

MARIA HELENA COSTA VIEIRA

**POTENCIAL TERAPÊUTICO DAS CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS DE GORDURA EM LESÃO DO TENDÃO DE
AQUILES EM COELHOS**

CAMPO GRANDE

2013

MARIA HELENA COSTA VIEIRA

**POTENCIAL TERAPÊUTICO DAS CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS DE GORDURA EM LESÃO DO TENDÃO DE
AQUILES EM COELHOS**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Saúde e
Desenvolvimento na Região Centro-Oeste
da Universidade Federal de Mato Grosso
do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Profa. Dra. Andréia Conceição
M. B. A. Silva.

CAMPO GRANDE

2013

MARIA HELENA COSTA VIEIRA

**POTENCIAL TERAPÊUTICO DAS CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS DE GORDURA EM LESÃO DO TENDÃO DE
AQUILES EM COELHOS**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Saúde e
Desenvolvimento na Região Centro-
Oeste da Universidade Federal de Mato
Grosso do Sul, para obtenção do título
de Mestre.

Resultado _____

Campo Grande (MS), _____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Andréia Conceição M. B. A. Silva

Instituição Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Prof. Dr. Roberto Antoniolli da Silva

Instituição Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Prof. Dr. Rodrigo Juliano Oliveira

Instituição Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, pelo amor, dedicação, exemplo e por terem acreditado em mim.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, **Profa. Dra. Andréia Conceição Milan Brochado Antonioli Silva**, que compartilhou comigo sua experiência e tempo. Minha gratidão, sempre.

À minha co-orientadora, **Profa. Dra. Lilian Piñero Eça**, por ter acreditado na realização deste trabalho.

Aos estagiários, **Wagner de Souza Fernandes e Driele Karen Ferreira Soares**, pela persistência e responsabilidade no cuidado com os animais.

A todos que ajudaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho, sem os quais seria impossível alcançar essas metas.

RESUMO

Costa Vieira MH. Potencial Terapêutico das células-tronco mesenquimais de gordura no tratamento da lesão do tendão de Aquiles em Coelhos. Campo Grande, 2013. [Dissertação – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

O objetivo deste trabalho foi estudar o potencial terapêutico das células-tronco mesenquimais (CTM) na lesão completa do tendão de Aquiles em coelhos por meio da análise histológica. Para tanto coelhos da raça Nova Zelândia foram distribuídos entre seis grupos (n=5). A análise estatística foi realizada por *Mann Whitney* e *Kruskal Wallis* ($p > 0,005$). Foi observada diminuição do processo inflamatório entre os períodos nos grupos ruptura e ruptura + CTM. Quanto aos capilares, o grupo de ruptura obteve menor número do que os demais no período de 14 dias. Houve maior número de arteríolas no grupo de ruptura + sutura do que os demais no período de 14 dias. A desorganização estrutural foi maior no grupo de ruptura em comparação com os demais no período de 14 dias. Entre os períodos houve diferença do grupo ruptura com maior valor para o período de 14 dias em comparação ao de 28 dias, o mesmo ocorreu para o grupo ruptura + CTM. Frente ao exposto infere-se que o uso de CTM em lesão do tendão de Aquiles de coelhos não suturados foi similar ao uso do método padrão-ouro, ou seja, sutura do tendão.

Palavras-chave: sistema musculoesquelético, terapia celular, cicatrização.

ABSTRACT

Costa Vieira MH. Therapeutic potential of adipose-derived mesenchymal stem cells in the treatment of Achilles tendon injury in rabbits. Campo Grande, 2013. [Dissertation - Federal University of Mato Grosso do Sul].

The aim of this work was to study the therapeutic potential of mesenchymal stem cells (MSC) in the complete injury of the Achilles tendon in rabbits by histologic analysis. For both New Zealand rabbits were distributed among six groups (n=5). Statistical analysis was performed by Mann Whitney and Kruskal Wallis test ($p > 0,005$). Reducing inflammation between periods was observed in the rupture and rupture + MSC groups. As for the capillars, rupture group got smaller number than the other within 14 days. There was a higher number of arterioles in group rupture + suture than the other within 14 days. The structural disorganization was higher in the group of rupture compared to the other within 14 days. There was no difference between the periods of the rupture group with the highest value for the period of 14 days compared to 28 days, the same occurred in the rupture group + MSC. Based on these we can infer that the use of MSC in injury of the Achilles tendon of rabbits not sutured was similar to using the gold standard method, ie, suturing the tendon.

Keywords: musculoskeletal system, cell therapy, healing.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	10
3 OBJETIVOS	11
4 MATERIAIS E MÉTODOS	11
4.1 Delineamento experimental	11
4.2 Procedimento Anestésico.....	12
4.3 Procedimento cirúrgico	13
4.3.1 Coleta do Tecido Adiposo	13
4.3.2 Realização da lesão tendínea	14
4.3.3 Aplicação das CTM	15
4.4 Imobilização	15
4.5 Separação, cultivo e expansão das CTM	16
4.5.1 Separação das CTM	16
4.5.2 Cultivo e expansão das CTM	17
4.6 Obtenção das Amostras.....	17
4.7 Análise histológica	18
4.8 Análise estatística	18
5 RESULTADOS.....	19
6 DISCUSSÃO	24
7 CONCLUSAO	26
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27

1 INTRODUÇÃO

A ruptura tendínea é uma injúria aguda na qual os fatores extrínsecos predominam, apesar da importância dos fatores intrínsecos. Além disso, a etiologia permanece obscura. Tendinopatia degenerativa é o achado histológico mais comum nas rupturas espontâneas com o surgimento de células lipídicas, degeneração mucóide, calcificação tendínea ou a combinação destes fatores.^{1,2} Em alguns casos, o tendão não pode ser reparado o que requer restituição parcial ou total. Se não tratadas, as lesões podem levar a perda da função muscular e incapacidade significativa, o que pode afetar a qualidade de vida do paciente.³

O tendão de Aquiles é formado por fibras coalescentes dos músculos gastrocnêmio e sóleo. Este complexo fixa-se nas articulações do joelho e tornozelo, tornando-se mais susceptível a lesões do que músculos que se fixam em apenas uma articulação. É o tendão mais longo e forte do corpo, variando entre 12 e 15 cm de comprimento e é submetido a forças superiores a 10 vezes o peso corporal durante a corrida, experimentando mais de 7000 N de força.^{4,5,6}

O suprimento sanguíneo do tendão de Aquiles é segmentar e deriva predominantemente de vasos do paratendão. Há uma zona hipovascularizada entre 2 a 6 cm da sua inserção calcânea, correspondendo ao local de maior ocorrência das rupturas e tendinites.^{7,8}

As rupturas do tendão de Aquiles são lesões comuns em pacientes de trinta a cinquenta e cinco anos e responde por 35% de todas as lesões tendíneas com mais de 75% das lesões ocorrendo durante a participação em atividades esportivas.^{9,10} Apresenta uma incidência anual de 18 a 37 casos por 100.000 habitantes. Geralmente resultam de lesões indiretas ocasionadas por mecanismos que incluem tração forçada do pé com o joelho em extensão, dorsiflexão súbita e inesperada do tornozelo, ou dorsiflexão violenta com o pé em flexão plantar. O mecanismo de aceleração/ desaceleração é relatado em mais de 90% das lesões no esporte.¹¹ Os fatores adicionais implicados nas rupturas incluem microtraumas de repetição, hipóxia e degeneração mucóide, diminuição da perfusão resultante de mudanças degenerativas e administração sistemática ou infiltração local de corticosteroides.¹¹⁻

¹⁵ Apesar da recente atenção para o tratamento cirúrgico das rupturas, a decisão em tratar essas lesões cirurgicamente ou não permanece controversa.¹⁶⁻¹⁹

O tratamento não cirúrgico historicamente está associado a um alto risco de reruptura, variando de 13 a 30%, atrofia da musculatura da perna, mas com a vantagem de não apresentar complicações da ferida cirúrgica. O tratamento cirúrgico das rupturas do tendão de Aquiles resulta em menor porcentagem de reruptura (0 a 6%), mobilização precoce e melhor retorno ao esporte, mas com o risco das complicações da ferida (0 a 21%).¹⁶⁻²⁵

Estudos mostram que o tecido tendíneo cicatrizado apresenta uma densidade celular alta e diminuição da organização do colágeno em comparação ao tecido pré-lesado. Esta organização celular alterada serve como uma base para resultados ruins como reruptura, aderências restritivas e baixa função após o tratamento de lacerações tendíneas.²⁶⁻²⁸ Portanto, as opções de tratamento inovadoras para melhorar a cicatrização do tendão são de grande interesse. Altos índices de reruptura estimularam a investigação de métodos para modular a cicatrização tendínea promovendo melhor reparo com mais consistência com a arquitetura original do tendão.²⁹⁻³³

Pesquisas atuais têm se concentrado em novas técnicas de engenharia de tecidos, incluindo o uso de células-tronco mesenquimais (CTM) e fatores de crescimento (VEGF165, bFGF, rPDGF, GDF-5) como métodos alternativos para reparação de tendão.³⁴⁻⁴⁴ As CTM derivadas do tecido adiposo são multipotentes, possuem alta resposta a estímulos ambientais distintos e são de fácil isolamento.^{45,46} Tipicamente são abundantes em ambos, no ser humano e animais e pode ser facilmente obtidas do subcutâneo de forma percutânea ou com técnicas de incisão limitadas.⁴⁷

Em adultos, as CTM originam-se de numerosos tecidos como a medula óssea, tecidos perivasculares, sangue e tecido adiposo e a sua origem é importante para determinar sua atividade biológica.^{48,49,50} Todas podem ser usadas como fonte de células multipotentes para aplicação autóloga em transplante.

Células-tronco adultas podem participar na regeneração de danos teciduais por meio de dois mecanismos distintos: (I) contribuição direta por diferenciação em fenótipos de células tecido-específicas e (II) a produção de matriz extracelular. Para esse fim, células-tronco adiposas adultas apresentam a capacidade de diferenciarem-se em osteoblastos, mioblastos, condroblastos e tenócitos *in vitro* e *in vivo*.^{39,48,53-55} Potencialmente, pela mesma importância, células-tronco adultas derivadas de tecidos contribuem indiretamente para a cicatrização por meio da produção de proteínas bioativas como fatores de crescimento, fatores antiapoptóticos e agentes quimiotáticos. Estas proteínas secretadas têm o efeito na dinâmica celular, estimulação vascular e recrutamento de células-tronco adicionais capazes de promover maior estímulo cicatricial.⁵⁶

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Procedimentos para coleta de medula óssea são muito invasivos, dolorosos com taxas de complicação (acima de 30%) e fornecem baixo número de células.⁵⁵ No entanto, Juncosa-Melvin *et al.*⁵⁴ utilizou CTM derivadas da medula óssea de coelhos na lesão do tendão patelar e observou melhora biomecânica e histológica do tecido após doze semanas. O tecido adiposo promove um tipo alternativo de células multipotentes para cultura de expansão e pode ainda promover benefício na forma da população do concentrado de células mononucleadas, entre as quais encontramos as CTM.^{51,52}

Vishnubalaji *et al.*⁵⁶ compara a capacidade de diferenciação de células-tronco derivadas da medula óssea e do tecido adiposo de humanos e conclui que a colônia de células adiposas é capaz de produzir um maior número de células em um mesmo espaço de tempo, mas que ambas as colônias tem a mesma capacidade de diferenciação celular dependendo do local para onde são transportadas.

Segundo Dressler *et al.*⁵⁷, as CTM não perdem sua capacidade necessária para terapia celular de reparo com aumento da idade e quando estocadas por um período de até 3 anos continuam a promover reparo efetivo.

Konerding *et al.*⁵⁸ em seu estudo piloto utilizou fatores de crescimento (VEGF165, bFGF, rPDGF) para avaliar o reparo do tendão de Aquiles de coelhos suturados ou tratados conservadoramente e observou que não houve diferença na cicatrização.

Okamoto *et al.*⁵⁹ utilizou CTM derivadas da medula óssea e células hematopoiéticas frescas retiradas do íliaco de ratos e injetou em tendões lesionados e imobilizados e observou regeneração precoce do tendão.

3 OBJETIVOS

Objetivo geral: avaliar o potencial terapêutico das células tronco mesenquimais em lesão do tendão de Aquiles em coelhos.

Objetivo específico: Analisar, histologicamente, o reparo do tendão de Aquiles em coelhos submetidos a tratamento com o uso de CTM.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Delineamento experimental

Foram utilizados trinta coelhos raça Nova Zelândia, machos, adultos, com peso médio de 2,5kg. Os animais foram alojados individualmente em gaiolas recobertas com cepilho autoclavado, trocado semanalmente com o mínimo grau de liberdade de movimentos. Foi fornecida ração comercial (Guabi®) e água *ad libitum*. O experimento foi conduzido segundo as diretrizes da Declaração Universal dos Direitos dos Animais e com a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMS (protocolo No. 307/2011).

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos (n=5) sendo a Figura 1:

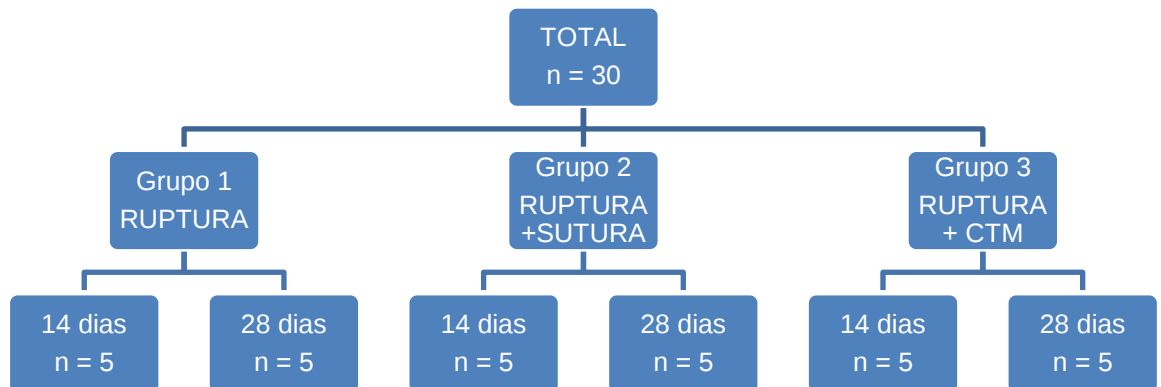


Figura 1 – Delineamento Experimental

Grupo 1 – Ruptura – foi realizada secção transversa do tendão de Aquiles.

Grupo 2 – Ruptura + sutura - foi realizada secção transversa do tendão seguida de sutura.

Grupo 3 – Ruptura + CTM – foi realizada secção transversa do tendão seguida do transplante de CTM.

Cada um dos grupos foi subdividido em dois lotes sendo um submetido à eutanásia com 14 dias após a ruptura do tendão e o outro com 28 dias.

4.2 Procedimento anestésico

Para a coleta do tecido adiposo foi realizada anestesia geral com associação de Quetamina-Xilazina na dose de 50mg/kg e 10mg/kg respectivamente, por via intramuscular.

Para a realização da lesão do tendão de Aquiles foi utilizado o mesmo procedimento descrito acima somado à injeção de Morfina (2 a 5mg/kg) por via subcutânea.

4.3 Procedimento cirúrgico

4.3.1 Coleta do Tecido Adiposo

Ao longo da linha dorsal localiza-se uma grande quantidade de tecido adiposo, há aproximadamente 5cm do occipito, na direção craniocaudal.

Após cuidados específicos de assepsia e antissepsia, em ambiente cirúrgico, foi realizada epilação e incisão cirúrgica longitudinal de 2 cm na linha dorsal, acima do local de maior acúmulo de tecido adiposo do animal, para realização da lipectomia em bloco com uso de lâmina de bisturi nº 24. Foi retirado 1cm³ de tecido adiposo e realizou-se lavagem do mesmo com Solução Tampão Fosfato suplementada com 1% de Penicilina/Estreptomicina (PBS 1%) em tubo cônico, estéril até a retirada do excesso de sangue (Figura 2). Foi realizada sutura da pele com fio de poliamida nº 4-0(Mononylon®) e curativo local.

O material foi estocado em ambiente refrigerado a 4°C por até 24 horas antes dos procedimentos de explante e cultivo celular das CTM.

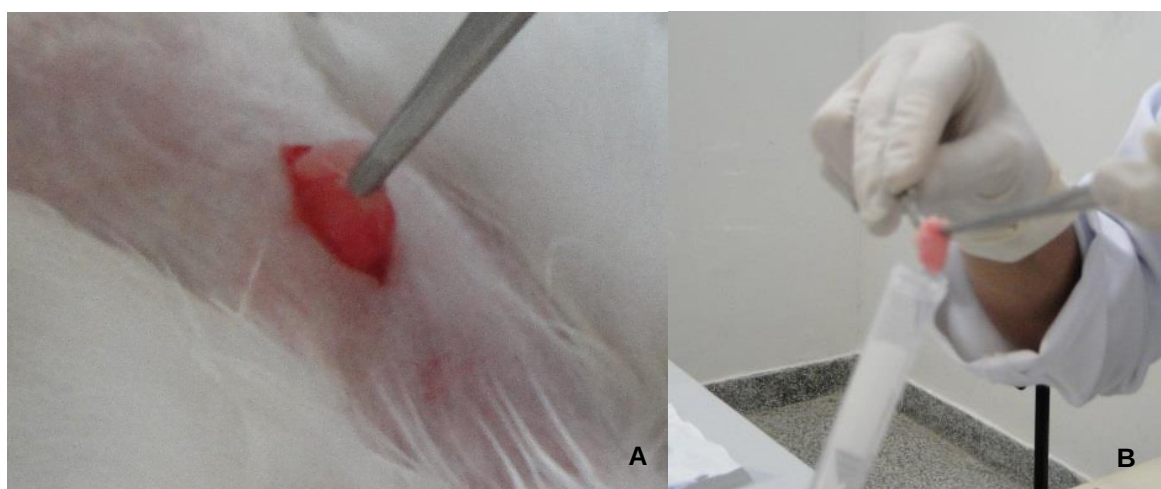


Figura 2. A. Obtenção do tecido adiposo. B – Tubo cônico estéril para lavagem do tecido.

4.3.2 Realização da lesão tendínea

Após cuidados específicos de assepsia e antissepsia, em ambiente cirúrgico, foi realizada epilação e incisão longitudinal, lateral ao tendão de Aquiles direito do animal, de aproximadamente 1,5 cm, com lâmina de bisturi nº 24 e exposição do tendão. Foi realizada secção transversa do tendão de Aquiles a 10 mm de sua inserção no calcâneo (Figura 3).

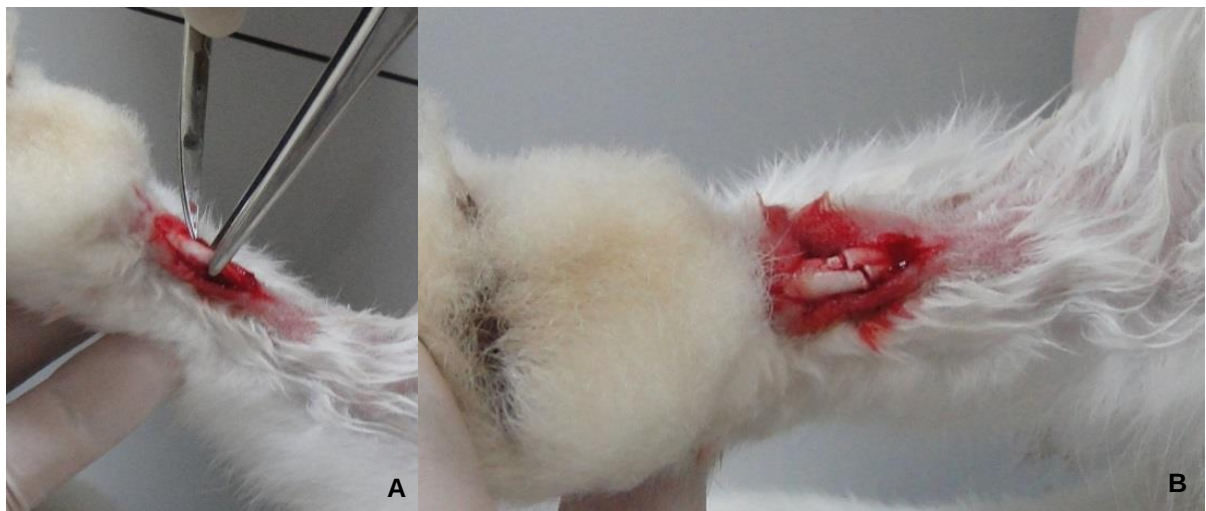


Figura 3. A – Incisão da pele e exposição do tendão de Aquiles. B – Realização da tenotomia.

Nos grupos Ruptura + Sutura, o tendão foi suturado com fio de poliamida 3-0 e 4-0 (Mononylon®) respectivamente, pela técnica de *Kessler* modificada por *Masson e Allen* (Figura 4).

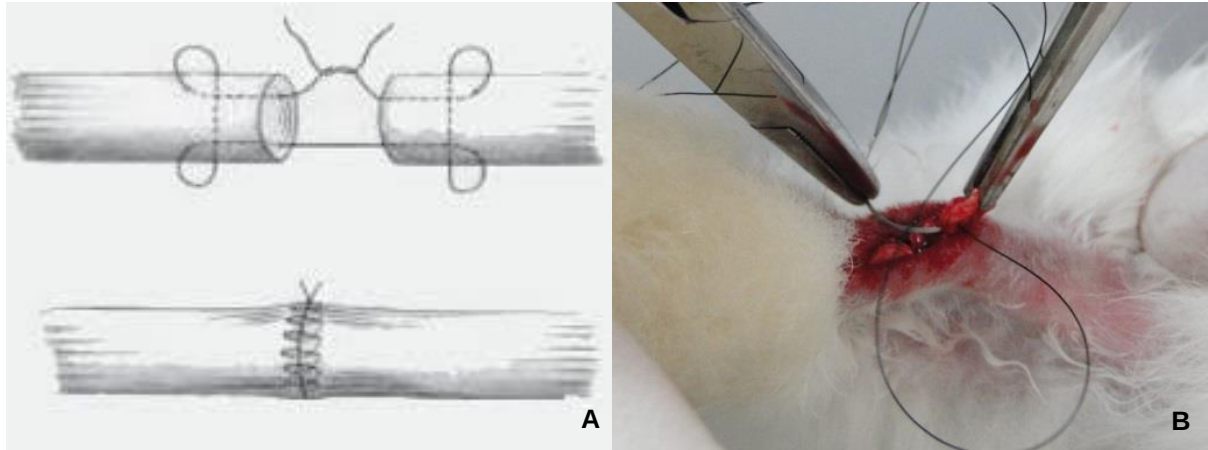


Figura 4. A – Técnica de *Kessler* modificada por *Masson e Allen*. B – Ato operatório.

4.3.3 Aplicação das CTM

Foi injetado volume de 0,1ml em seringa de 1ml e agulha 13 x 4,5 mm no local da lesão tendínea no grupo Ruptura + CTM.

A pele foi suturada com pontos simples de poliamida 4-0 (Mononylon®) e curativo local.

4.4 Imobilização

Todos os animais foram imobilizados em aparelho gessado, mantendo o tornozelo operado em posição equina (Figura 5) sendo que, nos grupos Ruptura e Ruptura + CTM, o controle da aproximação dos cotos foi realizado pela palpação e não identificação do afastamento entre os cotos do tendão previamente à instalação do gesso.



Figura 5. **A.** Ilustração da Imobilização. **B.** Imobilização da cobaia.

4.5 Separação, Cultivo e Expansão das CTM

4.5.1 Separação das CTM

O volume total da amostra coletada foi explantado (para tanto o tecido adiposo foi fragmentado em partes de aproximadamente $0,1\text{cm}^3$ em Placa de *Petri* contendo 3ml de PBS 0,1%). Logo em seguida o material de explante foi lavado por 6 vezes, durante 1 minuto em agitação moderada com movimentos giratórios, em 3ml de PBS 1%. Os fragmentos foram depositados em Placa de *Petri* contendo 10ml de meio de cultura Meio de Eagle Modificado por Dubelco's suplementado com 1% de Penicilina/Estreptomicina (DMEM 1%) por 5 minutos. Posteriormente, os fragmentos de tecido foram incubados com *HyQtase*® (*tripsina sintética*) – *HyClone*® por 20 minutos em banho-maria a 37°C , sendo agitados a cada 5 minutos com movimentos giratórios por 1 minuto. A suspensão foi centrifugada por 10 minutos a 2000rpm. Em seguida o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células ressuspensionado em PBS 1%. Em seguida acrescentou-se 3ml de PBS 1% e centrifugou-se a 2000rpm por 5 minutos sendo posteriormente o sobrenadante descartado e o *pellet* ressuspensionado novamente em PBS 1%. Este procedimento foi realizado em triplicata. Posteriormente as células obtidas foram ressuspensionadas com 510 μl de DMEM a 1%. Uma alíquota de 10 μl foi destinada à análise da concentração celular e viabilidade celular em Câmara de Neubauer. Para a análise da viabilidade

celular foi utilizado Azul de Tripan na proporção de 1:1. A concentração de $2,5 \times 10^5$ células foi semeada em frascos de cultivo celular (25cm^3) contendo DMEM suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino e 1% de Penicilina/Estreptomicina. O cultivo se deu em incubadora de CO_2 à 37°C e 5% de CO_2 .

4.5.2 Cultivo e Expansão das CTM

As CTM obtidas foram semeadas em frascos de cultura de 25cm^3 de volume à razão de $2,5 \times 10^5$ células por placa e cultivadas em meio DMEM contendo 10% de Soro Bovino Fetal, suplementado com penicilina e estreptomicina na proporção de 1:1. A partir das primeiras 48 horas, o meio de cultura suplementado foi trocado a cada 48 horas, sendo que as duas primeiras trocas foram intermediadas por uma lavagem com PBS, para retirada de resíduos. Essas trocas foram feitas até que as células alcançassem aproximadamente 70% de confluência, quando foram submetidas à tripsinização.

Para a tripsinização, o meio de cultura foi descartado e a cultura foi lavada por três vezes com 3ml de PBS. Após descarte do PBS, 1ml de solução de tripsina (0,2%) foi adicionado e os frascos foram incubados a 37°C por 2-3 minutos. Logo em seguida foi adicionado 10ml de DMEM suplementado. As células foram analisadas quanto à viabilidade e concentração e semeadas em frascos de cultivo celular de 25cm^3 de volume por razão binária, promovendo assim sua expansão.

4.6 Obtenção das amostras biológicas

Os animais foram submetidos à eutanásia por injeção intraperitoneal de pentobarbital (100mg/kg) após 14 ou 28 dias do procedimento operatório. As patas traseiras operadas foram dissecadas, preservando-se a integridade do tendão de

Aquiles e foi retirado um fragmento do tendão com margem de 10 mm proximal e distal ao local da secção transversa.

4.7 Análise histológica

Para a análise histológica, o fragmento do tendão de Aquiles de cada animal foi fixado em solução de formaldeído a 4% por cinco dias, processado, incluído em parafina, cortado transversalmente (5µm de espessura) e corado pelas técnicas:

(I) Hematoxilina-eosina – Para estudo, ao nível do tendão, da vascularização e proliferação de fibroblastos; e

(II) Tricrômico de Gomori – Estudo do colágeno I que aparece sob a forma de fibras grosseiras coradas em verde;

As lâminas foram submetidas à avaliação histológica, em sistema duplo cego, em microscopia de campo claro.

4.8 Análise estatística

Para comparação das médias dos escores em cada grupo entre os períodos (14 dias versus 28 dias) foi utilizado o Teste *Mann Whitney*. Para a comparação entre os grupos (ruptura versus ruptura + sutura versus ruptura + CTM) nos períodos de estudo (14 e 28 dias) foi utilizado o Teste *Kruskal Wallis*. (Tabela 2). O nível de significância adotado foi de 5%. Foi utilizado o programa estatístico BioEstat versão 5.0.⁶⁰

As variáveis ordinais foram expressas em escores cujas equivalências estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 – Classificação dos achados histológicos encontrados no sítio da lesão tendínea.

Variáveis		Classificação	Escore
		Ausência	0
Processo inflamatório	+	1 foco	1
	++	2 coleções com linfócitos e histiócitos com esboço de folículos linfóides	2
	+++	Processo inflamatório difuso	3
		Ausência	0
Tecido adiposo	+	1 a 2 coleções de adipócitos	1
	++	3 a 5 coleções de adipócitos*	2
	+++	Mais de 5 coleções de adipócitos*	3
		Ausência	0
Capilares	+	Até 5*	1
	++	5 a 10*	2
	+++	Acima de 10*	3
		Ausência	0
Arteríolas	+	1 a 3 por campo**	1
	++	3 a 5 por campo**	2
	+++	Acima de 5 por campo**	3
		Ausência	0
Desorganização estrutural	+	Leve	1
	++	Moderado	2
	+++	Acentuado	3

* Aumento de 40x

** Campo de pequeno aumento

5 RESULTADOS

Na Tabela 2 estão apresentados os dados relativos à análise histológica.

Se avaliado o processo inflamatório pode-se verificar que não há diferença entre os grupos para os dois períodos de análise (14 e 28 dias, $p > 0,05$). No entanto, observou-se que o processo inflamatório diminuiu do primeiro (14 dias) para o segundo momento (28 dias) de avaliação dentro do mesmo grupo sendo eles ruptura e ruptura + CTM.

Em relação a metaplasia marcada pela presença de tecido adiposo, tecido condroide e mucina pode-se observar que não existe diferenças ($p < 0,05$) entre os grupos e nem mesmo dentro do grupo se comparados os dois períodos de análise.

No que tange o desenvolvimento de capilares e arteríolas pode-se observar que existem diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos somente no primeiro momento de análise (14 dias). Para capilares registra-se um aumento ($p < 0,05$) nos grupos ruptura + sutura e Ruptura + CTM se comparados com ruptura. Para as arteríolas observou-se aumento ($p < 0,05$) para o grupo ruptura + sutura de comparado aos outros dois grupos (ruptura; ruptura + CTM). Para o segundo momento de análise (28 dias) e/ou para a comparação dentro dos grupos nos dois momentos de análise não foram evidenciadas diferenças ($p > 0,05$).

Quando avaliada a organização estrutural observou-se que existem diferenças ($p < 0,05$) entre os grupos quando avaliado o primeiro momento (14 dias) onde nota-se redução ($p < 0,05$) do grupo ruptura + sutura e ruptura + CTM se comparados com o grupo ruptura. Se comparada a organização estrutural dentro do mesmo grupo, ao longo dos dois períodos, observa-se que há uma diminuição ($p < 0,05$) para o grupo ruptura e ruptura + CTM.

Tabela 2 – Média e desvio padrão (DP) dos escores das variáveis de estudo segundo grupo de intervenção, UFMS – 2013

Variáveis	Ruptura		Ruptura + sutura		Ruptura + CTM		⁽¹⁾ <i>p</i>
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
Processo Inflamatório							
14 dias	1,3	0,5	1,3	0,6	1,4	0,5	0,902
28 dias	0,0	0,0	0,6	0,5	0,2	0,4	0,230
<i>p</i> ⁽²⁾		0,011		0,100		0,014	
Tecido adiposo							
14 dias	1,5	0,6	1,7	0,6	1,0	0,7	0,328
28 dias	0,8	0,1	1,0	1,0	0,7	1,2	0,800
<i>p</i> ⁽²⁾		0,286		0,273		0,315	
Capilares							
14 dias	^a 2,0	0,0	^b 3,0	0,0	^b 3,0	0,0	0,004
28 dias	2,0	0,0	2,4	0,5	2,7	0,5	0,062
<i>p</i> ⁽²⁾		1,000		0,100		0,361	
Arteríolas							
14 dias	^a 0,8	0,5	^b 2,0	0,0	^a 1,0	0,0	0,009
28 dias	1,0	0,0	1,6	0,5	1,2	0,4	0,068
<i>p</i> ⁽²⁾		0,522		0,273		0,648	
Desorganização estrutural							
14 dias	^a 3,0	0,0	^b 2,3	0,6	^b 2,0	0,0	0,014
28 dias	2,0	0,6	1,6	0,5	1,2	0,4	0,064
<i>p</i> ⁽²⁾		0,033		0,100		0,022	
Tecido condróide							
14 dias	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-
28 dias	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-
<i>p</i>		-		-		-	
Mucina							
14 dias	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-
28 dias	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-
<i>P</i>		-		-		-	

⁽¹⁾ Teste *Kruskal Wallis*. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.

⁽²⁾ Teste *Mann Whitney* (14 dias versus 28 dias). Desconsiderar as letras sobrescritas quando presentes.

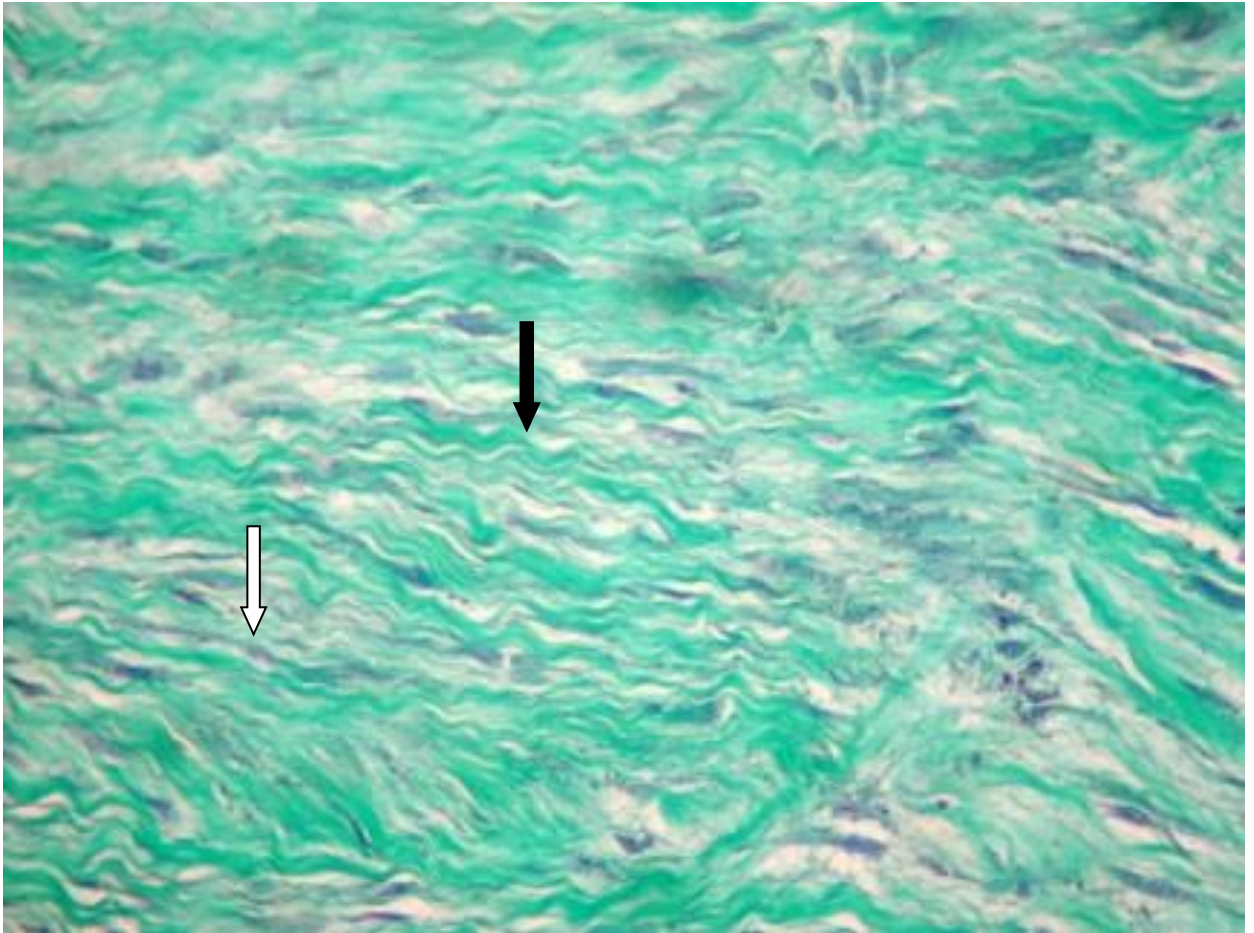


Figura 6. Fotomicrografia em coloração de Tricômico de Gomori. Fibras colágenas tipo I (seta preta) e III (seta branca). Aumento de 400x. Grupo Ruptura + CTM com 14 dias - fibras colágenas organizadas.

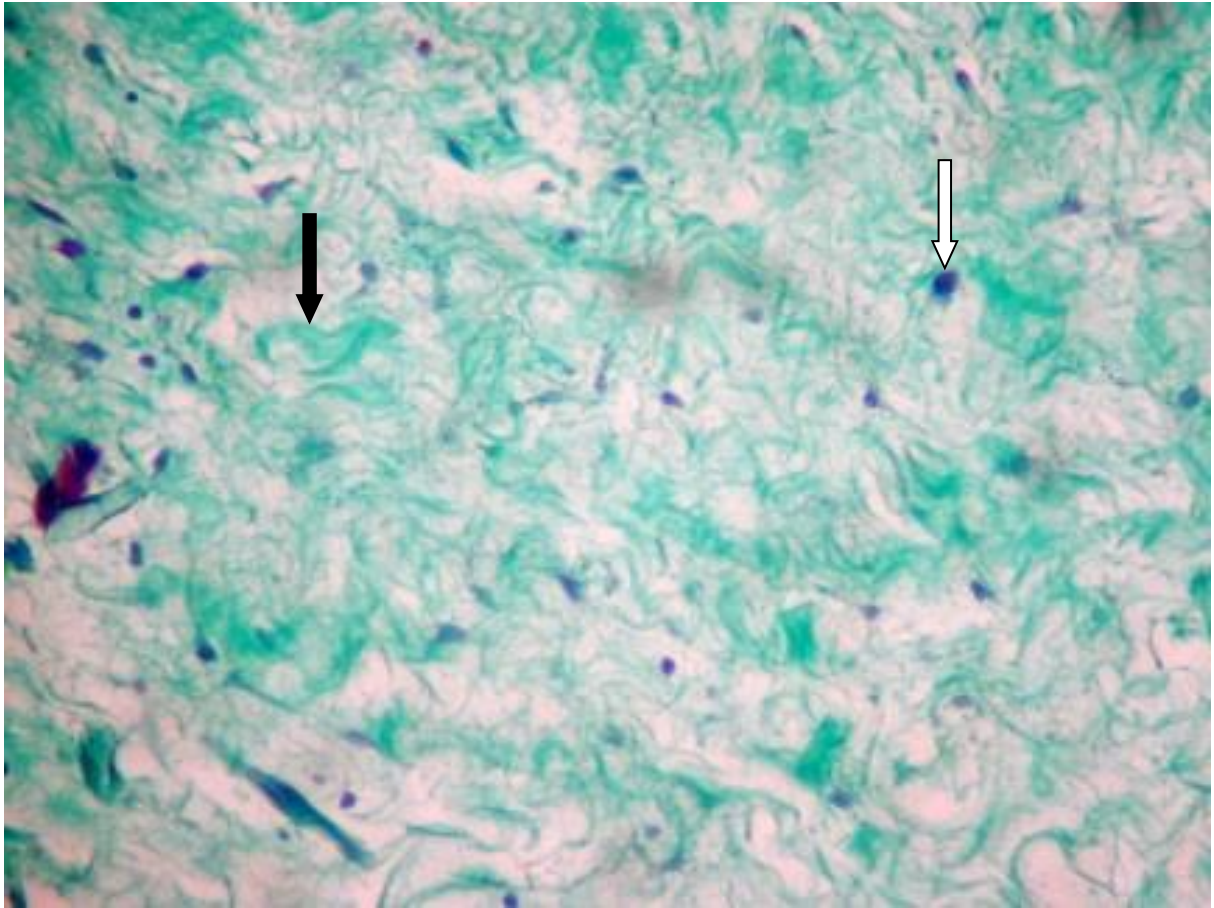


Figura 7. Fotomicrografia em coloração de Tricômico de Gomori. Fibras colágenas tipo I (seta preta) e III (seta branca). Aumento de 400x. Grupo Ruptura com 14 dias – fibras colágenas desorganizadas.

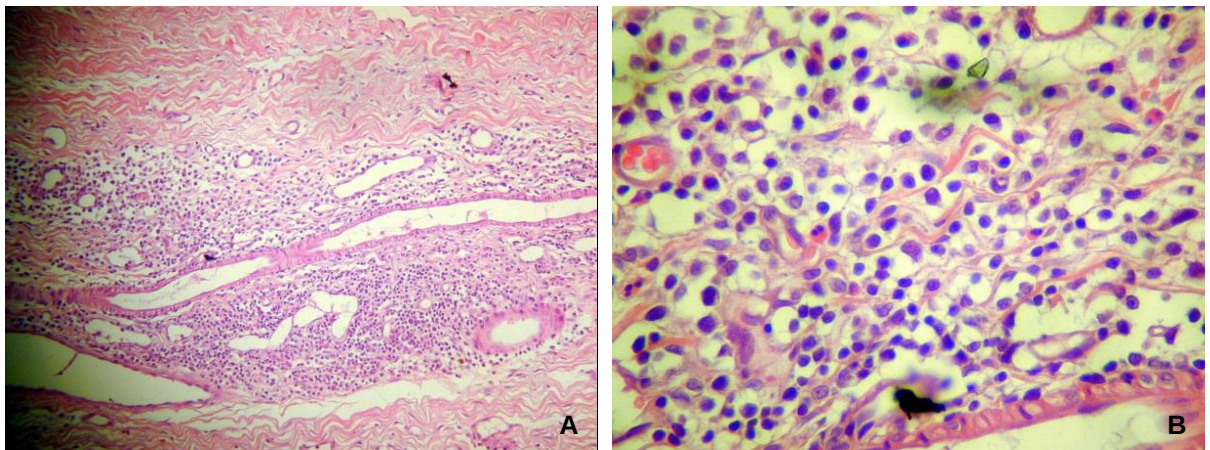


Figura 8. Fotomicrografia em coloração de Hematoxilina-eosina. Processo inflamatório. Grupo Ruptura + Sutura com 14 dias. **A** – aumento de 100x. **B** – aumento de 400x.

6 DISCUSSÃO

Este trabalho avaliou o efeito da terapia celular com CTM derivadas do tecido adiposo na regeneração do tendão de Aquiles, com foco no emprego deste método em tendões não suturados, pois os trabalhos na literatura avaliam o seu emprego em tendões suturados.^{2,61}

Apesar das rupturas do tendão de Aquiles ocorrerem geralmente por tendinopatia prévia e haver um esgarçamento de suas fibras na observação macroscópica, os trabalhos na literatura têm submetido o tendão à ruptura transversa a 10mm da inserção do tendão no calcâneo, local que corresponde a área mais resistente às forças de tensão e por isso esta mesma técnica foi utilizada neste trabalho.^{3,61,62}

A reabilitação após lesão tendínea e reparo é um processo que geralmente leva semanas. Durante este período, imobilização e proteção do movimento são necessários.⁶³ Essa restrição põe o tendão em risco de complicações como adesões e pobre qualidade de reparo além do que as propriedades biomecânicas e mecânicas dos tendões cicatrizados nunca atingem aquelas de tendões intactos.⁶⁴

Chong *et al.*⁶¹, Daher *et al.*⁶² e Young *et al.*⁶⁵ não utilizam a imobilização como método pós-operatório pelas complicações já mencionadas. Gossman *et al.*⁶⁶ avaliou o alongamento e circunferência dos músculos sóleo e plantar de coelhos após imobilização gessada e observou que não houve alteração de ambos quando o músculo foi imobilizado em posição alongada. Neste trabalho houve a necessidade de manutenção do músculo com encurtamento para aproximar os cotos proximal e distal após lesão tendínea nos grupos Ruptura e Ruptura + CTM.

Foi realizada análise histológica com 14 e 28 dias após o procedimento pois a fase crítica da cicatrização do tendão está no período de 14 a 16 dias. Em 1987 estudou-se a cicatrização dos tendões e determinou que, a fase de exsudação e união de fibrina inicia-se por volta do quinto dia de pós-operatório, quando a força de tensão ainda é muito pequena. A partir do 5º dia de pós-operatório, inicia-se a fase de fibroplasia e a força de tensão começa aumentar atingindo a estabilização por

volta do 14° ao 16° dia de pós-operatório, fase em que a tenorrafia ainda depende muito do fio da sutura. A partir desse período inicia-se a fase de maturação, organização e diferenciação, e a força de tensão vai aumentando gradativamente por um período de tempo indeterminado.^{67,68} Por esse motivo optou-se pela avaliação com 14 e 28 dias de pós-operatório.

Foi observado que o processo inflamatório foi maior no grupo 3 (ruptura + sutura) em ambos os períodos (14 e 28 dias) com relação aos grupos 1 e 2. Esse fato pode significar que o uso de sutura, tipo de fio utilizado e técnica empregada aumenta o dano ao tecido como observado em trabalhos na literatura.⁶⁹⁻⁷⁵ Os fios de sutura monofilamentares inabsorvíveis, como o utilizado neste trabalho, são comumente utilizados nos reparos tendinosos, pois permanecem por longo tempo sem perder sua força de tração, necessária no período de cicatrização do tendão. Esse processo se dá até a quarta ou quinta semanas de pós operatório⁶⁷. No entanto os fios inabsorvíveis têm o inconveniente de propiciar a formação de granuloma tipo corpo estranho⁷⁶.

O número de capilares foi menor no grupo ruptura com 14 dias e não houve diferença entre os grupos no período de 28 dias e entre os períodos para cada grupo. Conforme o trabalho de Okamoto *et al.*⁵⁹, as CTM além de agirem com fator extrínseco para cicatrização tendínea, promovem a liberação de fatores de crescimento e citocinas aumentando a vascularidade local. O uso da sutura, devido a sua reação de corpo estranho, também aumenta a vascularização como já mencionado. No presente estudo corrobora esses achados visto que os grupos ruptura + sutura e ruptura + CTM possuem o mesmo escore de vascularização.

A desorganização estrutural foi maior no grupo ruptura com 14 dias e entre os períodos houve maior desorganização nos grupos ruptura e ruptura + CTM. A sutura do tecido facilitou a orientação das fibras de colágeno para cicatrização o que está de acordo com trabalhos na literatura nos quais enfatizam inclusive a mobilização precoce.⁷³⁻⁷⁵

Daher *et al.*⁶¹ ao realizar análise histológica do tendão de Aquiles de ratos submetidos à ruptura, sutura e injeção de CTM nos períodos de 2, 4 e 6 semanas, quando comparados ao grupo ruptura e sutura, observou que, com 2 semanas

houve maior organização celular no grupo experimento, já com 4 e 6 semanas a organização foi similar ao grupo controle.

O trabalho de Park *et al.*⁷⁷ demonstra a necessidade do uso de fatores de crescimento como o GDF-5 (Growth Differentiation Factor-5) associados a terapia com células-tronco para crescimento tecidual tendíneo, especificamente.

Young *et al.*⁶⁵ utilizaram células mesenquimais semeadas em matriz de colágeno para reparo do tendão de Aquiles em coelhos e observaram melhora na biomecânica, estrutura e função do tendão após a lesão no primeiro grupo.

Rosenbaun *et al.*² em seu trabalho, correlaciona a histologia com a biomecânica. Ele apresenta um sistema de graduação histológica com três variáveis, sendo elas o colágeno, a angiogênese e a formação de cartilagem e conclui que somente com o somatório das alterações encontradas em cada uma delas é que se pode correlacionar com o teste biomecânico. Um dos benefícios do trabalho é que o pesquisador pode alcançar uma estimativa real da performance biomecânica com menor custo.

7 CONCLUSÃO

Frente ao exposto infere-se que o uso de CTM em lesão do tendão de Aquiles de coelhos não suturados foi similar ao uso do método padrão-ouro, ou seja, sutura do tendão o que demonstra um importante potencial terapêutico.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Vailas AC, Tipton CM, Laughlin HL, Tcheng TK, Matthes RD. Physical activity and hypophysectomy on the aerobic capacity of ligaments and tendons. *J Appl Physiol.* 44:542-546, 1978.
2. Rosenbaum AJ, Wicker JF, Dines JS, Bonasser L, Razzano P, MS Dines DM, Grande DA. Histologic States of Healing Correlate with restoration of Tensile Strength in a Modelo of Experimental Tendo Repair. *HSSJ* 6: 164-170, 2010.
3. Thein TB, Becker JH, and Theis JC. Rehabilitation after surgery for flexor tendo injuries in the hand. *Cochrane Database System Ver. 4: CD003979*, 2004.
4. Clain MR, Baxter DE. Achilles Tendinitis. *Foot Ankle Int.* 13:482, 1992.
5. Burdett RG. Forces predicted at the ankle during running. *Med Sci Sports Exerc.* 14: 308, 1982.
6. Scott SH, Winter DA. Internal forces of chronic running injury sites. *Med Sci Sports Exerc.* 22: 357,1990.
7. Carr AJ, Norris SH: The blood supply of the calcaneal tendon. *J Bone Joint Surg.* 71B:100, 1989.
8. Langergren C, Lindholm A. Vascular distribution in the Achilles tendon: an angiographic and microangiographic study. *Acta Chir Scand.* 116:491,1959.
9. Beskin JL, Sanders RA, Hunter SC, Hughston JC. Surgical repair of Achilles tendo ruptures. *Am J Sports Med.*15:1-8, 1987.
10. J´ozsa L, Kvist M, B´alint BJ, Reffy A, J´arvinen M, Lehto M, Barzo M. The role of recreational sport activity in Achilles tendon rupture. A clinical, pathoanatomical, and sociological study of 292 cases. *Am J Sports Med.*17:338-43, 1989.

11. Soldatis JJ, Goodfellow DB, Wilber JH. End-to-end operative repair of Achilles tendon rupture. *Am J Sports Med.* 25:90-95, 1997.
12. Fox JM, Blazina ME, Jobe FW, Kerlan RK, Carter VS, Shields CL Jr, Carlson GJ. Degeneration and rupture of the Achilles tendon. *Clin Orthop Relat Res.*107: 221-4, 1975.
13. Kannus P, J´ozsa L. Histopathological changes preceding spontaneous rupture of a tendon. A controlled study of 891 patients. *J Bone Joint Surg Am.* 73:1507-25, 1991.
14. Lagergren C, Lindholm A. Vascular distribution in the Achilles tendon; an angiographic and microangiographic study. *Acta Chir Scand.*116:491-5, 1959.
15. Mahler F, Fritschy D. Partial and complete ruptures of the Achilles tendon and local corticosteroid injections. *Br J Sports Med.* 26:7-14; 1992.
16. Assal M, Jung M, Stern R et al. Limited open repair of Achilles tendon ruptures: a technique with a new instrument and findings of a prospective multicenter study. *J Bone Joint Surg Am.* 84-A(2):161 – 70, 2002.
17. Bhandari M, Guyatt GH, Siddiqui F et al. Treatment of acute Achilles tendon ruptures: a systematic overview and metaanalysis.*CORR.* (400):190-200, 2002.
18. Jaakkola JI, Beskin JL, Griffith LH, Cernansky G. Early ankle motion after triple bundle technique repair vs.casting for acute Achilles tendon rupture. *Foot Ankle Int.* 22(12):979 – 84, 2001.
19. Khan RJ, Fick D, Keogh A et al. Treatment of acute Achilles tendon ruptures. A metaanalysis of randomized, controlled trials. *J Bone Joint Surg Am.* 87(10):2202-10,2005.

20. Amlang MH, Christiani P, Heinz P, Zwipp H. Percutaneous technique for Achilles tendon repair with the Dresden Instruments and results. *Unfallchirurg* 108(7):529-36, 2005.
21. Beskin JL, Sanders RA, Hunter SC, Hughston JC. Surgical repair of Achilles tendon ruptures. *Am J Sports Med.* 15(1):1-8, 1987.
22. Cretnik A, Kosanovic M, Smrkolj V. Percutaneous suturing of the ruptured Achilles tendon under local anesthesia. *J foot Ankle Surg.* 43(2):72-81, 2004.
23. Haji A, Sahai A, Symes A, Vyas JK. Percutaneous versus open tendon Achilles repair. *Foot Ankle Int.* 25(4):215-8, 2004.
24. Mortensen NH, and Pedersen B. Wound complications after suturing of Achilles tendon ruptures. *UgeskrLaeger* 152(44):3248-50, 1990.
25. Richardson LC, Reitman R, Wilson M. Achilles tendon ruptures: functional outcome of surgical repair with a “pull-out” wire. *Foot Ankle Int.* 24(5):439-43, 2003.
26. Kleinert, H.E., Serafin, D., Kutz, J.E., and Atasoy, E. Reimplantation of amputated digits and hands. *Orthop Clin North Am* 4, 957, 1973.
27. Morberg, P., Jerre, R., Sward, L., and Karlsson, J. Long-term results after surgical management of partial Achilles tendo ruptures. *Scand J Med Sci Sports* 7, 299, 1997.
28. Jo´ zsa, L., and Kannus, P. Human Tendons: Anatomy, Physiology, and Pathology. Champaign, IL: Human Kinetics, 1997.
29. Rosedale PD, Hopes R, Wingfield-Digby NJ, et al. Epidemiological study of wastage among racehorses in 1982 and 1983. *Vet Rec.* 116:66–69, 1985.
30. Foland J, Trotter GW, Powers BE, et al. Effect of sodium hyaluronate in collagenase-induced superficial digital flexor tendinitis in horses. *Am J Vet Res.* 53:2371–2376, 1992.

31. Gift LJ, Gaughan EM, DeBowes RM, et al. The influence of intratendinous sodium hyaluronate on tendon healing in horses. *Vet Comp Orthop Traumatol*.4:151–157, 1992.
32. Ferraro GL. Lameness diagnosis and treatment in the Thoroughbred race horse. *Vet Clin North Am Equine Pract*.6:63–84, 1990.
33. Murphy DJ, Nixon AJ. Biochemical and site-specific effects of insulin-like growth factor I on intrinsic tenocyte activity in equine flexor tendons. *Am J Vet Res*.58:103–109,1997.
34. Zaidi N, Nixon AJ. Stem cell therapy in bone repair and regeneration. *Ann N Y Acad Sci*.1117:62–72,2007.
35. Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, et al. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am*.80:985–996, 1998.
36. Smith RK, Korda M, Blunn GW, et al. Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. *Equine Vet J*.35:99–102,2003.
37. Di RG, Iachininoto MG, Tritarelli A, et al. Myogenic potential of adipose-tissue-derived cells. *J Cell Sci*.119:2945–2952,2006.
38. Strem BM, Hicok KC, Zhu M, et al. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med*.54:132–141,2005.
39. Bosnakovski D, Mizuno M, Kim G, et al. Isolation and multilineage differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Res*.319:243–253,2005.
40. Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med*.8:301–316,2004.

41. Caplan AI. Review: mesenchymal stem cells: cell-based and constructive therapy in orthopedics. *Tissue Eng.*11:1198–1211,2005.
42. Grove JE, Bruscia E, Krause DS. Plasticity of bone marrow-derived stem cells. *Stem Cells.*22:487–500,2004.
43. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science.*276:71–74,1997.
44. Zuk PA, Benhaim P, Hedrick MH. Stem cells from adipose tissue. In: Lanzer R, Blau H, Melton D, et al, eds. *Handbook of stem cells. Volume 2. Adult and fetal stem cells.* New York: Academic Press Inc.425 447,2004.
45. Uysal AC, and Mizuno H. Tendon regeneration and repair with adipose-derived stem cells.Curr Stem Cell Res Ther. Nov 26, 2009.
46. Rickert M, Jung M, Adiyaman M, Richter W, and Simank HG, A growth and differentiation factor-5 (GDF-5)-coated suture stimulates tendo healing in na Achilles tendo model in rats. *Growth Factors* 19, 115, 2001.
47. Katz AJ, Tholpady A, Tholpady SS, Shang H, and Ogle RC. Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (haDAS) cells. *Stem Cells* 23, 412, 2005.
48. Bi Y, Ehirchiou D, Kilts TM, et al. Identification of tendon stem/ progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche. *Nat Med.*13:1219–1227,2007.
49. Strem BM, Hedrick MH. The growing importance of fat in regenerative medicine. *Trends Biotechnol.*23:64–66, 2005.
50. Sakaguchi Y, Sekiya I, Yabishita K, Muneta T. Comparision of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority os synovium as a cell source. *Arthritis Rheum* 52:2521-2529, 2005.

51. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 13:4279–4295,2002.
52. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, et al. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol*.24:150–154,2006.
53. Nathan S, Das DS, Thambyah A, et al. Cell-based therapy in the repair of osteochondral defects: a novel use for adipose tissue. *Tissue Eng*.9:733–744, 2003.
54. Juncosa-Melvin N, Bovin GP, Gooch C, Galloway MT, West Jr, Dunn MG, Butler DL. The effect of autologous mesenchymal stem cells on the biomechanics and histology of gel-collagen sponge constructs used for rabbit patellar tendon repair. *Tissue Eng*. 12(2): 369-79. Feb. 2006.
55. Starnes, T., Huang, D., Kesturu, G., James, R., Balian, G., and Chhabra, A.B., GDF-5 induced tendon repair and regeneration. AAOS Annual Meeting San Diego.2007.
56. Vishnubalaji R, Al-Nbaheen, Kadalmani B, Aldahmash A, Ramesh T. Comparative investigation of the differentiation capability of bone-marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells by qualitative and quantitative analysis. *Cell Tissue Res*. 347: 419-427. Jan. 2012. Cowan CM, Shi YY, Aalami OO, et al. Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. *Nat Biotechnol*, 22:560–567, 2004.
57. Dressler MR, Butler DL, Boivin GP. Effect of age on the repair ability of mesenchymal stem cells in rabbit tendon. *J of Orthopaedic Research*. 23:287-293. 2005.
58. Konerding MA, Arlt F, Wellman A, Li V, Li W. Impact of combinatory growth factor application on rabbit Achilles tendon injury with operative versus conservative treatment: a pilot study. *Int J Mol Med*. 25(2): 217-24. Feb, 2010.

59. Okamoto N, Kushida T, Oe K, Umeda M, Ikehara S, Iida H. Treating Achilles Tendon Rupture in Rats with Bone-Marrow-Cell Transplantation Therapy. *J Bone Joint Surg Am*. 92: 2776-84, 2010.
60. Ayres M, Ayres Jr. M, Ayres DL, Santos AAS. BioEstat. Aplicações estatísticas das Ciências Bio-médicas [programa de computador]. Versão 5.0. Belém (PA): Sociedade Mamirauá; 2007.
61. Daher RJ, Chahine NO, Razzano P, Patwa SA, Sgaglione NJ, Grande DA. Tendon repair augmented with a novel circulating stem cell population. *Int J Clin Exp Med*. 4(3): 214-219, 2011.
62. Chong AK; Ang AD; Goh JC; Hui JH; Lim AY; Lee EH; Lim BH. . Bone marrow-derived mesenchymal stem cells influence early tendon-healing in a rabbit Achilles tendon model. *J BoneJoint Surg Am*; 89(1): 74-81, Jan 2007.
63. Kvist M. Achilles tendo injuries in athletes. *Sports Med*. 18: 173, 1994.
64. Winter E, Weise K, Weller S, and Ambacher T. Surgical repair os Achilles tendon rupture. Comparison of surgical with conservative treatment. *Arch Orthop Trauma Surg*. 117:364, 1998.
65. [Young RG](#), [Butler DL](#), [Weber W](#), [Caplan AI](#), [Gordon SL](#), [Fink DJ](#). Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. [J Orthop Res](#).16(4):406-13.Jul, 1998.
66. Gossman MR, Rose SJ, Sahrmann AS, Katholi CR. Length and Circunference Measurements in One-Joint and Multijoint Muscles in Rabbits After Immobilization. *Phys Ther*. 66: 516-520. 1986.
67. Carlstedet CA, Skagervall R. A model for computer-aided analysis of biomechanical properties of the plantaris longus tendon in the rabbit. *J Biomechanics*. 19(3):251-6, 1986.

68. O'Broin ES, Earley MJ, Smyth H, Hooper AC. Absorbable sutures in tendon repair: a comparison of PDS with prolene in rabbit tendon repair. *J Hand Surg.* 20(4):505-8, 1995.
69. Karjalainen T, He M, Chong AK, Lim AY, Ryhanen J. Nickel-titanium wire in circumferential suture of a flexor tendon repair: a comparison to polypropylene. *J Hand Surg Am.* 35(7):1160-4, 2010.
70. Lee SK, Goldstein RY, Zingman A, Terranova C, Nasser PH, Hausman MR. The effects of core suture purchase on the biomechanical characteristics of a multistrand locking flexor tendon repair: cadaveric study. *J Hand Surg Am.* 35:1165-71, 2010.
71. Klein L. Early active motion flexor tendon protocol using one splint. *J HandTher.* 16(3):199-206, 2003.
72. Cao Y, Tang JB. Biomechanical evaluation of a four-Strand modification of the Tang method of tendon repair. *J Hand Surg Br.* 30(4):374-8, 2005.
73. Smith AM, Evans DM. Biomechanical assessment of a new type of flexor tendon repair. *J Hand Surg Br.* 26(3):217-9, 2001.
74. Groth GN. Current practice patterns of flexor tendon rehabilitation. *J HandTher.* 18(2):169-74, 2005.
75. Lawrence TM, Woodruff MJ, Aladin A, Davis TR. An assessment of the tensile properties and technical difficulties of two- and four-strand flexor tendon repairs. *J Hand Surg Br.* 30(3):294-7, 2005.
76. Mason ML, Allen HS. The rate of healing of tendons. *Ann Surg.* b;113(3):424-59, 1940.
77. Park A; Hogan MV; Kesturu GS; James R; Balian G; Chhabra AB. Adipose-derived mesenchymal stem cells treated with growth differentiation factor-5 express tendon-specific markers. *Tissue Eng Part A*; 16(9): 2941-51. Sep, 2010.