chaplan *et al.*, 1994 que se baseia no uso de filamentos de Nylon (estesiômetro) com espessuras diferenciadas calibrados para exercer forças a partir de 0,05g. O contato do filamento com a pata do animal é realizado por meio de uma plataforma plana, cujo assoalho é uma malha de plástico que permite a entrada do filamento, como demonstrado na figura 09. O animal permaneceu por 15 minutos antes do experimento em fase de adaptação.

No experimento, cada filamento foi aplicado 10 vezes e o valor mínimo que causou pelo menos 3 respostas foram registradas como limiares de retirada da pata (PWT), uma pressão linear foi imposta na pata até que o animal estabeleça uma resposta de retirada frente ao estímulo. Retirada aguda, mordida, lambida ou sacudida do membro posterior ipsilateral e vocalização foram considerados sinais positivos de retirada. O limiar de retirada da pata (PWT) foi quantificado pela variação na pressão (gramas) exercida antes e depois da lesão.

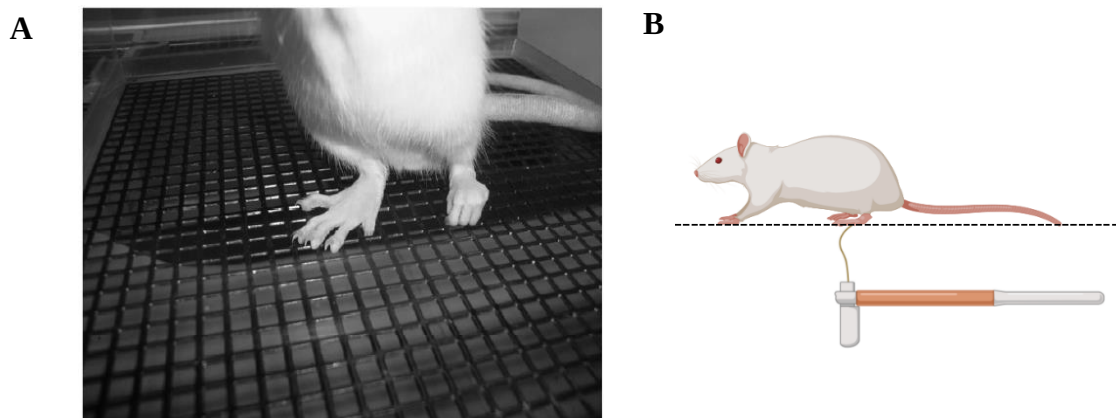


Figura 09– Imagem da realização do teste de sensibilidade tátil através dos filamentos de Nylon
A: Malha perfurada na qual o teste é realizado B: Demonstração da aplicação do filamento na realização do teste. FONTE: Nigori et al., 2011 adaptado.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística dos resultados foi utilizado o programa BioEstat 5.0, onde os dados foram analisados utilizando o teste de análise de variância (ANOVA) de dois critérios, seguida pelo pós teste de Tukey para comparações múltiplas. Os valores de $p < 0,01$ foram considerados significativos. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão.

5 RESULTADOS

5.1 PADRONIZAÇÃO DA CULTURA PRIMÁRIA DE TENÓCITOS

Para observação da organização das células tendíneas em uma análise qualitativa, obteve-se as imagens do cultivo celular por microscopia de campo claro. Os tenócitos apresentam morfologia alongada com tendência a organizar-se em fileiras próximas umas das outras, característico do tecido tendíneo, cujos feixes de fibras de colágeno que os compõe se organizam paralelamente. No modelo de cultura celular tipo explante, observam-se as células emergindo do tecido e organizando-se; no momento em que se proliferam para outros campos (Figura 10).

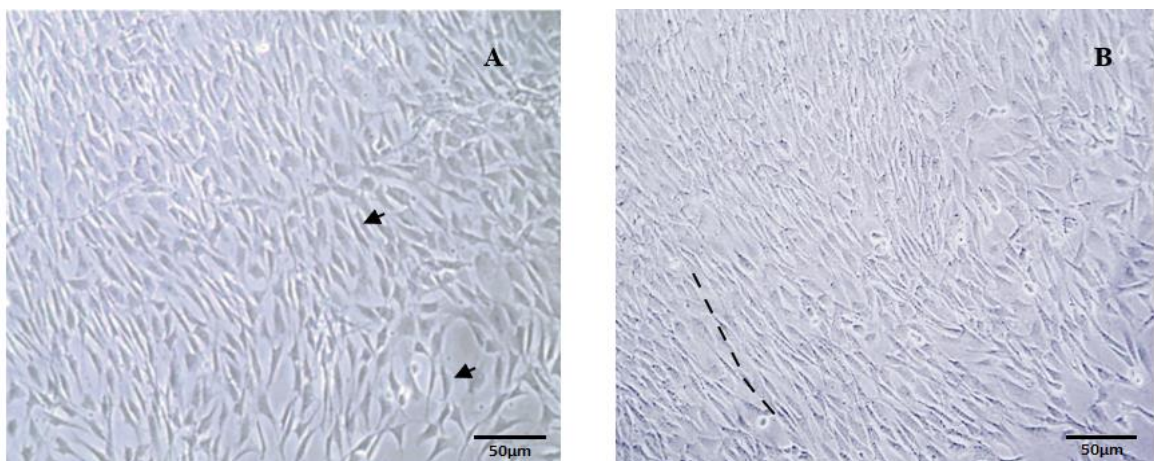


Figura 10 – Imagem de microscopia de campo claro de cultura primária de tenócitos obtidos do tendão de Aquiles de camundongos com 1 ou 2 dias de idade. **A:** Setas indicando formato celular em fuso característico dos tenócitos. **B:** Tracejado indicando proliferação celular para espaços ainda não preenchidos.

5.2 O TRATAMENTO COM MEIO CONDICIONADO EM CULTURA PRIMÁRIA DE TENÓCITOS INDUZ MELHORA FUNCIONAL EM CAMUNDONGOS TENOTOMIZADOS

Para avaliar se o tratamento com meio condicionado influenciou no desempenho funcional após lesão do tendão calcâneo utilizamos o Índice funcional de Aquiles cujos valores foram obtidos dos grupos experimentais conforme o método descrito.

O índice funcional de Aquiles padrão foi obtido do grupo controle, avaliado paralelamente aos grupos experimentais. Desse modo, os valores encontrados para esse grupo não apresentaram diferença estatística entre os dias zero (0.770 ± 1.57), 7 (-0.33 ± 8.19), 14 (2.86 ± 5.40) e 21 (-3.02 ± 5.46 ; $p=0,8213$). Para os grupos DMEM (-0.75 ± 12.3); SAL (-3.05 ± 6.1) e MC (1.48 ± 10.84) o IFA referente ao dia zero foi similar aos valores encontrados no grupo CTRL nesse mesmo dia, não havendo diferença entre os grupos ($p=0,5474$). No padrão conformacional da pata, também é possível observar um padrão de pegada semelhante entre todos os grupos experimentais. Ou seja, segue sem alterações.

Quando a análise foi feita para o 7º dia após a lesão, observamos significativa redução do valor do índice para os grupos experimentais DMEM ($-76,55 \pm 11,72$) e SAL ($-88,82 \pm 15$) quando referidos ao grupo MC ($-40,46 \pm 12,60$; $p<0,01$) cujo valores demonstram melhora na funcionalidade do tendão calcâneo em apenas sete dias após a lesão. Ainda assim, este não se equipara aos valores do grupo controle deste mesmo dia (-0.33 ± 8.19), demonstrando significativa diferença entre os grupos ($p<0,01$). Ao comparar os padrões conformacionais das pegadas dos animais, podemos observar que todos os grupos experimentais apresentam um padrão bem diferente ao grupo controle. Entretanto, o grupo MC apresenta um comprimento total de pegada menor que os demais grupos experimentais. É possível notar na pegada a piora da função em DMEM e SAL e a melhora em MC, apesar de, este ainda não equivaler aos padrões do grupo controle (Figura 11).

Na avaliação funcional do 14º dia ainda é notável a diferença dos grupos experimentais DMEM (-71,62±7,91) e SAL (-71,43±12,66) em relação ao grupo MC (-36,66±10,43) que permanece com melhora significativa em relação aos demais grupos experimentais ($p < 0,01$) porém ainda sem se igualar aos valores do grupo CTRL (2.86±1 5.40) ($p < 0,01$).

No 21º dia após lesão, observamos que todos os grupos experimentais apresentam valores semelhantes para a funcionalidade da marcha, onde o grupo MC (-23,94 ±8,46) DMEM (-37,16±10,40) e SAL (-33,69±6,49) não apresentam diferenças significativas entre si ($p = 0,1599$). Ainda assim, esses valores ainda se mantêm distantes aos apresentados pelo grupo CTRL (-3.02 ±5;46).

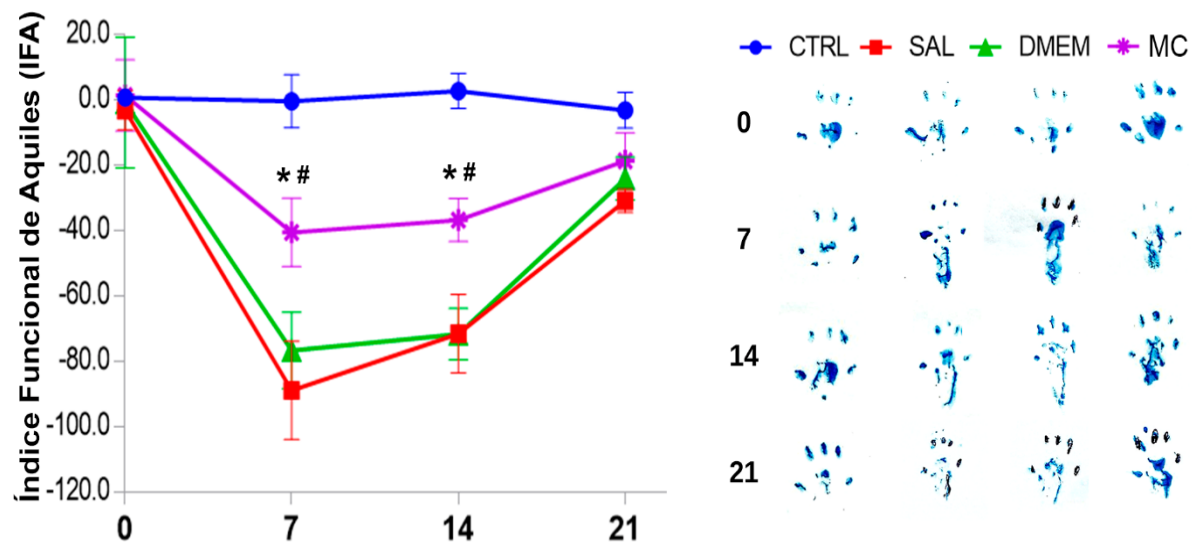


Figura 11: Efeitos do tratamento com meio condicionado em cultura primária de tenócitos na recuperação funcional da marcha através do Índice Funcional de Aquiles e no padrão conformacional da pegada dos animais. As análises foram feitas em 7, 14 e 21 dias após a lesão. Grupo controle (CTRL), grupo Salina (SAL), DMEM e Meio condicionado em cultura de tenócitos (MC). Os valores são expressos em média ± DP, (ANOVA-2/Tukey. * $p < 0,01$ vs controle; # $p < 0,01$ vs DMEM); $n = 9$.

De modo geral isso indica que, o tratamento com meio condicionado a recuperação mostrou-se precoce (dia 7 e 14) em relação aos demais grupos, cujos valores só se mostraram semelhantes 21 dias após a lesão (Figura 11). Evidenciando assim a efetividade do tratamento com meio condicionado na melhora funcional do tendão de Aquiles.

5.3 O TRATAMENTO COM MEIO CONDICIONADO EM CULTURA PRIMÁRIA DE TENÓCITOS INDUZ MELHORA HISTOLÓGICA EM TENDÕES LESIONADOS

Com o intuito de avaliar como o tratamento com meio condicionado influenciava na estrutura tecidual, avaliamos sob microscopia de luz por marcação com HE a organização tecidual após 7, 14 e 21 dias de lesão.

No sétimo dia após lesão, observamos que todos os grupos experimentais apresentam intensa desorganização celular e degradação de sua matriz. Não é notável nenhuma diferença observacional entre os grupos experimentais.

No 14º dia após lesão, é possível observar que o grupo MC apresenta a matriz mais recuperada em relação ao grupo DMEM e SAL que demonstram bastante perda de matriz. O grupo MC apresenta tendência a organização de sua matriz em feixes paralelos como pode ser observado quando comparados ao grupo controle. Além disso, ao observarmos os grupos experimentais DMEM e SAL também é possível notar que estes grupos apresentam células mais arredondas, característico de um tecido lesionado, bem diferentes do padrão alongado e em formato fusiforme das células tendíneas demonstrados no grupo controle. Este padrão, pode ser melhor observado no grupo MC, que apresenta células e matriz com padrão organizacional bem mais semelhantes ao grupo controle do que os demais grupos experimentais.

No 21º dia após a lesão, os grupos tendem a melhorar sua estrutura, no entanto o grupo MC demonstra melhor regeneração da matriz extracelular e células com padrão organizacional mais semelhante ao grupo controle, enquanto os grupos DMEM e SAL se diferem bastante deste (Figura 12)

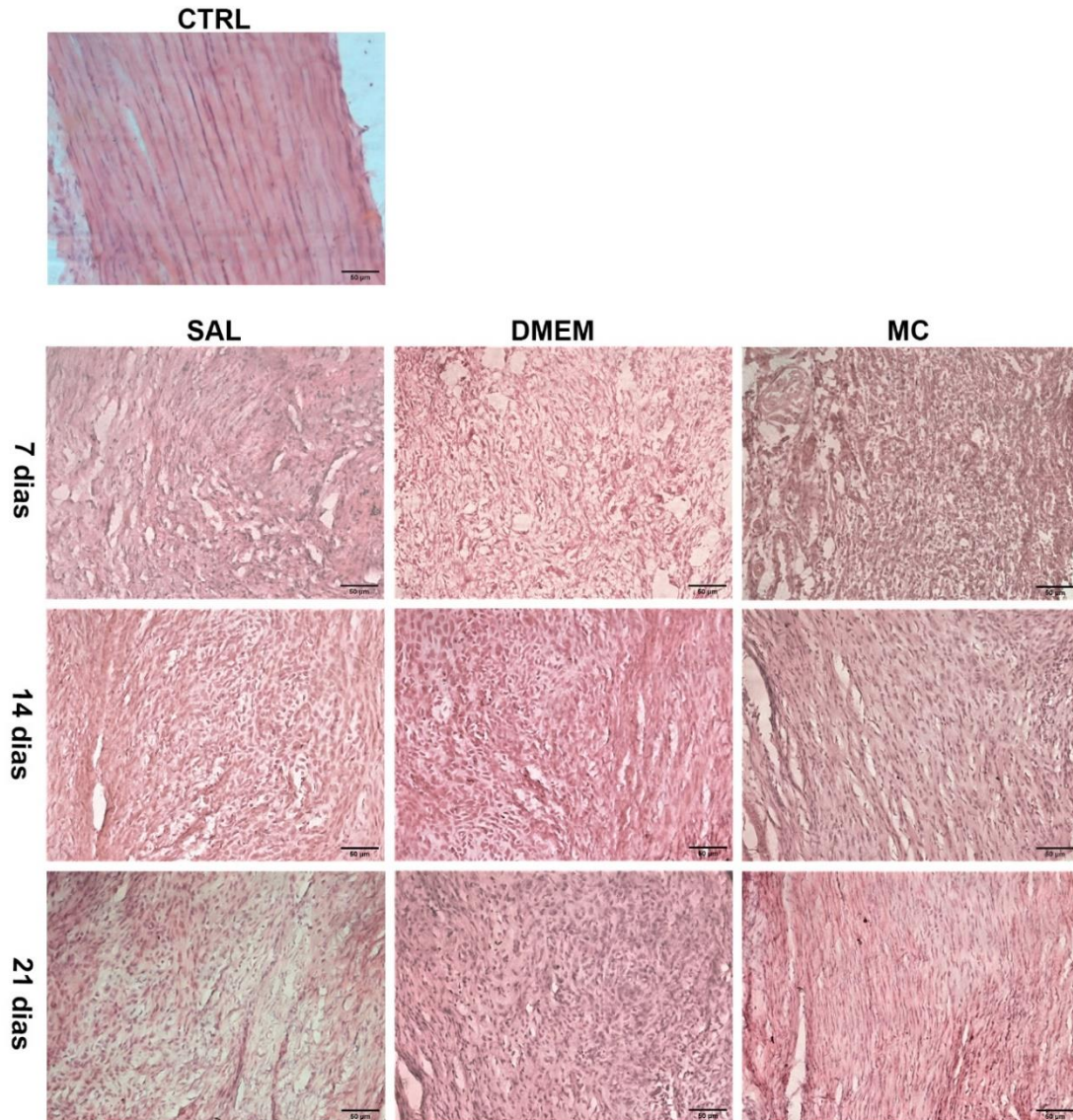


Figura 12: Fotomicrografias representativas do efeito do tratamento com meio condicionado em cultura primária de tenócitos na organização tecidual em 7, 14 e 21 dias pós-lesão. Grupo controle (CTRL), grupo Salina (SAL), DMEM e Meio condicionado em cultura primária de tenócitos (MC). Marcação em HE. Objetiva de 20x, barra da escala 50µm, n= 9.

5.4 O TRATAMENTO COM MEIO CONDICIONADO EM CULTURA PRIMÁRIA MELHORA O LIMAR DE SENSIBILIDADE MECÂNICA EM CAMUNDONGOS TENOTOMIZADOS

Para avaliar a resposta nociceptiva dos camundongos após a ruptura utilizamos o teste de von Frey, determinado pelo limiar de retirada da pata (PWT). Inicialmente, ao dia zero, o limiar de retirada foi avaliado anteriormente ao modelo de lesão. De modo que os grupos experimentais apresentaram os seguintes valores: MC ($4,88 \pm 3,01$ g) DMEM ($4,00 \pm 2,44$ g) SAL ($4,00 \pm 2,44$ g), não se diferenciando do grupo controle ($5,33 \pm 2,44$ g). Não havendo diferença entre os grupos ($p=0,5474$).

Quando a análise foi feita para o 3º dia após a lesão, observamos diminuição significativa do valor de PWT para todos os grupos experimentais MC ($0,35 \pm 0,62$; DMEM ($0,31 \pm 0,63$) e SAL ($0,33 \pm 0,62$), não ocorrendo significativa diferença entre os grupos experimentais. Demonstrando que a lesão proposta ocasiona alteração da sensibilidade mecânica quando comparados ao grupo controle ($3,33 \pm 4,16$ g) cujos valores de PWT não se alteram significativamente entre o primeiro dia de análise e o terceiro dia pós lesão ($p=0,5474$).

No 7º dia após a lesão, observamos que os grupos experimentais mantêm uma diminuição significativa do valor de PWT quando comparados ao grupo CTRL ($6,0 \pm 3,46$ g). Entretanto, no grupo MC ($2,24 \pm 1,15$) notamos que há uma melhora significativa para os valores de PTW quando comparados aos grupos experimentais DMEM ($0,15 \pm 0,07$) e SAL ($0,13 \pm 115$) ($p < 0,01$). Ainda assim, estes valores ainda não se equiparam ao do grupo CTRL, cujos valores ainda permanecem significativamente diferentes ($5,33 \pm 4,16$) ($p < 0,01$). Esses resultados se mantêm na análise do 14º dia após a lesão onde os grupos experimentais DMEM ($0,45 \pm 0,76$) e SAL ($0,77 \pm 0,95$) mantêm menores valores de PTW em relação ao grupo MC ($2,66 \pm 1,06$) que permanece com melhora significativa do limiar de retirada da pata em relação aos demais grupos experimentais ($p < 0,01$) mesmo que este ainda se mantenha significativamente diferente aos valores do grupo CTRL ($5,33 \pm 4,16$) que não apresentou diferenças consideráveis entre os dias analisados ($p=0,803$).

Estes resultados demonstram que no grupo tratado com meio condicionado em cultura primária de tenócitos há uma melhora no do quadro de sensibilidade mecânica. Uma vez que, os valores de PTW foram maiores nos dias 7 e 14 em relação aos demais grupos experimentais, cujos valores só se mostraram semelhantes 21 dias após a lesão (Figura 13). Evidenciando assim, que o tratamento com meio condicionado em cultura primária melhora o limiar nociceptivo mecânico em camundongos tenotomizados.

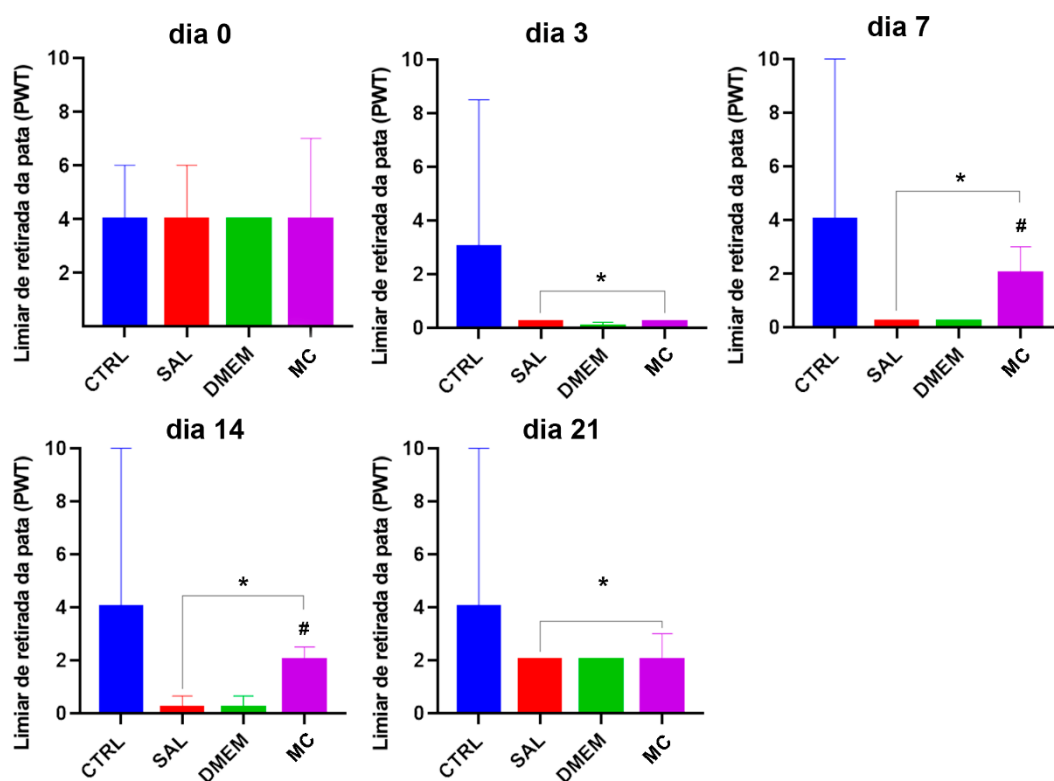


Figura 13: Efeitos do tratamento com meio condicionado de tenócitos na sensibilidade mecânica dos camundongos. Grupo controle (CTRL) e grupo Meio condicionado em cultura de tenócitos (MC), DMEM e salina (SAL). Análises realizadas em 0 antes da cirurgia, 3, 7 14 e 21 dias pós tenotomia. Os dados são apresentados como média $\pm$ DP. *Diferença significativa ($p < 0,01$) vs CTRL e # ($p < 0,01$) vs DMEM. n=9.

6. DISCUSSÃO

Nas terapias medias por células, já é evidenciado que a aplicação de tenócitos é capaz de contribuir ao processo de reparo em diferentes modelos de tendinopatia. Onde os tecidos tratados por estas células, apresentaram uma estrutura tecidual mais organizada e uma maior quantidade de colágeno tipo I em sua matriz (BUCHER et al., 2017b; CHEN et al., 2011b). Apesar de, no presente estudo não termos aplicados diretamente as células tendíneas ao local da lesão, o meio utilizado como tratamento foi condicionado por estas células. Corroborando com os dados da literatura que apontam que terapias mediadas por tenócitos contribuem ao reparo em lesões no tendão.

Apesar de existirem protocolos anteriores sobre cultivos celulares do tipo explante de tenócitos (WUNDERLI; BLACHE; SNEDEKER, 2020), até o momento, não havido sido descrito sobre esse tipo de cultivo em células oriundas do tendão calcâneo de camundongos. Em nossos resultados referentes a padronização da cultura celular de tenócitos, observamos que as células cultivadas se proliferam a partir do tecido tendíneo apresentando formato fusiforme e alongando, semelhante ao padrão conformacional das células tendíneas. Demonstrando uma boa padronização para o cultivo de tenócitos em modelo murino.

Uma recuperação adequada e rápida e adequada constitui os principais objetivos de tratamento frente à uma lesão tendínea, especialmente no que diz respeito a funcionalidade do tecido lesionado (LIPMAN et al., 2018a; LOIACONO et al., 2019). No entanto, os efeitos do tratamento com terapias mediadas por células em parâmetros funcionais após lesão tendínea são pouco explorados na literatura. Neste sentido, buscamos agregar às nossas análises a marcha dos camundongos considerando que, as limitações de movimento decorrentes de lesão no tendão calcâneo geram déficits funcionais significativos que podem interferir nas atividades

da vida diária dos indivíduos acometidos (COOK; KHAN; PURDAM, 2002; REES; MAFFULLI; COOK, 2009).

Os nossos resultados com o IFA apontaram um ganho funcional significativo em 7 e 14 dias após ruptura. Sugerimos que, o meio condicionado contribuiria com possíveis fatores de crescimento oferecidos pelas células tendíneas antecipa a melhora da função. Para isso, nos baseamos em evidências que indicam que a utilização de fatores de crescimento no tratamento de lesões do tendão calcâneo contribuem para a recuperação funcional do tecido (KURTZ et al., 1999). Deste modo, demonstramos pela primeira vez que o tratamento com meio condicionado em cultura primária de tenócitos interfere positivamente na recuperação da função do tendão calcâneo.

Os eventos histológicos relacionados ao reparo do tendão começam com o período inflamatório intenso, seguido pelas fases proliferativa e remodeladora. Dados da literatura descrevem desorganização intensa da matriz e proliferação celular em tendões lesionados durante a primeira semana pós-lesão (RILEY, 2008; SHAPIRO; GRANDE; DRAKOS, 2015). No presente estudo foram observados eventos histológicos semelhantes, como pode ser observado na primeira semana, onde todos os grupos experimentais apresentaram perda significativa em sua matriz.

Ao analisar o tendão que sofreu ruptura e foi tratado com meio condicionado em cultura primária de tenócitos, podemos observar que este apresentou fibras de colágeno mais íntegras nos dias 14 e 21 pós lesão em relação aos demais grupos experimentais, que por sua vez, mesmo 21 dias após a lesão não apresentaram uma melhora satisfatória que pudesse ser comparada a boa recuperação vista no grupo MC. Além disso, em uma análise qualitativa dos tecidos, podemos notar que o formato celular dos grupos SAL e DMEM se diferem bastante do grupo controle, sendo o grupo tratado com meio condicionado em tenócitos o que mais se assemelha a este último. De modo geral, isso indica que o tratamento proposto em nosso trabalho contribui para reestruturação do tecido tendíneo lesionado.

Os resultados funcionais utilizando índice funcional de Aquiles (IFA) somado às melhoras teciduais encontradas em nosso trabalho podem ser comparados aos encontrados em outros trabalhos que também mostraram correlação entre a função do tendão e a organização da matriz (FRANCHI et al., 2007; SOUZA et al., 2019). Deste modo, podemos afirmar que as melhoras histológicas encontradas se relacionam diretamente com os melhores parâmetros funcionais do grupo MC.

A dor é a principal sintoma decorrente da tendinopatia, podendo manifestar-se por longos períodos de maneira crônica e incapacitante (FREDBERG; STENGAARD-PEDERSEN, 2008). O mecanismo que ocasiona a persistência desse sintoma ainda é incerto e as hipóteses mais difundidas correlacionam a dor a presença de células inflamatórias, aumento de nervos, vasos e neuromoduladores como a Substância P e Glutamato (ALFREDSON; LORENTZON, 2002; FRANKLIN et al., 2014; GIBSON et al., 2009). Nas estratégias adotadas para reabilitação dessas lesões, o manejo e controle da dor torna-se um dos principais objetivos de tratamento.

O teste comportamental que avalia a sensibilidade mecânica de Von Frey é descrito com um bom preditor de sensibilidade e possível avaliação nociceptiva em animais (NIROGI et al., 2012; TENA et al., 2012). Diante da sintomatologia da lesão, propomos avaliar como o tratamento com meio condicionado em cultura de tenócitos iria interferir na sensibilidade mecânica dos animais submetidos a lesão, conforme dados anteriores que demonstram que a lesão tendínea ocasiona alteração na sensibilidade da pata de animais lesionados, ocasionando um quadro de hiperalgesia local (MENDES et al., 2021). Os nossos resultados apontaram uma melhora significativo no PTW em 7 e 14 dias após ruptura. Demonstrando que o tratamento proposto também ocasiona melhora na resposta nociceptiva modelo de lesão.

Bucher et al., 2017 investigaram os efeitos da aplicação de tenócitos autólogos em tendinopatia glútea. Neste, foi evidenciado melhoras significativas no quadro algico, nos parâmetros biomecânicos e histológicos analisados. Corroborando com os resultados em nosso trabalho. Além disso, este estudo também mostrou que

a injeção autóloga de tenócitos podem aumentar a expressão de fatores de crescimento como PDGF, FGF β e TGF β que podem atuar nas vias de comunicação que induzem a proliferação celular e reestabelecem a matriz do tendão (BUCHER et al., 2017a).

Já é evidenciado que os fatores de crescimento liberados pelas células tendíneas desempenham papéis importantes nas atividades celulares, atuando como reguladores de funções como proliferação, migração, síntese de matriz e diferenciação celular. Estes assumem papéis importantes no reparo de tecidos lesionados (MOLLOY; WANG; MURRELL, 2003). Nas terapias medidas por células, a utilização de fatores de crescimento como base de propostas terapêuticas é preconizada com objetivo de tentar reduzir possíveis reação adversas as aplicações diretas de células. Sua aplicação como forma de tratamento, se dá, majoritariamente, através do uso de meios condicionados (BOGATCHEVA; COLEMAN, 2019b; PLATAS et al., 2013; VERONESI et al., 2018).

No reparo tendíneo, diversos fatores de crescimento desempenham papéis fundamentais na recuperação do tecido. Nos estudos direcionados a compreensão das lesões do tendão, destacam-se os fatores de crescimento como TGF β , VEGF, PDGF e bFGF. (GONÇALVES et al., 2013; MOLLOY; WANG; MURRELL, 2003a).

O TGF β mostrou-se ativo em quase todos os estágios da cicatrização do tendão e apresenta efeitos variados como estimular a migração celular extrínseca, regulação de proteinases e estimulação da produção de colágeno local (KLEIN et al., 2002; NATSU-UME et al., 2000). Este, mostrou-se significativamente mais expresso em algumas horas após a lesão tendínea sugerindo possuir um papel importante na resposta inflamatória imediata pós lesão (BIDDER et al., 2000a; MOLLOY; WANG; MURRELL, 2003a).

Níveis aumentados de fatores de crescimento angiogênicos, como VEGF, em lesões musculoesqueléticas, estão correlacionados com um crescimento do

suprimento sanguíneo intratendinoso em direção ao local de reparo estimulando a resposta inflamatória após a lesão (BIDDER et al., 2000b). Apesar de este fator apresentar funções importantes como resposta imediata após a lesão, este encontra-se mais expresso na fase proliferativa onde estimula a migração de células extrínsecas, nutrientes e fatores de crescimento para o local da injúria (HUANG et al., 2020; LIU et al., 2021).

Já o PDGF e FGF estimulam a proliferação de fibroblastos do tendão e promovem regeneração da matriz, mostrando-se promissores para melhorar a cicatrização do tendão (CHAN et al., 2000). Yoshikawa e Abrahamsson, 2001 demonstraram que in vitro, o PDGF estimula a produção de colágeno tipo I e tipo II. Chan et al., demonstraram que o uso de bFGF em tenócitos cultivados a partir do tendão patelar de ratos, melhoraram a cicatrização e regeneração celular (YOSHIKAWA; ABRAHAMSSON, 2001; CHAN et al, 2000).

Embora TGF β , VEGF, PDGF e bFGF tenham sido descritos como fatores que contribuem para o desenvolvimento e cicatrização de tendões e ligamentos os papéis exatos que estes desempenham na regeneração do tecido permanece desconhecida. Sugerimos que estes fatores podem estar envolvidos nos resultados encontrados nos nosso trabalho. Visto que, estudos anteriores já demonstram a liberação destes pelas células tendíneas e sua relação direta com o melhor reparo tendíneo (MOLLOY; WANG; MURRELL, 2003). Ainda assim, estudos posteriores são necessários para relacioná-los diretamente aos resultados do presente trabalho.

No presente estudo observamos melhoras funcionais, histológicas e na sensibilidade mecânica no grupo tratado com meio condicionado em cultura de tenócitos. Sugerimos que os fatores de crescimento oferecidos pelas células tendíneas estejam contribuindo para melhora. Visto que, o tenócitos cultivados in vitro são capazes de produzir os fatores associados a recuperação do tecido tendíneo (KLEIN et al., 2002; WUNDERLI; BLACHE; SNEDEKER, 2020).

Os mecanismos que envolvem o processo de reparo tendíneo são complexos que requerem acontecimentos celulares e bioquímicos locais que são ativados por uma série de mediadores, tais como, citocinas, fatores de crescimento e enzimas. O propósito deste trabalho direcionava-se a avaliar se um meio condicionado em tenócitos contribuiria para recuperação em uma lesão tendínea. Perante este objetivo, nosso trabalho apresenta resultados promissores para as terapias baseadas em células tendíneas.

Nesse contexto, estudos posteriores são necessários para investigar outros parâmetros envolvidos no processo de reparo da lesão tendínea referentes ao efeito do tratamento com base nas terapias celulares, bem como os mecanismos bioquímicos que possam elucidar os ganhos encontrados em nosso trabalho. Por fim, este estudo viabiliza possíveis campos de investigação para o tratamento de injúrias em tecidos conectivos e colabora com as perspectivas futuras para o desenvolvimento de terapias para lesões no tendão.

7. CONCLUSÕES

- As culturas do tipo explante demonstram boa padronização celular para o cultivo de tenócitos provenientes dos tendões de camundongos;
- O tratamento com meio condicionado em cultura primária de tenócitos promoveu melhora no desempenho funcional da marcha de camundongos em 7 e 14 dias após a lesão;
- O tratamento com meio condicionado em cultura primária de tenócitos induz a melhora da organização tecidual 14 e 21 dias após lesão;
- O tratamento com meio condicionado em cultura primária de tenócitos melhora a sensibilidade mecânica de camundongos tenotomizados em 7 e 14 dias após a lesão.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFREDSON, H.; LORENTZON, R. Chronic tendon pain: no signs of chemical inflammation but high concentrations of the neurotransmitter glutamate. Implications for treatment? **Current drug targets**, v. 3, p. 43–54, 2002.

ALONSO R.S et al. Tendon tissue engineering: cells, growth factors, scaffolds and production techniques. **Journal of controlled disease**. Volume 333, May 2021.

ANDERSSON, G. et al. Tenocyte hypercellularity and vascular proliferation in a rabbit model of tendinopathy: Contralateral effects suggest the involvement of central neuronal mechanisms. **British Journal of Sports Medicine**, v. 45, n. 5, p. 399–406, 2011.

BIDDER, M. et al. Expression of mRNA for Vascular Endothelial Growth Factor at the Repair Site of Healing Canine Flexor Tendon. **The Journal of Orthopedic Research**. Society Short Communication, 2000a.

BIRCH, H. L. Tendon matrix composition and turnover in relation to functional requirements. **International Journal of Experimental Pathology**. Anais...ago. 2007b.

BOGATCHEVA, N. V.; COLEMAN, M. E. Conditioned Medium of Mesenchymal Stromal Cells: A New Class of Therapeutics. **Biochemistry (Moscow)**Pleiades journals, , 1 nov. 2019a.

BOSWORTH, L. A. Tendon tissue regeneration. **Woodhead Publishing Limited**, 2011.

BRING, D. K. I. et al. Joint immobilization reduces the expression of sensory neuropeptide receptors and impairs healing after tendon rupture in a rat model. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 27, n. 2, p. 274–280, fev. 2009.

BROWN, P. T. et al. Stem Cell-based Tissue Engineering Approaches for Musculoskeletal Regeneration. **Curr Pharm Des**. 2013.

BUCHER, T. A. et al. Autologous tenocyte injection for the treatment of chronic recalcitrant gluteal tendinopathy: A prospective pilot study. **Orthopaedic Journal of Sports Medicine**, v. 5, n. 2, 1 fev. 2017a.

BURKE, J. et al. Therapeutic potential of mesenchymal stem cell based therapy for osteoarthritis. **Clinical and Translational Medicine**, v. 5, n. 1, p. 27, 2016.

CANTY, E. G.; KADLER, K. E. Collagen fibril biosynthesis in tendon: a review and recent insights. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, 2002

CHAN, B. P. et al. Effects of basic fibroblast growth factor (bFGF) on early stages of tendon healing. A rat patellar tendon model. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, v. 71, n. 5, p. 513–518, 2000.

CHEN, J. et al. Autologous Tenocyte Therapy for Experimental Achilles Tendinopathy in a Rabbit Model. **Tissue Engineering Part A**, v. 17, n. 15–16, p. 2037–2048, 2011a.

CLARK, S. T. et al. Epidemiology of tendon and ligament injuries in Aotearoa/New Zealand between 2010 and 2016. **Injury Epidemiology BioMed Central Ltd.**, , 10 fev. 2020.

COOK, J. L.; KHAN, K. M.; PURDAM, C. Achilles tendinopathy. **Manual Therapy**, v. 7, n. 3, p. 121–130, 2002.

COSTA-ALMEIDA, R.; SOARES, R.; GRANJA, P. L. Fibroblasts as maestros orchestrating tissue regeneration. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine** John Wiley and Sons Ltd, , 1 jan. 2018.

DAKIN, S. G. et al. Chronic inflammation is a feature of Achilles tendinopathy and rupture. **British journal of sports medicine**, v. 52, n. 6, p. 359–367, 2018.

DAKIN, S. G.; DUDHIA, J.; SMITH, R. K. W. Resolving an inflammatory concept: The importance of inflammation and resolution in tendinopathy. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 2014.

DE JONGE, S. et al. Incidence of midportion Achilles tendinopathy in the general population. **British Journal of Sports Medicine**, v. 45, n. 13, p. 1026–1028, out. 2011.

DEAN, B. J. F. et al. Are inflammatory cells increased in painful human tendinopathy? A systematic review. **British Journal of Sports Medicine**, v. 50, n. 4, p. 216–220, 2016.

DEL BUONO, A.; CHAN, O.; MAFFULLI, N. Achilles tendon: Functional anatomy and novel emerging models of imaging classification. **International Orthopaedics**, v. 37, n. 4, p. 715–721, abr. 2013.

DORAL, M. N. et al. Functional anatomy of the Achilles tendon. **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy**, v. 18, n. 5, p. 638–643, 2010.

EGGER, A. C.; BERKOWITZ, M. J. Achilles tendon injuries. **Current Reviews in Musculoskeletal Medicine**, 1 mar. 2017.

FRANCHI, M. et al. Collagen structure of tendon relates to function. **The Scientific World Journal**, 30 mar. 2007.

FRANKLIN, S. L. et al. Up-regulation of glutamate in painful human supraspinatus tendon tears. **American Journal of Sports Medicine**, v. 42, n. 8, p. 1955–1962, 2014.

FREDBERG, U.; STENGAARD-PEDERSEN, K. Chronic tendinopathy tissue pathology, pain mechanisms, and etiology with a special focus on inflammation: Review. **Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports**, v. 18, n. 1, p. 3–15, 2008.

GASPAR, D. et al. Progress in cell-based therapies for tendon repair. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 84, n. August 2016, p. 240–256, 2015a.

GIBSON, W. et al. Glutamate and capsaicin-induced pain, hyperalgesia and modulatory interactions in human tendon tissue. **Experimental Brain Research**, v. 194, n. 2, p. 173–182, 2009.

GONÇALVES, A. I. et al. Understanding the role of growth factors in modulating stem cell tenogenesis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, 30 dez. 2013.

GREINER, S.; LAWTON, R.; VOSS, A. Cell-based therapy of the elbow: evidence for lateral tendinopathy—a review on current treatments. **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy**, 1 abr. 2022.

HENDIJANI, F. Explant culture: An advantageous method for isolation of mesenchymal stem cells from human tissues. **Cell Proliferation**, 1 abr. 2017.

HUANG, Y. et al. Vascular endothelial growth factor enhances tendon-bone healing by activating Yes-associated protein for angiogenesis induction and rotator cuff reconstruction in rats.. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 121, n. 3, p. 2343–2353, 1 mar. 2020.

KANNUS, P. Structure of the tendon connective tissue, kannus, Tampere, 2000.pdf. n. 3, p. 312–320, 2000.

KASSEM, M.; KRISTIANSEN, M.; ABDALLAH, B. M. Mesenchymal Stem Cells: Cell Biology and Potential Use in Therapy. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 95, p. 209–214, 2004.

KLEIN, M. B. et al. Flexor tendon healing in vitro: Effects of TGF- β on tendon cell collagen production. **Journal of Hand Surgery**, v. 27, n. 4, p. 615–620, 2002.

KURTZ, C. A. et al. Insulin-Like Growth Factor I Accelerates Functional Recovery from Achilles Tendon Injury in a Rat Model. **The American journal of Sports Medicine**, Vol. 27, No. 3© 1999.

LAKE, S. P.; ANSORGE, H. L.; SOSLOWSKY, L. J. **Animal models of tendinopathyDisability and Rehabilitation**, 2008.

LEONG N. L Tendon and ligament healing and current approaches to tendon and ligament healing. **Journal of Orthopaedic Research**. September, 2020.

LIAN, Ø. et al. Pronociceptive and antinociceptive neuromediators in patellar tendinopathy. **American Journal of Sports Medicine**, v. 34, n. 11, p. 1801–1808, 2006.

LIN, J. et al. The cell specific temporal expression of nitric oxide synthase isoforms during achilles tendon healing. **Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]**, v. 50, n. 10, p. 515–22, 2001.

LINDERMAN, S. W. et al. Cell and Biologic-Based Treatment of Flexor Tendon Injuries. **Operative Techniques in Orthopaedics**, v. 26, n. 3, p. 206–215, 1 set. 2016.

LIPMAN, K. et al. Tendinopathy: Injury, repair, and current exploration. **Drug Design, Development and Therapy**. Ltd., , 20 mar. 2018a.

LIU, X. et al. The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Tendon Healing. **Frontiers in Physiology**, 25 out. 2021.

LOIACONO, C. et al. Tendinopathy: Pathophysiology, therapeutic options, and role of nutraceuticals. a narrative literature review. **Medicina (Lithuania)**MDPI AG, , 1 ago. 2019.

LUI, P. P. Y. et al. What are the validated animal models for tendinopathy? **Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports**, 2011.

LUI, P. P. Y. Identity of tendon stem cells - how much do we know? **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 17, n. 1, p. 55–64, 2013.

MAFFULLI, N.; WONG, J.; ALMEKINDERS, L. C. Types and epidemiology of tendinopathy. **Clinics in Sports Medicine**, v. 22, n. 4, p. 675–692, 2003.

MENDES, Á. G. R. et al. Astrocyte reactivity in spinal cord and functional impairment after tendon injury in rats. **Heliyon**, v. 7, n. 4, 1 abr. 2021.

MOLLOY, T.; WANG, Y.; MURRELL, G. A. C. The Roles of Growth Factors in Tendon and Ligament Healing. **Sports Med.** 2003.

MORAES, S. A. S. et al. (2013). Local NO synthase inhibition produces histological and functional recovery in Achilles tendon of rats after tenotomy: Tendon repair and local NOS inhibition. **Cell and Tissue Research**, 353(3), 457–463. <https://doi.org/10.1007/s00441-013-1662-2>

MURRELL, G. A. C. et al. The Achilles Functional Index. **Journal of Orthopurdic Research**. [s.l.] Orthopaedic Research Society, 1992.

NATSU-UME, T. et al. **Temporal and Spatial Expression of Transforming Growth Factor- β in the Healing Patellar Ligament of the Rat**. [s.l.: s.n.].

NIROGI, R. et al. Comparison of manual and automated filaments for evaluation of neuropathic pain behavior in rats. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 66, n. 1, p. 8–13, jul. 2012.

NIXON, A. J.; WATTS, A. E.; SCHNABEL, L. V. Cell- and gene-based approaches to tendon regeneration. **Journal of Shoulder and Elbow Surgery**, fev. 2012a.

NÖTH, U. et al. Cell delivery therapeutics for musculoskeletal regeneration. **Advanced Drug Delivery Reviews**, jun. 2010.

O'BRIEN, M. **The anatomy of the achilles tendon** **Foot and Ankle Clinics**, jun. 2005.

PADANILAM, T. G. Chronic Achilles Tendon Ruptures. **Foot and Ankle Clinics**, v. 14, n. 4, p. 711–728, 2009.

PAREDES, J. J.; ANDARAWIS-PURI, N. Therapeutics for tendon regeneration: a multidisciplinary review of tendon research for improved healing. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1383, n. 1, p. 125–138, 1 nov. 2016.

PETROU, I. G. et al. Cell therapies for tendons: Old cell choice for modern innovation. **Swiss Medical Weekly**, v. 144, n. August, p. 1–11, 2014.

PLATAS, J. et al. Conditioned media from adipose-tissue-derived mesenchymal stem cells downregulate degradative mediators induced by interleukin-1 β in osteoarthritic chondrocytes. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, 2013.

PUFE, T. et al. The role of vasculature and angiogenesis for the pathogenesis of degenerative tendons disease. **Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports**, v. 15, n. 4, p. 211–222, 2005.

REES, J. D.; MAFFULLI, N.; COOK, J. Management of tendinopathy. **American Journal of Sports Medicine**, v. 37, n. 9, p. 1855–1867, 2009.

REES, J. D.; WILSON, A. M.; WOLMAN, R. L. Current concepts in the management of tendon disorders. **Rheumatology**, maio 2006.

RILEY, G. The pathogenesis of tendinopathy. A molecular perspective. **Rheumatology**, v. 43, n. 2, p. 131–142, 2004.

RILEY, G. Tendinopathy - From basic science to treatment. **Nature Clinical Practice Rheumatology**, v. 4, n. 2, p. 82–89, 2008.

SCHIZAS, N. et al. Coexistence of up-regulated NMDA receptor 1 and glutamate on nerves, vessels and transformed tenocytes in tendinopathy. **Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports**, v. 20, n. 2, p. 208–215, 2010.

SEREYSKY, J. B.; FLATOW, E. L.; ANDARAWIS-PURI, N. Musculoskeletal regeneration and its implications for the treatment of tendinopathy. **International Journal of Experimental Pathology**, ago. 2013.

SHAPIRO, E.; GRANDE, D.; DRAKOS, M. Biologics in Achilles tendon healing and repair: a review **Current Reviews in Musculoskeletal Medicine**. 1 mar. 2015.

SHARMA, P.; MAFFULLI, N. Biology of tendon injury: Healing, modeling and remodeling. **Journal of Musculoskeletal Neuronal Interactions**, v. 6, n. 2, p. 181–190, 2006.

SILBERNAGEL, K. G. et al. Evaluation of lower leg function in patients with Achilles tendinopathy. **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy**, v. 14, n. 11, p. 1207–1217, 2006.

SOUZA, M. et al. Local treatment with ascorbic acid accelerates recovery of post-sutured achilles tendon in male wistar rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 52, n. 9, 2019.

TENA, B. et al. Reproducibility of Electronic von Frey and von Frey Monofilaments Testing. **Clinical Pain**, 2012.

THORPE, C. T. et al. The role of the non-collagenous matrix in tendon function. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 94, n. 4, p. 248–259, 2013.

VERONESI, F. et al. The use of cell conditioned medium for musculoskeletal tissue regeneration **Journal of Cellular Physiology**. Wiley-Liss Inc., , 1 jun. 2018.

WARDEN, S. J. Animal models for the study of tendinopathy. **British Journal of Sports Medicine**, abr. 2007.

WUNDERLI, S. L.; BLACHE, U.; SNEDEKER, J. G. Tendon explant models for physiologically relevant in vitro study of tissue biology—a perspective. **Connective Tissue Research**. Taylor and Francis Ltd, , 3 jul. 2020.

XU, Y.; MURRELL, G. A. C. The basic science of tendinopathy. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 466, n. 7, p. 1528–1538, 2008a.

XU, Y.; MURRELL, G. A. C. The basic science of tendinopathy. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 466, n. 7, p. 1528–1538, 2008b.

YOON, J. H. et al. Comparison of explant-derived and enzymatic digestion-derived MSCs and the growth factors from Wharton's jelly. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

ZAKRZEWSKI, W. et al. Stem cells: Past, present, and future. **Stem Cell Research and Therapy**. BioMed Central Ltd., , 26 fev. 2019.