

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 10/12/2023.

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

**ESTUDO COMPARATIVO DA CAPACIDADE DE
DIFERENCIAÇÃO TENOGÊNICA DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS DE DIFERENTES FONTES TECIDUAIS EM
CULTIVO 3D**

EMANUEL VITOR PEREIRA APOLONIO

Botucatu, São Paulo

2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA VETERINÁRIA E REPRODUÇÃO
ANIMAL

**ESTUDO COMPARATIVO DA CAPACIDADE DE
DIFERENCIAÇÃO TENOGÊNICA DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS DE DIFERENTES FONTES TECIDUAIS EM
CULTIVO 3D**

EMANUEL VITOR PEREIRA APOLONIO

Dissertação apresentada junto ao Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia Animal para
obtenção de Título de Mestre.

Orientadora: Prof.^a Dra. Ana Liz Garcia Alves

Botucatu, São Paulo

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

Apolonio, Emanuel Vitor Pereira.

Capacidade de diferenciação tenogênica de
células-tronco mesenquimais de diferentes fontes teciduais
/ Emanuel Vitor Pereira Apolonio. - Botucatu, 2021

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

Orientador: Ana Liz Garcia Alves

Capes: 50501003

1. Células-tronco. 2. Engenharia tecidual. 3. Materiais
biomédicos. 4. Medicina regenerativa. 5. Tendões.

Palavras-chave: Biomaterial; Cultivo tridimensional;
Engenharia tecidual; Medicina regenerativa; Tendão.

Autor: Emanuel Vitor Pereira Apolonio

Data: 10 de dezembro de 2021

Comissão Examinadora

Prof.^a Dra. Ana Liz Garcia Alves

Presidente da mesa e orientadora

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal

FMVZ, UNESP – Botucatu, SP

Prof. Dr. Carlos Eduardo Fonseca Alves

Membro

Professor Assistente Universidade Paulista – UNIP

UNIP – Bauru, SP

Prof. Dr. Armando de Mattos Carvalho

Membro

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária

Escola de Veterinária UFMG – Belo Horizonte, MG

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço aos meus familiares por todo suporte para realização do mestrado e apoio sobre todas as minhas decisões. Agradeço a professora Ana Liz Garcia Alves pelo aceite como orientado e pelo compartilhamento de conhecimentos. Aos meus amigos e colegas por proporcionar essa trajetória.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
Capítulo 1	13
1.1 Introdução	13
1.2 Objetivo	16
1.2.1 Objetivos Específicos	16
1.3 Hipótese	17
1.4 Revisão Bibliográfica	17
1.4.1 Lesões tendíneas	17
1.4.2 Células-tronco mesenquimais no tratamento de tendinite	20
1.4.3 Cultivo tridimensional e hidrogel	22
1.4.4 Células-tronco mesenquimais derivadas de tendão	23
1.4.5 Diferenciação tenogênica	25
1.5 Referências	27
Capítulo 2	34
2.1 Artigo Científico	34

RELAÇÃO DE TABELAS – CAPÍTULO 2

TABELA 1. Sequências de primers utilizados para expressão gênica como alvos e controle interno para normalização e a condição dos ciclos (45) da reação de RT-qPCR.....48

TABELA 2. Resultados em porcentagem da imunofenotipagem das CTMad, CTMmo, CTMtd ISO e CTMtd EXPL obtidas por citometria de fluxo.....54

TABELA 3. Valores de proliferação celular após 24, 48 e 72 horas de cultivo das CTMad, CTMmo, CTMtd ISO e CTMtd EXPL (dados apresentados em média +- desvio padrão)55

TABELA 4. Valores em horas de TDPC das CTMad, CTMmo, CTMtd ISO e CTMtd EXPL (dados apresentados em média +- desvio padrão)55

LISTA DE FIGURAS – CAPÍTULO 1

FIGURA 1. Estrutura hierárquica tendínea17

LISTA DE FIGURAS – CAPÍTULO 2

FIGURA 1. Fluxograma da metodologia de processamento e obtenção das diferentes fontes de CTM.42

FIGURA 2. Representação do processo de isolamento do endotendão (área pontilhada)43

FIGURA 3. Confeção do modo de cultivo tridimensional (A) Aspecto macroscópico do hidrogel de MEC tendínea equina (HgMECTdEq). (B) Pellet de HgMECTdEq após 7 dias de cultivo (C) Interação 3D CTM (setas) e HgMECTdEq, objetiva de 10x47

FIGURA 4. Morfologia das diferentes origens celulares em cultivo 2D. CTMad (A,E), CTMmo (B,F), CTMtd ISO (C,G) e CTMtd EXPL (D,H). Objetiva de 5x (A,B,C,D) e Objetiva de 10x (E,F,G,H). Barras de 100 µm50

FIGURA 5. População celular no cultivo CTMtd EXPL com morfologia não-fibroblastoide.....50

FIGURA 6. Avaliação da diferenciação osteogênica e adipogênica. CTMad (A,B,C), CTMmo (D,E,F), CTMtd ISO (G,H,I) e CTMtd EXPL (J,K,L). Controle (A,D,G,J) objetiva de 5x, osteogênico coloração de Alizarin Red (B,E,H,K) objetiva de 5x e adipogênico coloração Oil Red O (C,F,I,L) objetiva de 10x e 20x52

FIGURA 7. Avaliação da diferenciação condrogênica. CTMad (A,B,C), CTMmo (D,E,F) CTMtd ISO (G,H,I), CTMtd EXPL (J,K,L). Controle (A,D,G,J) objetiva de 5x, condrogênica coloração de Azul de Toluidina (B,E,H,K) objetiva de 5x e condrogênica coloração H&E (C,F,I,L) objetiva de 5x.....53

FIGURA 8. Ilustração das curvas de proliferação das CTMad, CTMmo, CTMtd ISO e EXPL nas concentrações de 10.000, 30.000 e 100.000, avaliadas em 24, 48 e 72 horas de cultivo. B, gráfico da concentração 10.000 de CTM de cada origem ao final de 72horas de cultivo. C, gráfico da concentração 30.000 de CTM de cada origem ao final de 72horas de cultivo. D, gráfico da concentração 100.000 de CTM de cada origem ao final de 72horas de cultivo. Valores de P: $P \leq 0,05^*$, $P \leq 0,01^{**}$, $P \leq 0,001^{***}$ e $P \leq 0,0001^{****}$56

FIGURA 9. Ilustração dos valores médios de TDPC em horas das CTMad, CTMmo, CTMtd ISO e CTMtd EXPL57

FIGURA 10. Avaliação da diferenciação tenogênica. CTMad (A,B), CTMmo (C,D), CTMtd ISO (E,F), CTMtd EXPL (G,H). Controle (A,C,E,G) objetiva de 5x, tenogênico (B,D,F,H) objetiva de 5x. Coloração *Picro Sirius Red*58

FIGURA 11. Avaliação da interação 3D. CTMad (A,B), CTMmo (C,D), CTMtd ISO (E,F), CTMtdEXPL (G,H). Controle (A,C,E,G) objetiva de 5x, tenogênico (B,D,F,H) objetiva de 5x. Coloração *Picro Sirius Red*.....59

FIGURA 12. Ensaio de zimografia e concentração de MMP-2 e MMP-9. A, coluna representa o cultivo em membrana de COL1:COL3 em meio padrão (CNTRL) e meio tenogênico (TRAT) de cada origem de CTM. B, coluna representa o cultivo 3D em HgMECTdEq em meio padrão (CNTRL) e meio tenogênico (TRAT) de cada origem de CTM. C, concentração de MMP-9 e MMP-2 em gel de policarilamida contendo gelatina. As significancias foram consideradas valores de P: $P \leq 0,05^*$, $P \leq 0,01^{**}$, $P \leq 0,001^{***}$ e $P \leq 0,0001^{****}$ 61

FIGURA 13. Avaliação da expressão gênica de fatores tenogênicos em cultivo 3D em HgMECTdEq. A, cultivo 3D de CTMad com meio padrão (Ad 3D CNTRL) e cultivo 3D de CTMad em meio tenogênico (Ad 3D TRAT). B, cultivo 3D de CTMmo com meio padrão (MO 3D CNTRL) e cultivo 3D de CTMmo em meio tenogênico (MO 3D TRAT). C, cultivo 3D de CTMtdISO com meio padrão (TdISO 3D CNTRL) e

cultivo 3D de CTMtd em meio tenogênico (TdISO 3D TRAT). D, cultivo 3D de CTMtd EXPL com meio padrão (TdEXPL 3D CNTRL) e cultivo 3D de CTMtd EXPL em meio tenogênico (TdEXPL 3D TRAT). Valores de P: $P \leq 0,05^*$, $P \leq 0,01^{**}$, $P \leq 0,001^{***}$ e $P \leq 0,0001^{****}$ 64

FIGURA 14. Avaliação da expressão gênica de fatores tenogênicos de CTM cultivadas em membrana de COL1 e COL3. **A**, cultivo 2D em membrana COL1:COL3 de CTMad com meio padrão (Ad CNTRL) e cultivo 2D em membrana COL1:COL3 de CTMad em meio tenogênico (Ad TRAT). **B**, cultivo 2D em membrana COL1:COL3 de CTMmo com meio padrão (MO CNTRL) e cultivo 2D em membrana COL1:COL3 de CTMmo em meio tenogênico (MO TRAT). **C**, cultivo 2D em membrana COL1:COL3 de CTMtdISO com meio padrão (TdISO CNTRL) e cultivo 2D em membrana COL1:COL3 de CTMtd em meio tenogênico (TdISO TRAT). **D**, cultivo 2D em membrana COL1:COL3 de CTMtd EXPL com meio padrão (TdEXPL CNTRL) e cultivo 2D em membrana COL1:COL3 de CTMtd EXPL em meio tenogênico (TdEXPL TRAT). Valores de P: $P \leq 0,05^*$, $P \leq 0,01^{**}$, $P \leq 0,001^{***}$ e $P \leq 0,0001^{****}$ 66

FIGURA 15. Avaliação da expressão gênica de fatores tenogênicos dos grupos tratados com meio tenogênicos cultivados em 3D em HgMECTdEq. Valores de P: $P \leq 0,05^*$, $P \leq 0,01^{**}$, $P \leq 0,001^{***}$ e $P \leq 0,0001^{****}$ 67

FIGURA 16. Avaliação da expressão gênica de fatores tenogênicos dos grupos tratados com meio tenogênicos cultivados em 2D em membrana de COL1:COL3. Valores de P: $P \leq 0,05^*$, $P \leq 0,01^{**}$, $P \leq 0,001^{***}$ e $P \leq 0,0001^{****}$ 68

ABREVIATURAS

MEC: Matriz extracelular

TFDS: Tendão flexor digital superficial

CTM: Células-tronco mesenquimais

CTMad: Células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo

CTMmo: Células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea

CTMtd: Células-tronco mesenquimais derivadas do tendão

CTMtd ISO: Células-tronco do tendão obtidas por isolamento

CTMtd EXPL: Células-tronco do tendão obtidas por explante

CTMms: Células-tronco mesenquimais derivadas do membrana sinovial

HgMECTdEq: Hidrogel de matriz extracelular de tendão equino

3D: Tridimensional

2D: Bidimensional

BMP-12: Proteína Óssea Morfogenética-12

AA: Ácido ascórbico

ITS: Insulina, transferrina humana e ácido selenoso

TGF- β : Fator de crescimento transformação beta

FGF-2: Fator de crescimento fibroblástico 2

IGF-1: Fator de crescimento derivado de insulina

GDF-7: Fator de crescimento e diferenciação 7

MHC-II: Complexo principal de histocompatibilidade 2

qRT-PCR: Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

SCX: Scleraxis

MHK: Mohawk

DCN: Decorin

BGN: Biglicana

TN C: Tenascina C

COL1A1: Colágeno do tipo I

COL1A3: Colágeno do tipo III

RUNX2: Fator de transcrição relacionado ao runt 2

TDPC: Tempo de Duplicação da População Celular

DMEM: Meio Eagle Dulbecco Modificado

SFB: Soro Fetal Bovino

APOLONIO, E. V. P. Estudo comparativo da capacidade de diferenciação tenogênica de células-tronco mesenquimais de diferentes fontes teciduais em cultivo 3D. Botucatu, 2021, 81p. Dissertação - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, FMVZ - Campus de Botucatu.

RESUMO

As lesões tendíneas são causas importantes de claudicação e afastamento do esporte em equinos e no homem. A incidência de lesões é variada de acordo com a modalidade e intensidade atlética, compreendendo cerca de 30% das lesões musculoesqueléticas de ambas as espécies. Os tratamentos convencionais são pouco eficazes em reparar com qualidade a matriz extracelular (MEC), o que determina o elevado índice de recidivas. As células-tronco mesenquimais (CTM) ganharam destaque no tratamento das tendinopatias e demonstram resultados favoráveis nas características histológicas e mecânicas teciduais, bem como redução do tempo de reparação tendínea. Estas características terapêuticas das CTM são atribuídas à sua habilidade de imunomodulação, característica anti-inflamatória, promotora da reorganização tecidual e capacidade de diferenciação em linhagens mesodermiais. Já é conhecida a possibilidade de diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica *in vitro* das CTM, no entanto a diferenciação tenogênica ainda não possui uma metodologia padronizada e eficaz. A modalidade de cultivo tridimensional (3D) de CTM em materiais sintéticos ou biológicos é capaz de estimular a diferenciação celular de acordo com a composição do arcabouço, além de oferecer proteção e potencializar o desempenho terapêutico. **Objetivo:** Determinar qual melhor fonte de CTM equinas dentre: tecido adiposo (CTMad); medula óssea (CTMmo); e tendão obtidos por isolamento (CTMtd ISO) ou explante (CTMtd EXPL), que possui a melhor capacidade de proliferação *in vitro*, diferenciação tenogênica em cultura 3D em hidrogel de MEC tendínea equina (HgMECTdEq) e cultivo 2D em membrana Transwell® revestida de colágeno I e III (1:1). Objetivamos também avaliar a eficácia de uma nova metodologia de diferenciação tenogênica. **Métodos:** As quatro diferentes fontes de CTM foram obtidas de um mesmo equino com 10 meses de idade. As amostras foram processadas e as CTM, isoladas e cultivadas. As células foram caracterizadas através de sua morfologia fibroblastóide, aderência ao plástico, expansão clonal, expressão de receptores de superfície CD13⁻, CD34⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD90⁺, CD105⁺, CD106⁻, MHC-II⁻ e diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica. A capacidade de proliferação *in vitro* de cada origem foi avaliada pelos testes de Taxa de Proliferação Celular (TPC) e Tempo de Cuplicação da População Celular (TDPC), cultivadas por 72 horas em três diferentes concentrações iniciais (1×10^4 , 3×10^4 e 1×10^5). Foi avaliada a habilidade de diferenciação tenogênica de cada origem celular através da produção de colágeno pela coloração de Picosirius Red quando cultivadas em membrana *Transwell*® revestida com COL1:COL3 e meio de diferenciação tenogênica (50 ng/ml de Proteína Óssea Morfogênica-12 (BMP-12), 50 µg/ml de Ácido Ascórbico e 5 µg/ml de ITS). O HgMECTdEq foi produzido de acordo com protocolo desenvolvido pelo Laboratório de Terapias Regenerativas da FMVZ Unesp, Botucatu-SP. Posteriormente 2×10^5 CTM de cada origem foram adicionadas em cultivo 3D imersas em 0,5 mL de hidrogel e cultivadas por 7 dias em meio de cultivo padrão e de diferenciação tenogênica. Foi determinada a concentração de metaloproteinases de matriz 2 e 9 (MMP-2 e MMP-9) pelo ensaio de zimografia e em análise quantitativa por PCR a expressão gênica dos marcadores de tenogênese Scleraxis, Mohawk, Biglicana, Decorin, Tenascina C, Colágeno I e Colágeno III, além do fator osteogênico RunX2 do cultivo 3D em HgMECTdEq e em cultivo 2D em membrana COL1:COL3, com meio padrão e de diferenciação tenogênica. **Resultados:** Todas as células apresentaram características similares quanto à morfologia fibroblastóide, aderência ao plástico e expansão clonal. Houve baixa expressão dos receptores de superfície CD105 para CTMtd ISO e

CD44 para as CTMad e positiva expressão de MHC-II para as CTMtd EXPL. Superior habilidade de proliferação *in vitro* foi identificada para a CTMad e inferior capacidade de diferenciação adipogênica e condrogênica foi observada para as CTMtd EXPL. A nova metodologia de diferenciação tenogênica foi capaz de produzir a diferenciação tenogênica das quatro origens de CTM, com inferior produção de colágeno para as CTMmo. O meio de diferenciação tenogênico foi capaz de aumentar a concentração de MMP-2 e MMP-9 e também aumentar a expressão dos marcadores tenogênicos Sclerax, Mohawk, Biglicana, Decorin, COL1, COL3, Tenascina C e o fator esteogênico Runx2. **Conclusão:** A nova metodologia de diferenciação tenogênica proposta pelo estudo foi eficaz em induzir a tenogênese de todas as fontes de CTM avaliadas. De acordo com nossos resultados a melhor fonte em capacidade de proliferação, diferenciação tenogênica *in vitro* e seguridade para aplicações clínicas são as CTMad. As CTMtd ISO e EXPL, apesar de sua evidente capacidade de tenogênese, apresentam população heterogênia em cultivo e resultados de caracterização que desencorajam sua aplicação clínica, especialmente de forma alogênica.

Palavras-chave: Biomaterial; Engenharia tecidual; Medicina regenerativa; Tendão; Cultivo tridimensional

APOLONIO, E. V. P. Comparative study of the tenogenic differentiation capacity of mesenchymal stem cells from different tissue sources in 3D culture. Botucatu, 2021, 81p. Dissertation - São Paulo State University Júlio de Mesquita Filho, FMVZ - Campus de Botucatu.

ABSTRACT

Tendon injuries are important causes of lameness and withdrawal from sport in horses and men. The incidence of injuries varies according to the sport and athletic intensity, comprising about 30% of musculoskeletal injuries of both species. Conventional treatments are ineffective in repairing the extracellular matrix (ECM) with quality, which contributes to the high rate of recurrence. Mesenchymal stem cells (MSC) gained prominence in the treatment of tendinopathies and showed favorable results in the histological and mechanical tissue characteristics, as well as a reduction in the tendon repair time. These therapeutic characteristics of MSCs are attributed to their ability to immunomodulate, anti-inflammatory, promote tissue reorganization and differentiate into mesodermal lineages. The possibility of osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation in vitro of MSCs is already known, however tenogenic differentiation still does not have a standardized and effective methodology. The modality of three-dimensional (3D) culture of MSC in synthetic or biological materials is capable of stimulating cell differentiation according to the composition of the framework, in addition to offering protection and enhancing therapeutic performance. **Objective:** To determine the best source of equine MSCs among adipose tissue (MSCad), bone marrow (MSCmo) and tendon obtained by isolation (MSCtd ISO) or tendon explant (MSCtd EXPL), for in vitro proliferation and tenogenic differentiation under two different conditions: 3D hydrogel cultivation of equine tendon ECM (HgMECTdEq); and 2D cultivation on a type I and III collagen-coated membrane. We also aim to evaluate the effectiveness of a new formulation of a means inducing tenogenic differentiation. **Methods:** The four different sources of MSC were obtained from the same 10-month-old horse. Samples were processed and MSCs isolated and cultivated. The cells were characterized by their fibroblastoid morphology, plastic adherence, clonal expansion, expression of CD13-, CD34-, CD44+, CD45-, CD90+, CD105+, CD106-, MHC-II- surface receptors and osteogenic, adipogenic and differentiation. chondrogenic. The in vitro proliferation capacity of each source was evaluated by the Cell Proliferation Rate (CPT) and Population Doubling Time (PDT) tests, grown for 72 hours at three different initial concentrations (1×10^4 , 3×10^4 and 1×10^5). The tenogenic differentiation ability of each cell origin was evaluated through the production of collagen by Picrosirius Red staining when cultivated on a Transwell® membrane coated with COL1:COL3 and tenogenic differentiation medium (50 ng/ml of Morphogenetic Bone Protein-12 (BMP) -12), 50 µg/ml Ascorbic Acid and 5 µg/ml ITS). The HgMECTdEq was produced according to a protocol developed by the Laboratory of Regenerative Therapies at FMVZ Unesp, Botucatu-SP. Afterwards, 2×10^5 CTM of each origin were added in 3D culture immersed in 0.5 mL of hydrogel and cultivated for 7 days in standard culture medium and tenogenic differentiation. The concentration of matrix metalloproteinases 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9) was determined by zymography assay and in quantitative analysis by PCR the gene expression of tenogenesis markers Scleraxis, Mohawk, Biglycan, Decorin, Tenascin C, Collagen I and Collagen III, in addition to the osteogenic factor RunX2 from 3D culture in HgMECTdEq and in 2D culture in COL1:COL3 membrane, with standard culture medium and tenogenic differentiation. **Results:** All cells showed similar characteristics regarding fibroblastoid morphology, plastic adherence and clonal expansion. There was low expression of surface receptors CD105 for CTMtd ISO and CD44 for CTMtd and positive expression of MHC-II for CTMtd EXPL. Superior in vitro

proliferation ability was identified for MSCad and inferior capacity for adipogenic and chondrogenic differentiation was observed for MSCtd EXPL. The new tenogenic differentiation methodology demonstrated efficacy in the four MSC origins, with lower collagen production for MSCmo. The tenogenic differentiation medium was able to increase the concentration of MMP-2 and MMP-9 and also increase the expression of tenogenic markers Sclerax, Mohawk, Biglican, Decorin, COL1, COL3, Tenascin C and the osteogenic factor Runx2. **Conclusion:** According to our results, we determined that the best source of proliferation capacity and tenogenic differentiation in vitro are MSCad. MSCtd ISO showed an evident in vitro tenogenesis capacity, being a promising source of CTM. The new tenogenic differentiation methodology proposed by the study was effective in inducing tenogenesis of all MSC sources evaluated.

Keywords: Biomaterial; Tissue engineering; Regenerative medicine; Tendon; three-dimensional cultivation

Capítulo 1

1.1 Introdução

Os tendões são estruturas de conexão responsáveis pela transferência de forças dos músculos para os ossos. São formados por tenócitos envoltos em uma matriz extracelular (MEC) composta por água (65%), colágeno (30%) e proteoglicanas (5%). O colágeno e as proteoglicanas representam de 70 a 80% do tendão desidratado e o colágeno tipo I é o mais abundante com mais de 95% do total de colágeno tendíneo (KÜMMERLE; THEISS; SMITH, 2019a; YIN et al., 2019).

As tendinopatias são causas comuns de morbidade, queda de desempenho e afastamento do esporte em equinos e humanos (DOCHEVA et al., 2015; KANNUS, 1997). Estima-se que de 30% a 50% das lesões de atletas humanos estejam ligadas aos tendões. Nestes, os principais tendões envolvidos são manguito rotador, calcâneo comum e tibial posterior (KANNUS, 1997). Nos equinos a maior incidência de tendinites ocorre nos membros torácicos e principalmente nos tendões flexor digital superficial (TFDS) e tendão flexor digital profundo (TFDP). A tendinite é a enfermidade do sistema musculoesquelético mais frequente em equinos atletas, sendo o TFDS o mais acometido, com incidência de 13% a 30% de acordo com a modalidade e intensidade atlética praticada (BARREIRA et al., 2008).

As lesões tendíneas ocorrem com maior frequência secundárias ao acúmulo de estresse e são precedidas por alterações degenerativas da MEC como idade avançada e aumento da temperatura tendínea durante o exercício. Raramente as tendinites ocorrem por um evento único de elevada carga (O'BRIEN; MARR; THORPE, 2020).

A reparação tendínea é lenta e ineficaz, devido ao tecido afetado ser substituído por um tecido cicatricial de qualidade inferior ao tecido original (CARVALHO et al., 2013). Elevadas taxas de recidivas e longo período de recuperação são fatores correlacionados à baixa qualidade do tecido de reparação, reduzida vascularização tendínea, células com atividade mitótica diminuída e menor quantidade de células progenitoras no tendão (GUERCIO et al., 2015). A recorrência das lesões tendíneas em equinos podem variar de 42% a 56% de acordo com a terapia empregada e atividade atlética desempenhada (DYSON, 2004). O processo natural de reparação produz uma MEC de colágenos de

diâmetro reduzido e menos ligações cruzadas entre as fibrilas gerando menor qualidade tecidual e mecânica (GODWIN et al., 2012; KÜMMERLE; THEISS; SMITH, 2019a).

Visto que a fisiopatologia da tendinite é similar entre humanos e equinos (BARREIRA et al., 2008; DOCHEVA et al., 2015; GODWIN et al., 2012), os equinos são considerados modelos experimentais do sistema musculoesquelético para medicina humana, aceitos pela comunidade científica e organizações internacionais como *US Food and Drug Administration (FDA)* e *European Medicines Agency (EMA)* (SHOJAEI; PARHAM, 2019).

Objetiva-se no tratamento da tendinite o controle do processo inflamatório, redução do tempo de cicatrização e produção de um tecido reparatório de qualidade e funcionalidade similar ao tecido original prévio à lesão, de maneira a reduzir as taxas de recidivas e morbidades associadas à enfermidade. As terapias regenerativas possuem as propriedades almejadas no tratamento das tendinites (CARVALHO et al., 2013).

O emprego da terapia com células-tronco mesenquimais (CTM) adjuvante a tratamentos convencionais demonstra resultados favoráveis na redução do tempo de reparação, maior qualidade mecânica e histológica tecidual e conseqüentemente menores taxas de recidivas (DE MATTOS CARVALHO et al., 2011; DOCHEVA et al., 2015; GODWIN et al., 2012). Entretanto, a aplicação de CTM indiferenciadas para o tratamento de lesões tendíneas possui o risco de formação ectópica de tecido ósseo (ALVES et al., 2011; SHOJAEI; PARHAM, 2019).

As CTM são células multipotentes oriundas de diversos tecidos adultos e possuem a competência de diferenciação limitada em linhagens celulares como osteoblastos, condrócitos, tenócitos, fibroblastos e adipócitos. Possuem também capacidade de imunomodulação, propriedades anti-inflamatórias e produção de fatores de crescimento e antiapoptóticos como VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), HGF (fator de crescimento de hepatócito), IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1) TGF- β (fator de transformação do crescimento beta), bFGF (fator de crescimento fibroblástico básico), FECGM (fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos) (REHMAN et al., 2004; ALVES et al., 2011; GARVICAN et al., 2014; GODOY et al., 2014; SANTOS et al., 2018).

O uso conjunto de CTM em materiais biocompatíveis ou compostos bioativos fornecem proteção às células, causam estimulação mecânica no sítio de tratamento e

auxiliam para orquestrar os efeitos parácrinos das CTM (SANTOS et al., 2018). Atualmente existem diversos arcabouços para o cultivo tridimensional (3D), classificados entre sintéticos, biológicos ou bio sintéticos (SMITH et al., 2016). A utilização de biomateriais oriundos de componentes isolados da MEC como colágeno tipo I (COL1) e ácido hialurônico apresentam força e biocompatibilidade desejáveis, entretanto não reproduz o microambiente lesado e a recelularização é prejudicada (FARNEBO et al., 2014).

A MEC tendínea é composta por moléculas funcionais e estruturais secretadas pelas células residentes e formam uma organização 3D de composição bioquímica específica de cada tecido. A partir da descoberta da solubilização tecidual e formação de um hidrogel, houve uma ampliação de sua aplicação *in vivo* e *in vitro* (LOVATI; BOTTAGISIO; MORETTI, 2016; SALDIN et al., 2017). Em estudo *in vitro* foi determinado que a adição de MEC tendínea a um hidrogel de COL1 em cultivo 3D aumentou a diferenciação tenogênica de CTM derivadas de adipócitos humanos quando comparado com hidrogel sem MEC (YANG et al., 2013). A utilização de um hidrogel de MEC tendínea equina (HgMECTdEq) completa é considerado superior por reproduzir o microambiente do tecido afetado e interferir diretamente no comportamento, dinâmica e diferenciação celular (SALDIN et al., 2017).

A produção de um hidrogel a partir da solubilização da MEC tecidual é uma interessante estratégia, visto a conhecida influência da MEC no comportamento celular, além de promissora capacidade de estimular a regeneração tecidual (FARNEBO et al., 2014; SALDIN et al., 2017; SPANG; CHRISTMAN, 2018). A aplicação do hidrogel de MEC já tem sido utilizada em diversos órgãos incluindo miocárdio, fígado, traqueia, esôfago e tendão. O uso é feito de diferentes formas e combinações como revestimento, povoado com CTM, fatores de crescimento, outros materiais biológicos ou sintéticos e mais recentemente como *bioinks* para impressão 3D (GARVICAN et al., 2014; SPANG; CHRISTMAN, 2018).

As diferenciações osteogênica, adipogênica e condrogênica são facilmente realizadas *in vitro*, pois já possuem meios de diferenciação determinados e padronizados comercialmente. Entretanto, apesar de a diferenciação tenogênica já ter sido alcançada em alguns estudos, ainda não existe um protocolo estabelecido (COSTA-ALMEIDA; CALEJO; GOMES, 2019). A indução tenogênica das CTM é um fator determinante para

regeneração tendínea e o cultivo 3D se tornou importante aliado nesta busca (LIU et al., 2017).

Diversos estudos têm sido direcionados em classificar qual a melhor origem de CTM em diferentes ambientes a ser empregada nas enfermidades tendíneas, com relativa superioridade para as CTM derivadas de tendão e tecido adiposo, quando comparadas com medula óssea (STEWART et al., 2009; TAN et al., 2012; YOSHIMURA et al., 2007). Entretanto, não existem estudos que avaliem a tenogênese de CTM em cultivo 3D em biomateriais compostos como HgMECTdEq e membrana *Transwell*[®] de COL1 e 3 para determinar qual a melhor origem celular.

Justifica-se o desenvolvimento desse trabalho com a proposta de determinar qual a melhor fonte de CTM quanto ao desempenho de proliferação celular *in vitro*, quando cultivadas em 2D e 3D, e quanto à expressão tenogênica, visto seu potencial de aumentar qualidade e reduzir o tempo de reparação tendínea. Também foi proposto avaliar a capacidade do HgMECTdEq e membrana de COL1 e 3 em estimular a tenogênese das CTM de quatro origens tecido adiposo (CTMad), medula óssea (CTMmo) e tendão obtidas por isolamento (CTMtd ISO) ou explante (CTMtd EXPL), associadas a um novo meio de diferenciação tenogênica. Em hipótese, as CTMtd e CTMad possuem vantagens devido à sua tecido-especificidade e maior capacidade proliferativa *in vitro*, respectivamente.

1.2 Objetivo

Este projeto tem como objetivos 1) determinar a melhor fonte de CTM dentre tecido adiposo, medula óssea e tendão que, cultivada em HgMECTdEq, possui as melhores características de proliferação e diferenciação tenogênica *in vitro*, comparando cada grupo isoladamente, e 2) testar novo protocolo de diferenciação tenogênica através do cultivo 3D de CTM imersas em HgMECTdEq e 2D em placas revestidas com colágeno I/III, em meio de diferenciação tenogênico.

1.2.1 Objetivos específicos

- Avaliar a expressão gênica de fatores tenogênicos através da técnica de qRT-PCR utilizando os marcadores gênicos Scleraxis (SCX), Mohawk (MHK), Tenacin C (TNC), Biglicana (BGN), Decorin (DCN), Colágeno 1 (COL1A1), Colágeno 3 (COL3A1).

- Verificar qual origem de CTM possui a menor expressão gênica de fatores osteogênicos através da técnica de RT-qPCR pelo gene *runt-related transcription factor 2* (RUNX2).
- Aferir o perfil e concentração de metaloproteínases de matriz 2 e 9 presentes na amostra tridimensional de interação das CTM com o hidrogel de MEC pelo teste de zimografia.
- Caracterizar a diferenciação tenogênica com a combinação do meio tenogênico associado ao cultivo 3D em membrana de colágeno I e colágeno III.
- Verificar a diferenciação tenogênica através da produção de Colágeno por coloração de *Picrosírius Red*.
- Aferir a morfologia das CTM ao final do cultivo no hidrogel através da coloração de *Picrosírius Red*.
- Propor a utilização clínica do HgMECTdEq a partir da determinação da melhor fonte de CTM a ser empregada.

1.3 Hipótese

A cultura 3D de CTM, somada ao meio de diferenciação tenogênico, induzirá a expressão gênica de fatores tenogênicos e proteínas de ECM, bem como a produção de colágeno pelas CTM diferenciadas em tenócitos. De acordo com a tecido-especificidade das CTMtd, espera-se notar desempenho superior em diferenciação tenogênica desta fonte celular quando comparada com as CTMad e CTMmo.

1.4 Revisão Bibliográfica

1.4.1 Lesões tendíneas

A estrutura tendínea é disposta em um arranjo estrutural hierárquico onde 50% a 60% são compostos de água e a massa seca restante é composta por 75% a 80% de colágeno tipo I (O'BRIEN; MARR; THORPE, 2020). A população celular tendínea é escassa, composta principalmente por tenócitos imersos em uma matriz extracelular (MEC). As moléculas de colágeno se unem e formam redes medindo 1,5 nanômetro, que se acumulam e formam microfibrilas de 10 nanômetros. As microfibrilas se unem para formar as fibrilas de colágeno de 10-50 nanômetros. As fibrilas são dispostas em arranjos tripla hélice, interconectados para formar as fibras de colágeno, com 1 a 20 micrômetros. As fibras de colágeno são dispersas na matriz interfibrilar vascularizada e originam os fascículos com diâmetro de 50 a 300 micrômetros. Vários fascículos envoltos pela matriz

interfascicular formam o feixe fascicular que mede de 1 a 3 milímetros contendo células interfasciculares e vasos sanguíneos. A união de feixes fasciculares constitui o tendão, envolto pelo endotendão, epitendão e paratendão (Figura 1) (KÜMMERLE; THEISS; SMITH, 2019b; O'BRIEN; MARR; THORPE, 2020).

Os tendões desempenham função fundamental na locomoção. Possuem a capacidade de se alongar e retrair em cada passada e durante essa dinâmica, armazenam e liberam energia para impulsão do membro (O'BRIEN; MARR; THORPE, 2020). Nos equinos, os tendões flexores digitais superficiais (TFDS) dos membros torácicos são os mais exigidos, e conseqüentemente os mais propensos a sofrer lesões induzidas por sobrecarga, representando 75% a 95% das lesões tendíneas (THORPE; CLEGG; BIRCH, 2010). Durante a atividade atlética os tendões podem sofrer tensões de estiramento de até 16% do seu comprimento, sem causar alterações patológicas (RIBITSCH; OREFF; JENNER, 2021).

As lesões tendíneas acontecem de forma intrínseca, por sobrecargas durante o exercício, ou extrínseca, quando associadas a traumas externos. Acredita-se que microlesões repetitivas decorrentes da atividade física predisponham a degeneração da matriz tendínea e precedam o momento da lesão (RIBITSCH; OREFF; JENNER, 2021). A idade é positivamente correlacionada com a ocorrência de lesões tendíneas em equinos e humanos. As principais alterações identificadas com o envelhecimento são redução da fibromodulina e da elastina, além do acúmulo de colágeno degenerado (GODINHO et al., 2017; O'BRIEN; MARR; THORPE, 2020) A capacidade de resolver a inflamação tendínea é reduzida em animais mais velhos devido à redução de proteínas inflamatórias resolutivas, contribuindo para a cronicidade e recidivas das lesões tendíneas (DAKIN, 2017).

As lesões tendíneas podem gerar graus variados de claudicação de acordo com o tendão acometido, intensidade e localização da lesão. O diagnóstico das tendinites é associado ao histórico de atividade ou acidentes, acompanhado de sinais inflamatórios como dor, aumento de temperatura e edema sobre o local. A avaliação ultrassonográfica do tendão permite identificar com precisão o local e a gravidade da lesão (DAKIN, 2017; KÜMMERLE; THEISS; SMITH, 2019b). Em situações específicas como ruptura do tendão *peroneus tertius*, a claudicação mecânica específica permite o diagnóstico clínico, pois o aparato recíproco é interrompido, permitindo estender o tarso e flexionar a articulação femuro-tibial e a articulação metatarsofalângica isoladamente (KÜMMERLE; THEISS; SMITH, 2019b).

O processo de reparação tendínea é dividido em três etapas que se sobrepõem. A primeira é a fase inflamatória que se inicia logo após a lesão, onde células inflamatórias são recrutadas para debridar o tecido lesionado, e dura de uma a duas semanas. A fase seguinte é conhecida como proliferativa e possui uma intensa infiltração celular, aumento da vascularização, áreas hemorrágicas e desorganização da MEC, sendo mais evidente entre três e seis semanas. Esta fase é seguida pela fase de remodelamento, onde existe maior deposição de colágeno tipo I à medida que o tecido cicatricial amadurece, podendo durar até 12 meses após a lesão (DAKIN, 2017; O'BRIEN; MARR; THORPE, 2020).

A baixa celularidade, a escassa vascularização e o reduzido metabolismo do tendão predis põem a formação de um tecido cicatricial fibroso não especializado. Ao final da reparação, o tecido elástico tendíneo é substituído por tecido conjuntivo fibroso, composto por um depósito excessivo e desorganizado de MEC de glicosaminoglicanos, proteoglicanos e colágeno tipo III (DAKIN, 2017; RIBITSCH; OREFF; JENNER, 2021). Essa característica do tecido cicatricial é a principal responsável por 56% (DYSON, 2004) a 80% das recidivas (DOWLING et al., 2000) das lesões tendíneas após o retorno ao esporte.

São observadas micro-lesões histológicas na matriz tendínea logo após a atividade física. Essas alterações possuem o pico em 48 horas, mas com 72 horas já não são identificadas. Isso demonstra que a homeostase tecidual tendínea é alcançada com intervalos de exercícios a cada 72 horas e, desta forma, previne a ocorrência de lesões (DOCKING et al., 2012). A prevenção e redução da inflamação crônica no tratamento da tendinite é apontada como ponto chave para melhorar a reparação do tecido tendíneo (DAKIN, 2017).

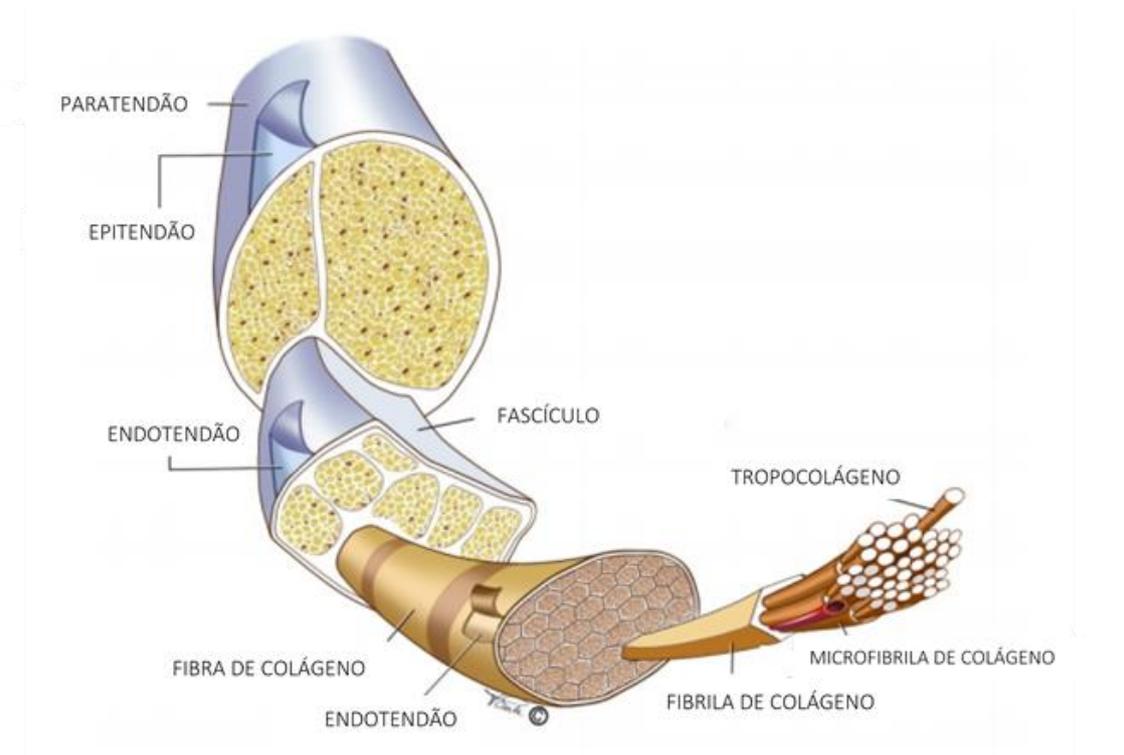


Figura 1. Estrutura hierárquica tendínea. Adaptado de (BOSIA; MERLINO; PUGNO, 2014).

1.4.2 Células-tronco mesenquimais no tratamento da tendinite

O primeiro relato do emprego terapêutico das CTM na tendinite equina foi no ano de 2003 pelo pesquisador Roger Smith, com aplicação intralesional no TFDS de 6.4×10^5 CTM autólogas derivadas de medula óssea em um pônei. Após a aplicação não foi observado aumento de volume nem claudicação ao passo do membro acometido. O exame ultrassonográfico revelou que a lesão foi preenchida com tecido fibroso e não foram observados efeitos adversos (SMITH et al., 2003). A partir da descrição dessa nova modalidade terapêutica, iniciaram diversas pesquisas sobre o assunto e hoje o tratamento da tendinite com CTM se destaca pela redução das taxas de recidivas das lesões, de 80% (DOWLING et al., 2000) para 13% a 36% (RIBITSCH; OREFF; JENNER, 2021; SMITH, 2008).

Apesar de o mecanismo de atuação das CTM após implantação não ser completamente conhecido, é sabido a sua capacidade de imunomodulação através da redução do infiltrado de células imunes no local da lesão, ação anti-inflamatória por reduzir a concentração de citocinas pró-inflamatórias e aumentar a expressão de citocinas anti-inflamatórias, além de comprovado aumento da vascularização e perfusão do tecido tendíneo lesado durante a cicatrização e reduzir a formação de fibrose através da inibição

da sinalização do TGF- β 1 (RIBITSCH; OREFF; JENNER, 2021; USUNIER et al., 2014).

A modalidade de CTM alogênicas tem empolgado e conquistado espaço no mercado devido à sua praticidade de obtenção, por estarem disponíveis em biobancos e menor custo (SMITH, 2020). Entretanto, autores descrevem reações inflamatórias com a aplicação de CTM alogênicas MHC classe II positivas e após injeções seriadas (ARDANAZ et al., 2016; SCHNABEL et al., 2013; BRANDÃO et al., 2018; SMITH, 2020). As CTM autólogas são consideradas mais seguras no tratamento da tendinite. No entanto, o tempo de viabilização da quantidade terapêutica de células pode tornar a terapia inviável (RIBITSCH; OREFF; JENNER, 2021; SMITH, 2020).

A dose indicada em cada aplicação é de 10^7 CTM e de acordo com o local e dimensão da lesão, podem ser indicadas 1 ou mais aplicações, durante o acompanhamento clínico do caso (SCHNABEL et al., 2013).

Variadas fontes de CTM já foram empregadas no tratamento de tendinite em equinos como tecido adiposo (DE MATTOS CARVALHO et al., 2011), medula óssea (SMITH et al., 2003), tendão (DURGAM; STEWART, 2016) e cordão umbilical (VAN LOON et al., 2014). O tecido adiposo é conhecido por ser a mais abundante e acessível fonte de CTM do organismo. A facilidade de coleta, associada à rápida taxa de proliferação *in vitro*, habilidade de produzir componentes de MEC e citocinas anti-inflamatórias tem atraído grande atenção para a utilização dessa fonte celular para o tratamento de tendinite e demais afecções. A aplicação clínica das CTMad em lesões tendíneas experimentais foi realizada por Carvalho et al. (2011) e demonstraram melhora histológica significativa da lesão em organização das fibras tendíneas, redução do infiltrado inflamatório, menos fibrose e aumento da expressão de colágeno I (DE MATTOS CARVALHO et al., 2011; SHOJAEI; PARHAM, 2019).

As CTM derivadas de medula óssea (CTMmo) são conhecidas como fonte pioneira para a terapia celular nas lesões tendíneas. Apesar de alguns estudos demonstrarem resultados positivos quanto à sua utilização no tratamento da tendinite em equinos, alguns fatores negativos restringem sua utilização, como processo de coleta mais invasivo e arriscado em comparação à coleta de tecido adiposo, prolongada expansão *in vitro*, maior número de passagens e possibilidade de formação de metaplasia óssea na lesão tendínea (ALVES et al., 2011; SMITH, 2020).

1.4.3 Cultivo tridimensional e hidrogel

O modelo de cultivo bidimensional (2D) onde as células são cultivadas em monocamada aderidas ao plástico é amplamente difundido pelo mundo e empregado para avaliações *in vitro*. Esta metodologia de cultivo proporcionou inúmeras descobertas no âmbito da biologia, desenvolvimento e comportamento celular. No entanto essa prática possui limitações pois, não reproduz a complexidade e diversidade do microambiente tecidual interferindo desfavoravelmente na dinâmica e funcionamento das células, como limitada expansão e redução da capacidade clonal e de diferenciação das CTM (MCKEE; CHAUDHRY, 2017; SOUZA-ARAÚJO ZN. et al., 2020).

O cultivo 3D, apesar de receber grande enfoque nos dias atuais, possui mais de um século desde o primeiro relato, onde o pesquisador Alexis Carrel no ano de 1912 foi capaz de isolar e manter em cultivo por mais de 3 meses um explante de embrião de galinha (CARREL, 1912). A cultura celular em 3D é capaz de recriar uma organização característica do tecido, proporcionando uma arquitetura e microambiente que influenciam no comportamento, permite maior interação entre diversas células, produção de MEC e conseqüentemente maior proximidade com o desempenho celular *in vivo* (SOUZA-ARAÚJO ZN. et al., 2020).

Um objetivo interessante das pesquisas com cultivo 3D é preencher a lacuna entre os prejuízos da experimentação em animais em uma extremidade e cultivo celular em monocamada na outra. Desta forma, criar um ambiente de cultura celular que mimetize o mais próximo possível o tecido nativo, oferece vantagens em diversos aspectos (HAYCOCK, 2011; LEE; CUDDIHY; KOTOV, 2008).

Existem diversas metodologias de confecção do cultivo 3D, a aplicação em animais e explantes organotípicos são utilizados quando o estudo é focado em um tecido original, sem modificações. Outra representação do cultivo 3D são os esferóides, onde as células são cultivadas e devido à sua capacidade aderente, permite a formação de agregados que mimetizam órgãos e tecidos. Já a cultura de células em arcabouços 3D é uma modalidade complexa de engenharia tecidual. Uma ampla gama de compostos sintéticos ou biológicos podem ser empregados para confecção de diferentes sistemas de arcabouço para interação 3D com células (LEE; CUDDIHY; KOTOV, 2008; MCKEE; CHAUDHRY, 2017). Os arcabouços precisam possuir características específicas como alta porosidade, formato específico e superfície aderente para as células, além de permitir o fluxo de gases, nutrientes e metabólitos. De acordo com o tipo celular de interesse, os arcabouços devem apresentar características particulares como exemplo os tenócitos que naturalmente são

envoltos por uma MEC fibroelástica que recebe frequentes estímulos mecânicos durante a movimentação. Ao contrário dos osteoblastos que são células que aderem em uma superfície rígida dentro da lâmina cubóide do osso e possuem pouca mobilidade. Desta forma, uma grande variabilidade de arcabouços é necessária de acordo com cada especificidade celular, refletindo na elevada complexidade da engenharia tecidual (HAYCOCK, 2011; LEE; CUDDIHY; KOTOV, 2008; MCKEE; CHAUDHRY, 2017)

Diversos tipos de materiais podem ser utilizados na confecção dos arcabouços, no entanto, no âmbito da cultura de células, os polímeros são os mais frequentes utilizados, pois, são fabricados de forma simples e possuem controlável capacidade química e estrutural. Existe disponível uma ampla variedade de polímeros. Estes podem ser sintéticos, incluindo o ácido poliglicólico, óxido de polietileno, acrilamida e ácido metacrílico. Também podem ser constituídos de biocompostos como colágeno, alginato, quitosana, ácido hialurônico, entre outros. Em referência aos arcabouços biocompostos uma exigência é a capacidade de reproduzir um ambiente da MEC para apoiar o cultivo celular (HAYCOCK, 2011; SALDIN et al., 2017). A utilização de arcabouços para cultivo de CTM à base de colágeno é preferida em comparação a outros biomateriais devido à majoritária composição na MEC tendínea (LI et al., 2021).

Os hidrogéis são compostos por polímeros sintéticos ou orgânicos como citado acima. Entretanto, devem possuir alto nível de concentração aquosa (> 30%) além de manter íntegra relação fisicoquímica das cadeias de polímeros. A descoberta da possibilidade de confecção de hidrogéis a partir da solubilização da MEC permitiu um grande campo para engenharia tecidual, aplicação clínica e utilização como arcabouço para interação celular *in vivo* e *in vitro* (SALDIN et al., 2017). A MEC interfere diretamente na dinâmica celular através da sua propriedade física e química, além de citocinas, quimiocinas, peptídeos críticos e nanovesiculares. Embora não totalmente elucidado, é conhecida a capacidade dos hidrogéis de MEC influenciarem diretamente a viabilidade, a proliferação, a migração, a morfologia e a diferenciação celular (SALDIN et al., 2017).

1.4.4 Células-tronco mesenquimais derivadas do tendão

A primeira constatação da presença de células com características tronco no tecido tendíneo foi realizada por Bi et al. (2007), no tendão de humanos e ratos. Denominadas de células-tronco mesenquimais derivadas de tendão (CTMtd), essas células possuíam

capacidade de expansão clonal, auto renovação, multipotência, expressão positiva dos receptores de superfície CD44, Stro-1, CD146, CD90 e negativos para CD18, CD34, CD45, CD106 e CD117 (BI et al., 2007). A população celular tendínea, apesar de escassa, é bastante heterogênea e as CTMtd representam de 1 a 4% do total de células nucleadas presentes no tecido tendíneo (BI et al., 2007; COSTA-ALMEIDA; CALEJO; GOMES, 2019).

Em estudos comparativos foi demonstrada superioridade das CTMtd sobre CTMad e CTMmo devido à maior afinidade e constituição similar ao tecido tendíneo, expressão gênica de fatores tenogênicos como Sclerax, Colágeno I e Proteína oligomérica da matriz da cartilagem (COMP – YOUNGSTROM; LADOW; BARRETT, 2016), bem como melhor alinhamento das fibras de colágeno e força de tensão do tecido cicatricial (DURGAM et al., 2016). Em modelo experimental de reparação do tendão de Aquiles de ratos, foi verificada habilidade superior das CTMtd sobre CTMmo, apresentando maior densidade e alinhamento longitudinal das fibras cicatriciais após aplicação intralesional das CTM (AL-ANI et al., 2015).

Estudos prévios demonstraram a existência de CTMtd com distintos desempenhos de proliferação e imunofenotipagem *in vitro* de acordo com a região tendínea de onde foram obtidas. Supostamente, por pertencerem a uma região com maior quantidade de COL1, as células do endotendão são descritas como possuindo de maior capacidade anti-inflamatória, além de síntese e remodelamento de fibras colágenas, quando comparadas com as células isoladas do peritendão (BI et al., 2007; MIENALTOWSKI; ADAMS; BIRK, 2013). A avaliação de CTMtd do endo e peritendão do tendão de Aquiles de ratos, não demonstrou diferença na expressão de receptores de superfície e na capacidade de diferenciação em tri-linhagem. No entanto, as células do endotendão demonstraram melhor capacidade de formação de colônias, bem como maior expressão gênica dos marcadores tenogênicos Tenomodulina e Scleraxis, indicando-as como melhor sítio de coleta de CTMtd. (MIENALTOWSKI; ADAMS; BIRK, 2013)

Apesar da sua tecidoespecificidade e resultados promissores em estudos, a aplicação terapêutica das CTM derivadas de tendão possuem importantes limitações devido à morbidade associada ao sítio de coleta para aplicações autólogas, difícil isolamento, maior tempo e heterogenicidade da morfologia celular durante o cultivo (SHOJAEI; PARHAM, 2019).

1.4.5 Diferenciação tenogênica

Ao contrário do que acontece com a diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica, não existe um protocolo padronizado para promover indução tenogênica de CTM (COSTA-ALMEIDA; CALEJO; GOMES, 2019).

Diversas metodologias são estudadas e aplicadas na diferenciação tenogênica *in vitro* de CTM, baseadas principalmente na formação embrionária do tendão. Já é conhecida a necessidade de estimulação biológica e mecânica para o desenvolvimento embrionário tendíneo (LIU et al., 2017). Algumas vias de sinalização celular como TGF- β , proteína morfogenética óssea 12 (BMP-12), fator de crescimento fibroblástico (FGF) e fator de crescimento endotelial (EGF) demonstraram influência positiva na diferenciação tenogênica de células progenitoras musculoesqueléticas (COSTA-ALMEIDA; CALEJO; GOMES, 2019; KUO; TUAN, 2008).

A estimulação mecânica é parte essencial para o desenvolvimento embrionário tendíneo, especialmente para estimulação da fase final de maturação do colágeno (KUO; TUAN, 2008). A estimulação mecânica tendínea é revertida em sinais biomecânicos celulares que resultam em proliferação e diferenciação, bem como estimulam a síntese de MEC (LIU et al., 2017). Em estudo de tensão cíclica de um arcabouço tendíneo descelularizado, após ser recelularizado com CTMmo equina, foi possível identificar aumento do módulo de elasticidade e resistência do arcabouço tendíneo, bem como aumento da expressão gênica de fatores tenogênicos como Sclerax, Decorin, Biglicana, Colágeno I e Colágeno III (YOUNGSTROM; LADOW; BARRETT, 2016).

Os principais fatores de transcrição associados à formação tendínea são Scleraxis e Mohawk. O Sclerax é um fator de transcrição hélice-alça-hélice básico, determinado como marcador específico tendíneo e ferramenta importante para proliferação e diferenciação dos tenócitos (LIU et al., 2017). A abstração gênica do Sclerax em estudo realizado com camundongos demonstrou atrofia e desorganização da MEC tendínea associada à suspensão da diferenciação dos tenócitos e redução da expressão de COL1. Os camundongos ainda apresentam redução da força de transmissão tendínea, limitada movimentação dos membros e músculos do dorso, além de incapacidade de mover a cauda (MIYABARA et al., 2014).

O Mohawk é um gene *homeobox* regulador responsável pelo desenvolvimento dos tendões, através da proliferação e diferenciação celular. Em estudo realizado por Ito et al. (2010), o gene Mohawk foi depletado de ratos e o seu desenvolvimento foi acompanhado por 3 meses. Os tendões desses animais eram hipoplásicos e pálidos quando comparado

aos tendões de ratos normais, além de apresentarem menor expressão gênica de COL1, redução do diâmetro das fibrilas de colágeno, o que sugere que o Mohawk desempenha importante papel na diferenciação tenogênica (ITO et al., 2010; LIU et al., 2017).

O Biglicana e Decorin são principais pequenos proteoglicanos ricos em leucina de classe I encontrados nos tendões e possuem uma e duas cadeiras de glicosaminoglicanos condroitina sulfatados, respectivamente. Estas proteínas estão envolvidas na fibrilogênese, homeostase de colágeno e organização da MEC. Nas lesões tendíneas ocorre um aumento da expressão gênica do Biglicana, enquanto o Decorin reduz sua expressão (DUNKMAN et al., 2014; ROBINSON et al., 2017). A depleção gênica de Biglicana e Decorin em ratos resultou em redução do diâmetro das fibrilas de colágeno, propriedades mecânicas inferiores ao comparar com tendões de ratos normais e a reparação tendínea nesses ratos foi considerada inferior, principalmente na depleção de Decorin (DUNKMAN et al., 2014). Interessantemente, na depleção de Decorin, o Biglicana é super expresso compensando a ausência de Decorin na ligação ao COL1 (ROBINSON et al., 2017).

Tenascina C é uma glicoproteína hexamérica ligada por dissulfeto presente no desenvolvimento e em tendões de indivíduos adultos. Atua de forma múltipla na estabilidade e estruturação da matriz fibrocartilaginosa tendínea (NEMOTO et al., 2013; REED; JOHNSON, 2014). Estudos recentes demonstraram que a expressão de Tenascina C é uma resposta celular adaptativa á compressão que auxilia na homeostase tendínea. Apesar de possuir alta expressão tendínea, essa glicoproteína não é exclusiva dos tendões (REED; JOHNSON, 2014).

O COL1 é o mais abundante colágeno do organismo, corresponde a 70% de todo colágeno e é o principal componente responsável pela força tênsil e elasticidade tendínea. Cerca de 90-95% da matéria seca do tendão é composta por COL1, os demais componentes são encontrados entre e no interior das fibras de colágeno I, sendo eles, colágeno tipo III, IV, proteoglicanos e COMP (KÜMMERLE; THEISS; SMITH, 2019b; YIN et al., 2019).

O COL3 constitui fibrilas mais finas e frágeis em comparação com as fibrilas de COL1. São encontrados principalmente no endotendão de tendões normais. O COL3 atua na fibrilogênese do COL1 com função de suporte lateral às fibrilas, permitindo o crescimento longitudinal e prevenindo o crescimento lateral do COL1 (SÖDERSTEN et al., 2013).

O RUNX2 é um fator de transcrição gênica essencial para diferenciação

osteoblástica e formação óssea. Camundongos com depleção gênica do RUNX2 tiveram drástica redução da linhagem celular osteoblástica (KAWANE et al., 2018). A mineralização do tecido tendíneo possui descrita ocorrência em humanos e equinos. Os fatores de risco associados a esta metaplasia são lesões tendíneas crônicas, injeção tendínea de corticóides e aplicação de aspirado de medula (ALVES et al., 2011; O'BRIEN; SMITH, 2018).

1.5 Referências

AL-ANI, M. K.; XU, K.; SUN, Y.; PAN, L.; XU, Z.; YANG, L. Study of Bone Marrow Mesenchymal and Tendon-Derived Stem Cells Transplantation on the Regenerating Effect of Achilles Tendon Ruptures in Rats. **Stem Cells International**, [s. l.], v. 2015, 2015.

ALVES, A. G. L.; STEWART, A. A.; DUDHIA, J.; KASASHIMA, Y.; GOODSHIP, A. E.; SMITH, R. K. W. Cell-based Therapies for Tendon and Ligament Injuries. **Veterinary Clinics of North America - Equine Practice**, [s. l.], v. 27, n. 2, p. 315–333, 2011.

ARDANAZ, N.; VÁZQUEZ, F. J.; ROMERO, A.; REMACHA, A. R.; BARRACHINA, L.; SANZ, A.; RANERA, B.; VITORIA, A.; ALBAREDA, J.; PRADES, M.; ZARAGOZA, P.; MARTÍN-BURRIEL, I.; RODELLAR, C. Inflammatory response to the administration of mesenchymal stem cells in an equine experimental model: Effect of autologous, and single and repeat doses of pooled allogeneic cells in healthy joints. **BMC Veterinary Research**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 1–9, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12917-016-0692-x>>

BARREIRA, A. P. B.; ALVES, A. L.; SALTO, M. E.; ARNORINT, R. L.; KOHAYAGAWA, A.; MENARIM, B. C.; MOTA, L. S. Autologous implant of bone marrow mononuclear cells as treatment of induced equine tendinitis. **International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 46–54, 2008.

BI, Y.; EHIRCHIOU, D.; KILTS, T. M.; INKSON, C. A.; EMBREE, M. C.; SONOYAMA, W.; LI, L.; LEET, A. I.; SEO, B. M.; ZHANG, L.; SHI, S.; YOUNG, M. F. Identification of tendon stem/progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche. **Nature Medicine**, [s. l.], v. 13, n. 10, p. 1219–1227, 2007.

BOSIA, F.; MERLINO, M.; PUGNO, N. M. Fatigue of self-healing hierarchical soft nanomaterials: The case study of the tendon in sportsmen. **Journal of Materials Research**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 2–9, 2014.

BRANDÃO, J. S.; ALVARENGA, M. L.; PFEIFER, J. P. H.; DOS SANTOS, V. H.;

FONSECA-ALVES, C. E.; RODRIGUES, M.; CASTILLO J. A. L.; ALVES, A. L. G. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in healthy equine superficial digital flexor tendon: A study of the local inflammatory response. **Research in veterinary science**, [s.l.], v. 118, p. 423-430, 2018.

CARREL, A. On the permanent life of tissues outside of the organism. **Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 15, n. 5, p. 516–528, 1912.

CARVALHO, A. D. M.; BADIAL, P. R.; ÁLVAREZ, L. E. C.; YAMADA, A. L. M.; BORGES, A. S.; DEFFUNE, E.; HUSSNI, C. A.; GARCIA ALVES, A. L. Equine tendonitis therapy using mesenchymal stem cells and platelet concentrates: A randomized controlled trial. **Stem Cell Research and Therapy**, [s. l.], v. 4, n. 4, 2013.

COSTA-ALMEIDA, R.; CALEJO, I.; GOMES, M. E. Mesenchymal Stem Cells Empowering Tendon Regenerative Therapies. [s. l.], 2019.

DAKIN, S. G. A review of the healing processes in equine superficial digital flexor tendinopathy. **Equine Veterinary Education**, [s. l.], v. 29, n. 9, p. 516–520, 2017.

DE MATTOS CARVALHO, A.; ALVES, A. L. G.; DE OLIVEIRA, P. G. G.; CISNEROS ÁLVAREZ, L. E.; AMORIM, R. L.; HUSSNI, C. A.; DEFFUNE, E. Use of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells for Experimental Tendinitis Therapy in Equines. **Journal of Equine Veterinary Science**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 26–34, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2010.11.014>>

DOCHEVA, D.; MÜLLER, S. A.; MAJEWSKI, M.; EVANS, C. H. Biologics for tendon repair. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s. l.], v. 84, p. 222–239, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2014.11.015>>

DOCKING, S. I.; DAFFY, J.; VAN SCHIE, H. T. M.; COOK, J. L. Tendon structure changes after maximal exercise in the Thoroughbred horse: Use of ultrasound tissue characterisation to detect in vivo tendon response. **Veterinary Journal**, [s. l.], v. 194, n. 3, p. 338–342, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.04.024>>

DOWLING, B. A.; DART, A. J.; HODGSON, D. R.; SMITH, R. K. W. Superficial digital flexor tendonitis in the horse. **Equine Veterinary Journal**, [s. l.], v. 32, n. 5, p. 369–378, 2000.

DUNKMAN, A. A.; BUCKLEY, M. R.; MIENALTOWSKI, M. J.; ADAMS, S. M.; THOMAS, S. J.; SATCHELL, L.; KUMAR, A.; PATHMANATHAN, L.; BEASON, D. P.; IOZZO, R. V.; BIRK, D. E.; SOSLOWSKY, L. J. The tendon injury response is influenced by decorin and biglycan. **Annals of Biomedical Engineering**, [s. l.], v. 42, n. 3, p. 619–630, 2014.

DURGAM, S. S.; STEWART, A. A.; SIVAGURU, M.; WAGONER JOHNSON, A. J.; STEWART, M. C. Tendon-derived progenitor cells improve healing of collagenase-induced flexor tendinitis. **Journal of Orthopaedic Research**, [s. l.], v. 34, n. 12, p. 2162–2171, 2016.

DYSON, S. J. Medical management of superficial digital flexor tendonitis: A comparative study in 219 horses (1992-2000). **Equine Veterinary Journal**, [s. l.], v. 36, n. 5, p. 415–419, 2004.

FARNEBO, S.; WOON, C. Y. L.; SCHMITT, T.; JOUBERT, L. M.; KIM, M.; PHAM, H.; CHANG, J. Design and characterization of an injectable tendon hydrogel: A novel scaffold for guided tissue regeneration in the musculoskeletal system. **Tissue Engineering - Part A**, [s. l.], v. 20, n. 9–10, p. 1550–1561, 2014.

GARVICAN, E. R.; DUDHIA, J.; ALVES, A. L.; CLEMENTS, L. E.; PLESSIS, F. Du; SMITH, R. K. W. Mesenchymal stem cells modulate release of matrix proteins from tendon surfaces in vitro: A potential beneficial therapeutic effect. **Regenerative Medicine**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 295–308, 2014.

GODINHO, M. S. C.; THORPE, C. T.; GREENWALD, S. E.; SCREEN, H. R. C. Elastin is Localised to the Interfascicular Matrix of Energy Storing Tendons and Becomes Increasingly Disorganised With Ageing. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 1–11, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-09995-4>>

GODOY, R. F.; ALVES, A. L. G.; GIBSON, A. J.; LIMA, E. M. M.; GOODSHIP, A. E. Do progenitor cells from different tissue have the same phenotype? **Research in Veterinary Science**, [s. l.], v. 96, n. 3, p. 454–459, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.02.013>>

GODWIN, E. E.; YOUNG, N. J.; DUDHIA, J.; BEAMISH, I. C.; SMITH, R. K. W. Implantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells demonstrates improved outcome in horses with overstrain injury of the superficial digital flexor tendon. **Equine Veterinary Journal**, [s. l.], v. 44, n. 1, p. 25–32, 2012.

GUERCIO, A.; DI MARCO, P.; CASELLA, S.; RUSSOTTO, L.; PUGLISI, F.; MAJOLINO, C.; GIUDICE, E.; DI BELLA, S.; PURPARI, G.; CANNELLA, V.; PICCIONE, G. 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**, [s. l.], v. 35, n. 1, p. 19–26, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2014.10.006>>

HAYCOCK, J. W. 3D Cell Culture: A Review of Current Approaches and Techniques. In: **3D Cell Culture**. [s.l: s.n.]. v. 695p. 1–15.

ITO, Y.; TORIUCHI, N.; YOSHITAKA, T.; UENO-KUDOH, H.; SATO, T.; YOKOYAMA, S.; NISHIDA, K.; AKIMOTO, T.; TAKAHASHI, M.; MIYAKI, S.; ASAHARA, H. The Mohawk homeobox gene is a critical regulator of tendon differentiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 107, n. 23, p. 10538–10542, 2010.

KANNUS, P. Tendon injuries and other tendon disorders in sports and exercise. **Scandinavian journal of medicine & science in sports**, [s. l.], v. 7, n. 2, 1997.

KAWANE, T.; QIN, X.; JIANG, Q.; MIYAZAKI, T.; KOMORI, H.; YOSHIDA, C. A.; MATSUURA-KAWATA, V. K. dos S.; SAKANE, C.; MATSUO, Y.; NAGAI, K.; MAENO, T.; DATE, Y.; NISHIMURA, R.; KOMORI, T. Runx2 is required for the proliferation of osteoblast progenitors and induces proliferation by regulating Fgfr2 and Fgfr3. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1–17, 2018.

KÜMMERLE, J. M.; THEISS, F.; SMITH, R. K. W. Diagnosis and Management of Tendon and Ligament Disorders. In: **Equine Surgery**. [s.l.] : WB Saunders, 2019. a. p. 1411–1445.

KÜMMERLE, J. M.; THEISS, F.; SMITH, R. K. W. Diagnosis and management of tendon and ligament disorders. In: **Auer, Jörg A; Stick, John; Kümmeler, Jan M; Prange, Timo. Equine surgery**. 5th. ed. St. Louis, Missouri. p. 1411–1445.

KUO, C. K.; TUAN, R. S. Mechanoactive tenogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. **Tissue Engineering - Part A**, [s. l.], v. 14, n. 10, p. 1615–1627, 2008.

LEE, J.; CUDDIHY, M. J.; KOTOV, N. A. Three-Dimensional Cell Culture Matrices: State of the Art. [s. l.], v. 14, n. 1, 2008.

LI, W.; CHI, N.; RATHNAYAKE, R. A. C.; WANG, R. Distinctive roles of fibrillar collagen I and collagen III in mediating fibroblast-matrix interaction: A nanoscopic study. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 560, p. 66–71, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.04.088>>

LIU, Y.; SUEN, C. W.; ZHANG, J. fang; LI, G. Current concepts on tenogenic differentiation and clinical applications. **Journal of Orthopaedic Translation**, [s. l.], v. 9, p. 28–42, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jot.2017.02.005>>

LOVATI, A. B.; BOTTAGISIO, M.; MORETTI, M. Decellularized and Engineered Tendons as Biological Substitutes: A Critical Review. **Stem Cells International**, [s. l.], v. 2016, 2016.

MCKEE, C.; CHAUDHRY, G. R. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Advances and

challenges in stem cell culture. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 159, p. 62–77, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.07.051>>

MIENALTOWSKI, M. J.; ADAMS, S. M.; BIRK, D. E. Regional differences in stem cell/progenitor cell populations from the mouse achilles tendon. **Tissue Engineering - Part A**, [s. l.], v. 19, n. 1–2, p. 199–210, 2013.

MIYABARA, S.; YUDA, Y.; KASASHIMA, Y.; KUWANO, A.; ARAI, K. Regulation of tenomodulin expression via Wnt/ β -catenin signaling in equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Journal of Equine Science**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 7–13, 2014.

NEMOTO, M.; KIZAKI, K.; YAMAMOTO, Y.; OONUMA, T.; HASHIZUME, K. Tenascin-C expression in equine tendon-derived cells during proliferation and migration. **Journal of Equine Science**, [s. l.], v. 24, n. 2, p. 17–23, 2013.

O'BRIEN, C.; MARR, N.; THORPE, C. Microdamage in the equine superficial digital flexor tendon. **Equine Veterinary Journal**, [s. l.], n. July, p. 1–14, 2020.

O'BRIEN, E. J. O.; SMITH, R. K. W. Mineralization can be an incidental ultrasonographic finding in equine tendons and ligaments. [s. l.], n. February, p. 613–623, 2018.

REED, S. A.; JOHNSON, S. E. Expression of scleraxis and tenascin C in equine adipose and umbilical cord blood derived stem cells is dependent upon substrata and FGF supplementation. **Cytotechnology**, [s. l.], v. 66, n. 1, p. 27–35, 2014.

REHMAN, J. et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. **Circulation**, v. 109, n. 10, p. 1292-1298, 2004.

RIBITSCH, I.; OREFF, G. L.; JENNER, F. Regenerative medicine for equine musculoskeletal diseases. **Animals**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 1–30, 2021.

ROBINSON, K. A.; SUN, M.; BARNUM, C. E.; WEISS, S. N.; HUEGEL, J.; SHETYE, S. S.; LIN, L.; SAEZ, D.; ADAMS, S. M.; IOZZO, R. V.; SOSLOWSKY, L. J.; BIRK, D. E. Decorin and biglycan are necessary for maintaining collagen fibril structure, fiber realignment, and mechanical properties of mature tendons. **Matrix Biology**, [s. l.], v. 64, n. class I, p. 81–93, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.matbio.2017.08.004>>

S. DURGAM, S.; C. STEWART, M. Tendon-derived progenitor cells: In vitro characterization and clinical applications for tendon repair. **Journal of Stem Cell Research and Medicine**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 8–17, 2016.

SALDIN, L. T.; CRAMER, M. C.; VELANKAR, S. S.; WHITE, L. J.; BADYLAK, S.

F. Extracellular matrix hydrogels from decellularized tissues: Structure and function. **Acta Biomaterialia**, [s. l.], v. 49, p. 1–15, 2017. a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2016.11.068>>

SANTOS, V. H.; PFEIFER, J. P. H.; DE SOUZA, J. B.; MILANI, B. H. G.; DE OLIVEIRA, R. A.; ASSIS, M. G.; DEFFUNE, E.; MOROZ, A.; ALVES, A. L. G. Culture of mesenchymal stem cells derived from equine synovial membrane in alginate hydrogel microcapsules. **BMC veterinary research**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 1-10, 2018.

SCHNABEL, L. V.; FORTIER, L. A.; WAYNE MCILWRAITH, C.; NOBERT, K. M. Therapeutic use of stem cells in horses: Which type, how, and when? **Veterinary Journal**, [s. l.], v. 197, n. 3, p. 570–577, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.04.018>>

SHOJAEE, A.; PARHAM, A. Strategies of tenogenic differentiation of equine stem cells for tendon repair: Current status and challenges. **Stem Cell Research and Therapy**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1–13, 2019.

SMITH, R. D. J.; CARR, A.; DAKIN, S. G.; SNELLING, S. J. B.; YAPP, C.; HAKIMI, O. The response of tenocytes to commercial scaffolds used for rotator cuff repair. **European Cells and Materials**, [s. l.], v. 31, p. 107–118, 2016.

SMITH, R. K. W. Mesenchymal stem cell therapy for equine tendinopathy. **Disability and Rehabilitation**, [s. l.], v. 30, n. 20–22, p. 1752–1758, 2008.

SMITH, R. K. W. Regenerative medicine in equine orthopaedics: what and when? **UK-Vet Equine**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 8–13, 2020.

SMITH, R. K. W.; KORDA, M.; BLUNN, G. W.; GOODSHIP, A. E. Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. **Equine Veterinary Journal**, [s. l.], v. 35, n. 1, p. 99–102, 2003.

SÖDERSTEN, F.; HULTENBY, K.; HEINEGÅRD, D.; JOHNSTON, C.; EKMAN, S. Immunolocalization of collagens (I and III) and cartilage oligomeric matrix protein in the normal and injured equine superficial digital flexor tendon. **Connective Tissue Research**, [s. l.], v. 54, n. 1, p. 62–69, 2013.

SOUZA-ARAÚJO ZN., C.; RODRIGUES TONETTI, C.; CARDOSO, M. R.; LUCCI DE ANGELO ANDRADE, L. A.; FERNANDES DA SILVA, R.; ROMANI FERNANDES, L. G.; GUIMARÃES, F. Three-Dimensional Cell Culture Based on Magnetic Fields to Assemble Low-Grade Ovarian Carcinoma Cell Aggregates Containing Lymphocytes. **Cells**, [s. l.], v. 9, n. 3, 2020.

SPANG, M. T.; CHRISTMAN, K. L. Extracellular matrix hydrogel therapies: In vivo

applications and development. **Acta Biomaterialia**, [s. l.], v. 68, p. 1–14, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.12.019>>

STEWART, A. A.; BARRETT, J. G.; BYRON, C. R.; YATES, A. C.; DURGAM, S. S.; EVANS, R. B.; STEWART, M. C. on Tendon Matrix. **Processing**, [s. l.], v. 70, n. 6, 2009.

TAN, Q.; LUI, P. P. Y.; RUI, Y. F.; WONG, Y. M. Comparison of potentials of stem cells isolated from tendon and bone marrow for musculoskeletal tissue engineering. **Tissue Engineering - Part A**, [s. l.], v. 18, n. 7–8, p. 840–851, 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**, [s. l.], v. 42, n. 2, p. 174–180, 2010.

USUNIER, B.; BENDERITTER, M.; TAMARAT, R.; CHAPEL, A. Management of fibrosis: The mesenchymal stromal cells breakthrough. **Stem Cells International**, [s. l.], v. 2014, 2014.

VAN LOON, V. J. F.; SCHEFFER, C. J. W.; GENN, H. J.; HOOGENDOORN, A. C.; GREVE, J. W. Clinical follow-up of horses treated with allogeneic equine mesenchymal stem cells derived from umbilical cord blood for different tendon and ligament disorders. **Veterinary Quarterly**, [s. l.], v. 34, n. 2, p. 92–97, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/01652176.2014.949390>>

YANG, G.; ROTHRAUFF, B. B.; LIN, H.; GOTTARDI, R.; ALEXANDER, P. G.; TUAN, R. S. Enhancement of tenogenic differentiation of human adipose stem cells by tendon-derived extracellular matrix. **Biomaterials**, [s. l.], v. 34, n. 37, p. 9295–9306, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.08.054>>

YIN, H.; CACERES, M. D.; YAN, Z.; SCHIEKER, M.; NERLICH, M.; DOCHEVA, D. Tenomodulin regulates matrix remodeling of mouse tendon stem/progenitor cells in an ex vivo collagen I gel model. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 512, n. 4, p. 691–697, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.03.063>>

YOSHIMURA, H.; MUNETA, T.; NIMURA, A.; YOKOYAMA, A.; KOGA, H.; SEKIYA, I. Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. **Cell and Tissue Research**, [s. l.], v. 327, n. 3, p. 449–462, 2007.

YOUNGSTROM, D. W.; LADOW, J. E.; BARRETT, J. G. Tenogenesis of bone marrow-, adipose-, and tendon-derived stem cells in a dynamic bioreactor. **Connective Tissue Research**, [s. l.], v. 57, n. 6, p. 454–465, 2016.