

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a
partir de 27/10/2023.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**BIOTINTA DE MATRIZ EXTRACELULAR EQUINA PARA
BIOENGENHARIA TENDÍNEA**

FERNANDA DE CASTRO STIEVANI

Botucatu, São Paulo
Outubro de 2021.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**BIOTINTA DE MATRIZ EXTRACELULAR EQUINA PARA
BIOENGENHARIA TENDÍNEA**

FERNANDA DE CASTRO STIEVANI

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Prof.^a Dra Ana Liz Garcia Alves

Botucatu, São Paulo
Outubro de 2021.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Stievani, Fernanda de Castro.

Biotinta de matriz extracelular equina para bioengenharia tendínea / Fernanda de Castro Stievani. - Botucatu, 2021

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Ana Liz Garcia Alves

Capes: 50701002

1. Células-tronco. 2. Biomateriais. 3. Bioimpressão.
4. Bioengenharia. 5. Matriz extracelular.

Palavras-chave: Bioimpressão; Biomateriais; Células tronco; Tenogênese.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por iluminar minhas escolhas e proteger meu caminho até agora.

Agradeço aos meus pais, Alexandre e Mara e aos meus irmãos Marcela e Conrado e sobrinhos maravilhosos (Helena, Otávio e Henrique) por me apoiarem, incentivarem, consolarem e viabilizarem esse período, mesmo sabendo que os frutos seriam colhidos depois de muito tempo.

Agradeço aos meus tios, Melânia, Mauro e Maria Aparecida de Castro, aos meus padrinhos Carlos e Silvana Ebeling, pela torcida e por me ajudarem na viagem que possibilitou a realização desse trabalho. E aos meus primos, Melina de Castro Ciardulo e Antônio Mauro de Castro Junior, pelo carinho infinito.

Agradeço à minha orientadora Profa. Dra. Ana Liz Garcia Alves pela oportunidade de trabalhar com algo tão inovador no nosso país e por sempre buscar e me fazer buscar o máximo de qualidade e confiabilidade nas pesquisas.

Agradeço à Prof. Dra. Manuela Estima Gomes do Instituto 3Bs da Universidade do Minho, Portugal, pela oportunidade de supervisão em um laboratório referência mundial em biomateriais. E ao pesquisador Dr. Rui Domingues por todo o auxílio e orientação na condução da minha pesquisa.

Agradeço à Profa. Dra. Carla dos Santos Riccardi por disponibilizar a bioimpressora e por não medir esforços para me ajudar com o processo de aprendizado.

Agradeço aos queridos amigos Ana Carolina Soldi, Priscilla Fajardo, Guilherme Schiess, Danielle Barberini, Bruna Parapinski, por estarem sempre dispostos a ajudar, nesse período desafiador, profissionalmente ou não.

Agradeço aos novos e tão queridos amigos e companheiros de grupo de pesquisa e de trabalho, Vittoria Altheman, João Pedro Pfeifer, Gustavo Rosa, Emanuel Appolonio, André Kriek, Jaqueline Brandão e à grande amiga e apoiadora Rebeca Abibe, todos tornaram meu período de doutorado muito mais leve e possível de ser trilhado.

Agradeço também a todos os docentes, residentes, laboratórios e funcionários da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Campus de Botucatu.

Agradeço ao programa CAPES/PRINT por possibilitar a parceria com o Instituto 3Bs de Portugal, o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão do auxílio temático processo: 2017/12815-0.

“Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive”.

(Fernando Pessoa, 1946)

STIEVANI, F.C., Biotinta de matriz extracelular equina para bioengenharia tendínea. Botucatu, 2021, 78p, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

RESUMO

O processo de reparo tendíneo resulta em um tecido de função limitada, sendo assim, as estratégias terapêuticas visando a bioengenharia tendínea com o uso de células tronco, biomateriais funcionais e bioimpressão, vêm se ampliando. Baseado na hipótese de que o hidrogel de matriz extracelular tendínea (MEC), associado a células tronco mesenquimais de origem adiposa (adCTM) é aplicável à bioimpressão e capaz de manter a viabilidade celular *in vitro*, o presente trabalho objetivou produzir e caracterizar esse hidrogel, avaliar a utilização como biotinta e a biocompatibilidade quando em cultivo com adCTM equinas e quando implantado *in vivo*. E avaliar a capacidade de induzir a tenogênese nas adCTM quando em cultivo prolongado com e sem força tênsil. Tendões flexores digitais superficiais equinos foram submetidos ao processo de descelularização, liofilização e moagem. O pó de MEC foi solubilizado em solução de ácido clorídrico e pepsina. As soluções de 1% e 2% de MEC foram avaliadas quanto à capacidade de injeção, formação de gel após neutralização, reologia e também as características bioquímicas e microestruturais após a formação de gel. A bioimpressão foi realizada com 1×10^6 cels/mL por duas bioimpressoras distintas sendo uma pneumática e a outra por extrusão direta. A viabilidade celular foi avaliada após bioimpressão pneumática: 2 horas (M0), 12 horas (M1) e sete dias (M7). O cultivo após bioimpressão por extrusão direta permaneceu por 21 dias, neste foram avaliadas a expressão gênica dos marcadores de tenogênese e expressão e produção de matriz extracelular tendínea em duas formas distintas de cultivo, com as estruturas recebendo tensão (Gtensil) ou livres (Glivre). A estrutura bioimpressa foi implantada na região subfascial do músculo esplênio bilateral de um equino para avaliar biocompatibilidade. Na avaliação bioquímica observou-se predominância de proteínas colágenas e em sua maioria fibras maiores com poucas fibras intermediárias e pequenas. Na reologia os resultados foram compatíveis com bioimpressão, demonstrando diminuição da viscosidade com o aumento da força aplicada e a adição de transglutaminase antecipou a formação de gel da solução e aumentou a resistência ao hidrogel. A avaliação microestrutural demonstrou maior quantidade de fibrilas no hidrogel com 2% de MEC e rede homogênea quando transglutaminase foi adicionada. A bioimpressão foi satisfatória, com hidrogel de boa qualidade e resistente ao cultivo de 21 dias. A viabilidade celular diminuiu de M0 (87%) para M1 (76%) $P = 0,0066$ e assim se manteve durante os sete dias de cultivo após bioimpressão pneumática. Após bioimpressão por extrusão direta não houve diferença entre a viabilidade dos momentos avaliados. Houve aumento da expressão tenogênica das adCTM bem como dos marcadores de matriz extracelular, principalmente no Gtensil. A avaliação *in vivo* demonstrou infiltrado inflamatório mononuclear de leve a moderado, boa integração com o tecido e poucos sinais clínicos de inflamação. Pode-se concluir que a biotinta de matriz extracelular tendínea equina, quando utilizada com adCTM, foi capaz de promover a expressão de genes de tenogênese e produção de proteínas da matriz extracelular, além de apresentar boa biocompatibilidade, tornando-se potencial estratégia para o tratamento de lesões tendíneas.

Palavras-chave: Tenogênese, bioimpressão, células tronco, biomateriais

STIEVANI, F.C. Equine extracellular matrix bioink for tendon bioengineering. Botucatu, 2021, 78p, São Paulo State University “Júlio de Mesquita Filho”, School of Veterinary Medicine and Animal Science.

ABSTRACT

Due to a tissue with limited function results from tendon repair, therapeutic strategies targeting tendon engineering with stem cells and bioprinting of functional biomaterials are rising. Based on the hypothesis that extracellular matrix (ECM) hydrogel loaded with equine adipose tissue mesenchymal stem cells (adMSC) is suitable for bioprinting and preserve cell viability *in vitro*. This study aimed to produce and characterize this hydrogel and evaluate as bioink and its cytocompatibility when in culture with adMSC and when implanted *in vivo*. And to evaluate tenogenesis when in long-term free culture or with tensile strength with adCTM. Equine digital flexor tendons were decellularized, lyophilized and milled, The ECM powder was solubilized in hydrochloride acid and pepsin solution. One and two percent ECM solutions (1% e 2% ECM) were evaluated as injectability, jellified after neutralization, rheology and biochemical and microstructural properties after gel formation. The hydrogel was loaded with 1×10^6 cells/mL for bioprinting and two different prints were used, pneumatic and direct extrusion. The viability was evaluated two hours after printing (M0), 12 hours after printing (M1) and seven days after printing (M7) using pneumatic printing. Direct extrusion bioprinting lasted 21 days and tenogenesis and matrix genes expression and production were also evaluated using free constructs (Glivre) or with tensile strength (Gtensil). For *in vivo* biocompatibility evaluation the construct was implanted sub-fascial bilateral in splenic muscle of a horse. The biochemistry evaluation revealed majority collagen proteins with predominance of larger fibrils and with less thin and intermediate. The Rheology showed bioprinting suited characteristics with viscosity decreasing while applied force increased. The transglutaminase supplementation anticipated gel formation and increased hydrogel deformation resistance. 2% ECM showed higher fiber content and a homogeneous distribution after transglutaminase adding. The bioprinting was effective with good quality hydrogel and durable to 21 days culture. Cellular viability decreased from 87% in M0 to 76% in M1, $P = 0,0066$, and remained for seven days with pneumatic printing. And after direct extrusion viability remained unchanged during evaluated moments. Enhancement of tenogenesis expression and matrix production were significant higher in Gtensil. *In vivo* showed mild to moderate mononuclear infiltrate, good tissue integration and minor clinical inflammation sign. In conclusion this tendon ECM bioink loaded with adCTM induces tenogenesis, matrix protein production and presents good biocompatibility being suitable for future studies in tendon lesion treatments.

Key words: Tenogenesis; bioprinting; stem cells; biomaterials

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	11
1. Introdução	11
2. Justificativa	14
3. Hipótese	15
4. Objetivos	16
4.1 Objetivos específicos	16
5. Revisão de literatura	17
5.1 Interação entre a matriz extracelular e a célula tendínea	17
5.2 A tenogênese	19
5.3 Bioengenharia tendínea	21
5.4 Resposta inflamatória aos biomateriais	22
5.5 Processos de produção de hidrogéis de mec	23
5.6 Bioimpressão 3d para lesões ortopédicas	25
Referências	28
CAPÍTULO 2	33
Artigo científico: Hidrogel injetável de matriz extracelular tendínea equina como arcabouço natural para bioengenharia	33
CAPÍTULO 3	55
Artigo científico: Tenogênese após bioimpressão de matriz extracelular tendínea equina com células tronco mesenquimais de origem de tecido adiposo	55
CONSIDERAÇÕES FINAIS	79

Capítulo 1

1. INTRODUÇÃO

Os tendões são estruturas constituídas de tecido conjuntivo, com origem em músculos esqueléticos, responsáveis por transmitir o movimento da contração muscular a uma estrutura óssea levando à movimentação do corpo. Dentre as funções desempenhadas por diversos tendões, destaca-se na espécie equina o tendão flexor digital superficial (TFDS), que além da transmissão da força, é capaz de sustentar o peso, armazenar e modular a energia proveniente do músculo, tendo importante papel na biomecânica do movimento (THORPE; CLEGG; BIRCH, 2010). Funcionalmente o TFDS equino possui proporcional importância ao tendão de Aquiles no homem, e ambos estão relacionados constantemente a lesões de atletas. O TFDS é acometido por tendinites em 11 a 33% dos cavalos Puro sangue ingleses (PATTERSON-KANE; BECKER; RICH, 2012)

Os tendões são compostos por 60 a 85% de fibras colágenas, sendo 95% delas de colágeno tipo I. Estão em uma organização em feixes longitudinais e são o princípio da força tênsil tendínea (SCREEN et al., 2015). Como são estruturas mecanorresponsivas, cada tendão especificamente necessita do estímulo correto para manutenção da homeostase, produzir uma composição de matriz extracelular saudável e consequentemente exercer a sua função adequadamente. O estímulo mecânico mais importante é a tração oriunda da contração muscular. Acredita-se que essa tração possua importante papel em promover e manter o alinhamento e paralelismo das fibras colágenas (GONÇALVES; RODRIGUES; GOMES, 2017).

Estratégias de bioengenharia tendínea com o uso de células tronco em tendinites do FDS do equino já são realizadas de forma clínica com resultados promissores de preenchimento precoce da lesão com bom paralelismo de fibras (GUERCIO et al., 2015). No homem essa estratégia também já foi realizada de forma clínica, intratendínea, em tendinites de manguito rotador, proporcionando melhora na dor dos pacientes e na função da estrutura, evidenciada pela maior amplitude de movimento nos pacientes tratados (JO et al., 2018).

Embora o uso de células tronco para o tratamento de enfermidades tendíneas já seja realizado com resultados clínicos favoráveis, muitas perguntas ainda devem ser respondidas para assegurar o tratamento com essa terapia celular. Portanto, dois grandes

desafios permanecem na pesquisa da reparação tendínea funcional: desenvolver estratégias para induzir a diferenciação tenogênica de células tronco de origem não tendínea e conferir ao tecido neoformado a estrutura e organização tridimensional de um tendão hígido que, ao mesmo tempo, seja adequada ao perfeito desempenho da função específica desse tendão no organismo.

O uso de equinos para estudos translacionais na ortopedia já é bem descrito, porém apenas recentemente houve o apelo para a pesquisa do tecido tendíneo equino de forma translacional tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Hillmann et al. (2016) demonstraram forte semelhança entre as células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (adCTM) e de origem tendínea do homem e do equino, tanto na avaliação de marcadores de membrana, de cultivo, de migração e de expressão de fatores de matriz extracelular tendínea (HILLMANN et al., 2016). As pesquisas de engenharia tendínea *in vitro* já comprovaram a importância do estímulo mecânico na matriz extracelular para promover a tenogênese e conseqüentemente a produção de colágeno Tipo I e a organização entre eles. Por esse motivo a tenogênese *in vitro* ainda é um desafio.

A associação de uma fonte celular de fácil obtenção e com potencial de diferenciação tenogênica como as adCTM apresentam vantagens terapêuticas *in vivo* em relação às até o momento estudadas *in vitro* em que utilizam-se como fonte celular tenócitos encapsulados em arcabouços para bioengenharia tendínea (CARVALHO et al., 2011; ROMERO et al., 2017; TOPRAKHISAR et al., 2018). Os biomateriais compostos por matriz extracelular tendínea descelularizada já foram testados para reconstrução de tendões murinos com resultados com melhor deposição de matriz quando comparados ao fio protético inabsorvível (LIPAR et al., 2018).

A utilização adequada de um arcabouço é uma estratégia promissora para a bioengenharia, uma vez que o tipo de arcabouço influencia na sinalização parácrina das células em ambiente tridimensional, dessa forma auxiliando na diferenciação celular e também na produção de matriz extracelular e reparação tendínea. Embora os resultados sobre a interação do arcabouço com as células de origem mesenquimal ainda sejam preliminares, comprovou-se que co-cultivos de adCTM com explantes tendíneos apresentam diferenças comparados a cultivos puros de adCTM em monocamada, como o maior alongamento das células, característica desejável a um tecido tendíneo (COSTA-ALMEIDA et al., 2018).

Recentemente, a utilização da bioimpressão com o uso combinado de um material biocompatível a uma fonte celular apropriada para a bioengenharia tecidual vem

sendo explorada. Diversos materiais como fibrina, seda, colágeno e matrigel já foram adaptados para a técnica, buscando atingir as características que a biotinta deve apresentar. Além da capacidade de ser impressa e biocompatível, a biotinta idealmente deve possibilitar interação com a célula semelhante à matriz extracelular do tecido em questão (XU et al., 2006; PATI et al., 2014; DAS et al., 2015). Portanto, a aplicação da matriz extracelular tendínea de origem equina como biotinta apresenta potencial para utilização futura tanto de forma injetável em tendinites equinas quanto de maneira translacional para bioimpressão e reconstruções tendíneas no homem.

Os métodos de bioimpressão vêm sendo testados *in vitro* com o uso de células de acordo com o tecido alvo e toda a composição do biomaterial é pensada para atingir uma boa interação com o tecido que se deseja reparar. O próximo passo é a realização de estudos *in situ* buscando justamente avaliar a interação do biomaterial com a MEC do tecido onde será implantado e com células hospedeiras e assim pode ser comprovada a eficácia do biomaterial na produção de um tecido reparado funcional.

REFERÊNCIAS

- AAMODT, J. M.; GRAINGER, D. W. Extracellular matrix-based biomaterial scaffolds and the host response. **Biomaterials**, v. 86, p. 68–82, 2016.
- ABBADESSA, A. et al. A Synthetic Thermosensitive Hydrogel for Cartilage Bioprinting and Its Biofunctionalization with Polysaccharides. **Biomacromolecules**, v. 17, n. 6, p. 2137–2147, 2016.
- ADAIR, H. S.; GOBEL, D. O.; ROHRBACK, B. W. In vitro comparison of the locking loop and the three loop pulley suture techniques in the repair of equine flexor tendons. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 9, n. 4, p. 186–190, 1989.
- AHMAD, Z. et al. Effect of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide and N-hydroxysuccinimide concentrations on the mechanical and biological characteristics of cross-linked collagen fibres for tendon repair. **Regenerative Biomaterials**, v. 2, n. 2, p. 77–85, 2015.
- ANDARAWIS-PURI, N.; FLATOW, E. L. Promoting effective tendon healing and remodeling. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 36, n. 12, p. 3115–3124, 2018.
- BADYLAK, S. F. et al. Esophageal reconstruction with ECM and muscle tissue in a dog model. **Journal of Surgical Research**, v. 128, n. 1, p. 87–97, 2005.
- BERTONE, A. L. Tendon lacerations. **The Veterinary clinics of North America. Equine practice**, v. 11, n. 2, p. 293–314, 1995. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0749-0739\(17\)30323-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0749-0739(17)30323-1)>.
- BI, Y. et al. Identification of tendon stem/progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche. **Nature Medicine**, v. 13, n. 10, p. 1219–1227, 2007.
- BIRK, D. E. et al. Collagen fibrillogenesis in vitro: Interaction of types I and V collagen regulates fibril diameter. **Journal of Cell Science**, v. 95, n. 4, p. 649–657, 1990.
- BOULARAOUI, S. et al. An overview of extrusion-based bioprinting with a focus on induced shear stress and its effect on cell viability. **Bioprinting**, v. 20, n. May, 2020.
- BURK, J. et al. Freeze-Thaw Cycles Enhance Decellularization of Large Tendons. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 20, n. 4, p. 276–284, 2014.
- CARVALHO, A. D. M. et al. Use of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells for Experimental Tendinitis Therapy in Equines. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 31, p. 26–34, 2011.
- CHEN, C. et al. Book-Shaped Acellular Fibrocartilage Scaffold with Cell-loading Capability and Chondrogenic Inducibility for Tissue-Engineered Fibrocartilage and Bone-Tendon Healing. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 11, n. 3, p. 2891–2907, 2019.
- COMPAAN, A. M.; SONG, K.; HUANG, Y. Gellan Fluid Gel as a Versatile Support Bath Material for Fluid Extrusion Bioprinting. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 11, p. 5714–5726, 2019.
- CORSI, A. et al. Phenotypic effects of biglycan deficiency are linked to collagen fibril abnormalities, are synergized by decorin deficiency, and mimic Ehlers-Danlos-like changes in bone and other connective tissues. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 17, n. 7, p. 1180–1189, 2002.
- COSTA-ALMEIDA, R. et al. Tendon explant cultures to study the communication between adipose stem cells and native tendon niche. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 119, n. 4, p. 3653–3662, 2018.
- DAHLGREN, L. A.; MOHAMMED, H. O.; NIXON, A. J. Temporal expression of growth factors and matrix molecules in healing tendon lesions. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 23, n. 1, p. 84–92, 2005a.
- DAHLGREN, L. A.; MOHAMMED, H. O.; NIXON, A. J. Temporal expression of

- growth factors and matrix molecules in healing tendon lesions. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 23, n. 1, p. 84–92, 2005b.
- DAS, S. et al. Bioprintable, cell-laden silk fibroin-gelatin hydrogel supporting multilineage differentiation of stem cells for fabrication of three-dimensional tissue constructs. **Acta Biomaterialia**, v. 11, n. 1, p. 233–246, 2015.
- DE WILD, M.; POMP, W.; KOENDERINK, G. H. Thermal memory in self-assembled collagen fibril networks. **Biophysical Journal**, v. 105, n. 1, p. 200–210, 2013.
- DIAMANTIDES, N. et al. Correlating rheological properties and printability of collagen bioinks: The effects of riboflavin photocrosslinking and pH. **Biofabrication**, v. 9, n. 3, 2017.
- DUANCE, V. C. et al. The location of three collagen types in skeletal muscle. **FEBS Letters**, v. 79, n. 2, p. 248–252, 1977.
- EL-SHAFAEY, E. S. A.; KARROUF, G. I.; ZAGHLOUL, A. E. Clinical and biomechanical evaluation of three bioscaffold augmentation devices used for superficial digital flexor tenorrhaphy in donkeys (*Equus asinus*): An experimental study. **Journal of Advanced Research**, v. 4, n. 1, p. 103–113, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jare.2012.02.001>>.
- ELIASSON, P. et al. Ruptured human Achilles tendon has elevated metabolic activity up to 1 year after repair. **European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, v. 43, n. 10, p. 1868–1877, 2016.
- FARNEBO, S. et al. Design and Characterization of an Injectable Tendon Hydrogel: A Novel Scaffold for Guided Tissue Regeneration in the Musculoskeletal System. **Tissue Engineering Part A**, v. 20, n. 9–10, p. 1550–1561, 2014.
- FREEDMAN, B. R. et al. Dynamic loading and tendon healing affect multiscale tendon properties and ECM stress transmission. **Scientific Reports**, v. 8, n. 10854, p. 1–13, 2018.
- FREYTES, D. O. et al. Preparation and rheological characterization of a gel form of the porcine urinary bladder matrix. **Biomaterials**, v. 29, n. 11, p. 1630–1637, 2008.
- GAETANI, R. et al. Evaluation of different decellularization protocols on the generation of pancreas-derived hydrogels. **Tissue Engineering - Part C: Methods**, v. 24, n. 12, 2018. Disponível em: <[doi: 10.1089/ten.TEC.2018.0180](https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2018.0180)>.
- GOLDFRACHT, I. et al. Engineered heart tissue models from hiPSC-derived cardiomyocytes and cardiac ECM for disease modeling and drug testing applications. **Acta Biomaterialia**, v. 92, p. 145–159, 2019.
- GONÇALVES, A. I.; RODRIGUES, M. T.; GOMES, M. E. Tissue-engineered magnetic cell sheet patches for advanced strategies in tendon regeneration. **Acta Biomaterialia**, v. 63, p. 110–122, 2017.
- GRIER, W. K.; IYOKA, E. M.; HARLEY, B. A. C. The influence of pore size and stiffness on tenocyte bioactivity and transcriptomic stability in collagen-GAG scaffolds. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 65, p. 295–305, 2017.
- GUERCIO, A. et al. Mesenchymal Stem Cells Derived From Subcutaneous Fat and Platelet-Rich Plasma Used in Athletic Horses With Lameness of the Superficial Digital Flexor Tendon. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 35, n. 1, p. 19–26, 2015.
- HAKIMI, N. et al. Handheld Skin Printer: In-Situ Formation of Planar Biomaterials and Tissues. v. 18, n. 10, p. 1440–1451, 2018.
- HILLMANN, A. et al. Comparative Characterization of Human and Equine Mesenchymal Stromal Cells: A Basis for Translational Studies in the Equine Model. **Cell Transplantation**, v. 25, n. 1, p. 109–124, 2016.
- JANN, H. W. Current concepts and techniques in the management of tendon

- lacerations. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v. 3, n. 2 SPEC. ISS., p. 215–224, 2004.
- JO, C. H. et al. Intratendinous Injection of Autologous Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Rotator Cuff Disease : A First-In-human trial. **Stem Cells**, v. 36, p. 1441–1450, 2018.
- KERIQUEL, V. et al. In situ printing of mesenchymal stromal cells, by laser-assisted bioprinting, for in vivo bone regeneration applications. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2017.
- KUNDU, J. et al. An additive manufacturing-based PCL–alginate– chondrocyte bioprinted scaffold for cartilage tissue engineering. **JOURNAL OF TISSUE ENGINEERING AND REGENERATIVE MEDICINE**, v. 12, n. 3, p. 181–204, 2013.
- LI, J. et al. Recent advances in bioprinting techniques: Approaches, applications and future prospects. **Journal of Translational Medicine**, v. 14, n. 1, p. 1–15, 2016.
- LIPAR, M. et al. Extracellular matrix supports healing of transected rabbit achilles tendon. **Helyiyon**, v. 4, p. 1–13, 2018.
- LIU, C. et al. Matrix stiffness regulates the differentiation of tendon-derived stem cells through FAK-ERK1 / 2 activation. **Experimental Cell Research**, v. 373, n. August, p. 62–70, 2018.
- LONG, C. et al. Tendon Tissue Engineering: Mechanism and Effects of Human Tenocyte Coculture With Adipose-Derived Stem Cells. **Journal of Hand Surgery**, v. 43, n. 2, p. 183.e1-183.e9, 2018.
- MARIANI, E. et al. Biomaterials: Foreign bodies or tuners for the immune response? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 636, p. 1–42, 2019. Disponível em: <doi:10.3390/ijms20030636>.
- MCNEILLY, C. M. et al. Tendon cells in vivo form a three dimensional network of cell processes linked by gap junctions. **Journal of Anatomy**, v. 190, n. 3, p. 477–478, 1997.
- MCNULTY, A. L. et al. Meniscus-derived matrix bioscaffolds: Effects of concentration and cross-linking on meniscus cellular responses and tissue repair. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 1, p. 1–16, 2020.
- MEHRBAN, N. et al. Host macrophage response to injectable hydrogels derived from ECM and α -helical peptides. **Acta Biomaterialia**, v. 111, p. 141–152, 2020.
- MEYER, S. R. et al. Comparison of aortic valve allograft decellularization techniques in the rat. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 79, n. 4, p. 963–73, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16948146>>.
- MINER, J. H.; YURCHENCO, P. D. Laminin functions in tissue morphogenesis. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 20, n. M, p. 255–284, 2004.
- NING, L. J. et al. Preparation and characterization of decellularized tendon slices for tendon tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 100 A, n. 6, p. 1448–1456, 2012.
- PATEL, D. et al. Effects of cell adhesion motif, fiber stiffness, and cyclic strain on tenocyte gene expression in a tendon mimetic fiber composite hydrogel. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 499, n. 3, p. 642–647, 2018.
- PATI, F. et al. Printing three-dimensional tissue analogues with decellularized extracellular matrix bioink. **Nature Communications**, v. 5, 2014.
- PATTERSON-KANE, J. C.; BECKER, D. L.; RICH, T. The Pathogenesis of Tendon Microdamage in Athletes: The Horse as a Natural Model for Basic Cellular Research. **Journal of Comparative Pathology**, v. 147, n. 2–3, p. 227–247, 2012.
- PAXTON, N. et al. Proposal to assess printability of bioinks for extrusion-based bioprinting and evaluation of rheological properties governing bioprintability.

- Biofabrication**, v. 9, n. 4, p. 44107, 2017. Disponível em:
<<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L622913577%0Ahttp://dx.doi.org/10.1088/1758-5090/aa8dd8>>.
- PESSOA, F. **Odes de Ricardo Reis**. Lisboa: Ática. 1946 (imp.1994). P. 148.
- RALPHS, J. R.; WAGGETT, A. D.; BENJAMIN, M. Actin stress fibres and cell-cell adhesion molecules in tendons: Organisation in vivo and response to mechanical loading of tendon cells in vitro. **Matrix Biology**, v. 21, n. 1, p. 67–74, 2002.
- RILEY, G. P. et al. Glycosaminoglycans of human rotator cuff tendons: Changes with age and in chronic rotator cuff tendinitis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 53, n. 6, p. 367–376, 1994.
- ROMERO, A. et al. Comparison of autologous bone marrow and adipose tissue derived mesenchymal stem cells, and platelet rich plasma, for treating surgically induced lesions of the equine superficial digital flexor tendon. **Veterinary Journal**, v. 224, p. 76–84, 2017.
- SCREEN, H. R. . et al. Tendon Functional Extracellular Matrix. **Physiology & behavior**, v. 33, n. 6, p. 793–799, 2015.
- SHEIKH, Z. et al. Macrophages, foreign body giant cells and their response to implantable biomaterials. **Materials**, v. 8, n. 9, p. 5671–5701, 2015.
- SHEPHERD, D. V. et al. The process of EDC-NHS cross-linking of reconstituted collagen fibres increases collagen fibrillar order and alignment. **APL Materials**, v. 3, n. 1, p. 1–13, 2015.
- SINGER, E. R. et al. Injuries in the event horse: Training versus competition. **Veterinary Journal**, v. 175, n. 1, p. 76–81, 2008.
- SUBRAMANIAN, A. et al. Mechanical force regulates tendon extracellular matrix organization and tenocyte morphogenesis through TGFbeta signaling. **eLife**, v. 7, p. 1–24, 2018.
- TEIXEIRA, L. S. M. et al. Enzyme-catalyzed crosslinkable hydrogels: Emerging strategies for tissue engineering. **Biomaterials**, v. 33, n. 5, p. 1281–1290, 2012.
- THORPE, C. T.; CLEGG, P. D.; BIRCH, H. L. A review of tendon injury: why is the equine superficial digital flexor tendon most at risk? **Equine veterinary journal**, v. 42, n. 2, p. 174–80, mar. 2010. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20156256>>. Acesso em: 21 jul. 2011.
- TOPRAKHISAR, B. et al. Development of Bioink from Decellularized Tendon Extracellular Matrix for 3D Bioprinting. **Macromolecular Bioscience**, v. 18, n. 10, p. 1–12, 2018.
- WŁODARCZYK-BIEGUN, M. K.; DEL CAMPO, A. 3D bioprinting of structural proteins. **Biomaterials**, v. 134, p. 180–201, 2017.
- WUNDERLI, S. L. et al. Tendon response to matrix unloading is determined by the patho-physiological niche. **Matrix Biology**, v. 1610, n. xxxx, 2019.
- XU, T. et al. Viability and electrophysiology of neural cell structures generated by the inkjet printing method. **Biomaterials**, v. 27, n. 19, p. 3580–3588, 2006.
- YANG, G. et al. Enzymatically crosslinked gelatin hydrogel promotes the proliferation of adipose tissue-derived stromal cells. **PeerJ**, v. 2016, n. 9, p. 1–22, 2016.
- YIN, Z. et al. The effect of decellularized matrices on human tendon stem/progenitor cell differentiation and tendon repair. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 12, p. 9317–9329, 2013.
- ZHANG, J.; LI, B.; WANG, J. H. C. The role of engineered tendon matrix in the stemness of tendon stem cells in vitro and the promotion of tendon-like tissue formation in vivo. v. 32, n. 29, p. 6972–6981, 2011.
- ZHANG, Z. et al. Evaluation of bioink printability for bioprinting applications. **Applied**

Physics Reviews, v. 5, n. 4, 2018.

ZHAO, L. et al. A novel smart injectable hydrogel prepared by microbial transglutaminase and human-like collagen: Its characterization and biocompatibility.

Materials Science and Engineering C, v. 68, p. 317–326, 2016.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ressalta-se a importância do desenvolvimento, caracterização e avaliação biocompatibilidade *in vitro* de um material anteriormente à sua aplicação *in vivo*. O biomaterial produzido, caracterizado e adicionado às células tronco apresenta potencial aplicação clínica após bioimpressão e deverá ser testado em lesões tendíneas controladas para avaliação do comportamento no tecido alvo. Adicionalmente, por se tratar de um hidrogel de MEC o biomaterial apresenta futuro promissor não só para o uso em reparação tendínea, mas também, para bioengenharia e bioimpressão de outros tecidos musculoesqueléticos.