

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.

Autor: Fernanda de Castro Stievani

Data: 27 de outubro 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

Prof.^a Dra. Raquel Yvonne Arantes Baccarin

Membro

Departamento de Clínica Médica

FMVZ, USP, São Paulo

Prof.^a Dra. Carla dos Santos Riccardi

Membro

Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia

FCA, UNESP, Botucatu

Prof.^a Dr. Rogério Martins Amorim

Membro

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ, UNESP, Botucatu

Prof. Dr. Carlos Eduardo Fonseca Alves

Membro

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal

FMVZ, UNESP, Botucatu

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 Krieck, 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)

Lista de Abreviaturas

adCTM – Células tronco mesenquimais de origem de tecido adiposo	IL-6 - Interleucina 6
MEC – Matriz extracelular	COMP – Proteína de remodelamento anti-inflamatório
ECM – Extracellular matrix	tdCTM - células tronco derivadas de tendão
TFDS – Tendão flexor digital superficial	IL-10 – Interleucina 10
M0 – Momento duas horas após a bioimpressão	Triton X – 100 - t-octyl-phenoxypolyethoxyethanol
M1 – Momento 24 horas após a bioimpressão	SDS - Dodecil sulfato de sódio
M7 – Momento 7 dias após a bioimpressão	G' - Módulo de armazenamento
M14 – Momento 14 dias após a bioimpressão	G'' - Módulo de perdas
M21 – Momento 21 dias após a bioimpressão	PBS - Solução salina tampão
Glivre – Grupo de cultivo livre	Mili-Q - Água deionizada
Gtênsil – Grupo de cultivo fixo à plataforma de PDMS	SFB – Soro fetal bovino
Bgn - Biglican	H&E – Hematoxilina e eosina
Fmod - fibromodulin	MCL - Microscopia confocal a laser
Dcn - Decorin	MEV - Microscopia eletrônica de varredura
BMP12 - Proteína morfogenética óssea tipo 2	COL I - Colágeno Tipo 1
MHC II - Complexo Principal de Histocompatibilidade Classe II	COL III – Colágeno Tipo 3
TGFβ-1 - Fator de transformação do crescimento beta1	SCX – Sequência gênica da Scleraxis
IGF-I - Fator de crescimento semelhante à insulina - tipo 1	MHK – Sequência gênica da Mohawk
hCDT - células humanas de origem tendínea	TNC – Sequência gênica da Tenacin C
MMP3 - metaloproteinases tipo 3	BGN - Sequência gênica da Biglican
	DCN - Sequência gênica da Decorin
	COL1A1 - Sequência gênica do Colágeno tipo 1
	COL3A1 - Sequência gênica do Colágeno 3
	RUNX2 - Sequência gênica do fator de transcrição de osteogênese
	PDMS - Dimetil polissiloxano

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 consequentemente 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.

2. JUSTIFICATIVA

As lesões tendíneas estão entre as mais prevalentes em atletas humanos e equinos e em ambas as espécies a taxa de recuperação ainda é insatisfatória e as recidivas são frequentes. O reparo do tecido lesado se estende por até um ano com as técnicas utilizadas atualmente e quanto mais prolongado o processo mais baixas são as taxas de sucesso (PATTERSON-KANE; BECKER; RICH, 2012; ELIASSON et al., 2016). Dentre as lesões dos equinos de competição as de tendões e ligamentos podem corresponder 36% delas, levando muitas vezes ao afastamento da competição e até a eutanásia (SINGER et al., 2008). Até o momento as opções para tratamento de lacerações tendíneas em equinos envolvem basicamente a tenorrafia com a sutura das extremidades tendíneas com fios inabsorvíveis ou absorvíveis de longa duração (ADAIR; GOBEL; ROHRBACK, 1989) e imobilização do membro, seguida de reabilitação prolongada, que pode durar até um ano. As chances de sucesso são de apenas 45% quando os tendões flexores são envolvidos, levando com frequência à eutanásia do animal (BERTONE, 1995). Ainda que não seja possível a união das extremidades tendíneas, a sutura é recomendada para orientar o tecido cicatricial. Invariavelmente em casos de lacerações tendíneas o tecido de reparo tem menor elasticidade e pior organização e composição das fibras de colágeno do que o tendão hígido com apenas 18% dos animais acometidos retornando à atividade atlética pretendida (JANN, 2004).

Embora as lacerações tendíneas ainda apresentem prognóstico reservado, poucos estudos investigam o uso de biomateriais para melhorar o reparo tendíneo em equinos. Alternativas como pericárdio bovino e enxertos alogênicos de TFDS já foram testadas em muare como estratégias de reconstrução tecidual e, foi alcançada a produção de fibras de colágenos organizadas, porém, a imunogenicidade foi destacada como promotora de aderências peri-tendíneas no grupo alogênico e a biomecânica igual ao TFDS não foi alcançada (EL-SHAFAEY; KARROUF; ZAGHLOUL, 2013).

Considerando, portanto, a gravidade das lacerações tendíneas e demais enfermidades envolvendo os tendões flexores em equinos, novas estratégias devem ser investigadas para proporcionar melhor reparo tecidual, melhor função e consequentemente, melhor qualidade de vida e longevidade atlética. Adicionalmente, as estratégias e resultados obtidos do estudo da bioengenharia tendínea em equinos, podem ser extrapoladas para outras áreas do conhecimento.

3. HIPÓTESE

A matriz extracelular tendínea equina solubilizada em forma de hidrogel é aplicável à bioimpressão em modelo tridimensional tendíneo, é biocompatível com células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo equino *in vitro* e *in vivo*. O arcabouço é capaz de induzir a expressão tenogênica dessas células com produção de proteínas da matriz extracelular durante o cultivo.

4. OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver e caracterizar um biomaterial de origem de matriz extracelular tendínea equina para utilização como biotinta em bioengenharia tendínea.

4.1 Objetivos específicos

- Avaliação da descelularização, liofilização e solubilização de tendões flexores digitais superficiais de equinos como hidrogéis;
- Caracterização física, bioquímica, microestrutural e reológica do hidrogel de matriz extracelular descelularizada;
- Avaliação da capacidade de utilização do hidrogel como uma biotinta para processos de bioimpressões 3D;
- Avaliação *in vitro* e *in vivo* da biocompatibilidade do hidrogel após bioimpressão com células tronco mesenquimais de origem adiposa equina.
- Avaliação do potencial tenogênico da biotinta de matriz extracelular tendínea equina quando em cultivo com adCTM.

5. REVISÃO DE LITERATURA

5.1 Interação entre a matriz extracelular e a célula tendínea

A matriz extracelular (MEC) tendínea se modifica ao longo da vida, seja pela interferência da idade ou de lesões graves e leves nessas estruturas. Sabe-se que, com a idade, a concentração de água da MEC diminui e ao mesmo tempo o colágeno torna-se menos solúvel. Acredita-se que tal fato se deva ao incremento de ligações cruzadas intermoleculares, tornando-o também menos elástico e mais predisposto a lesões. Além da influência da idade, tendões com histórico de lesões apresentam maior proporção de colágeno tipo III ($\geq 5\%$) em sua composição quando comparados com tendões saudáveis (RILEY et al., 1994). Em um tendão saudável o seu interior é composto por mais de colágeno tipo I, sendo que o colágeno tipo III e o tipo IV devem ser encontrados em maior abundância apenas ao redor das fibras tendíneas, compondo o endotendão, tecido formador dos fascículos (DUANCE et al., 1977). Quando o interior do tendão é formado por fibras de colágeno tipo III, estas apresentam-se mais finas e com menos elasticidade (RILEY et al., 1994).

As moléculas de colágeno da MEC ligam-se entre tipos diferentes de colágenos. Assim, a proporção de tipos de colágeno e suas diferentes ligações conferem as características de cada tecido. As ligações entre colágenos tipo I resultam em uma fibra de maior diâmetro (média de 157 nm) sendo que ligações entre colágenos tipo V resultam em fibras de pequeno diâmetro (média de 25 nm). Como o colágeno pode fazer ligações entre os diferentes tipos, quanto maior a proporção, por exemplo, de colágeno tipo V em relação ao tipo I menores serão os diâmetros das fibrilas que podem variar entre 144 a 85nm de diâmetro (BIRK et al., 1990).

Biglican (*Bgn*), fibromodulin (*Fmod*) e Decorin (*Dcn*) são pequenos proteoglicanos altamente presentes em MEC de tendões saudáveis e possuem importância na qualidade da matriz, especialmente na organização e preenchimento das fibras colágenas pelo tendão. A ausência desses proteoglicanos pode afetar o equilíbrio e aumentar a concentração de proteína morfogenética óssea tipo 2 (BMP2) resultando em excesso de fosforilação de Smad1 e deposição de cálcio, resultando em calcificação no tendão (BI et al., 2007). Além disso foram descritos como essenciais para a formação adequada das fibras colágenas durante a formação do tendão (CORSI et al., 2002).

Dentre os componentes da matriz extracelular, os colágenos, mantêm íntimo contato com as células tendíneas, portanto, quando há deformação fisiológica (ex: contração muscular) desse tecido as células são capazes de aumentar ainda mais o contato

de sua membrana com a MEC pelos filamentos de actina associados à tropomiosina (fibras de estresse) e integrinas quanto com as células vizinhas através de proteínas de adesão (caderinas e vinculinas). As fibras de estresse permitem que as células tendíneas apresentem características contráteis (RALPHS; WAGGETT; BENJAMIN, 2002).

O contato entre as células tendíneas é mantido tanto de forma circunscrita (através de longos prolongamentos citoplasmáticos) quanto longitudinal (através de prolongamentos mais curtos), ao redor e ao longo de fibrilas de colágeno. As células emitem tais prolongamentos e se unem através de junções do tipo GAP permitindo a transmissão elétrica, química e de estímulos mecânicos (MCNEILLY et al., 1997; RALPHS; WAGGETT; BENJAMIN, 2002). *In vitro*, comprovou-se que os estímulos gerados na MEC influenciam diretamente na organização, formato e proliferação celular. Entretanto, estímulos mecânicos excessivos no tendão geram aumento da proliferação celular, diminuição do alongamento do seu núcleo e dos filamentos de citoplasmáticos de F-actina (FREEDMAN et al., 2018).

A contração muscular é responsável por parte da sinalização de diferenciação dos tenócitos e manutenção da MEC. Subramaniam e colaboradores demonstraram que com a paralisia muscular os tenócitos diminuem seus prolongamentos, porém, estes podem ser recuperados com o retorno da função muscular (SUBRAMANIAN et al., 2018). Igualmente importantes à mecanotransmissão para a manutenção da MEC e da função do tenócito são os fatores de crescimento.

No tecido tendíneo, após a lesão, assim como em outros tecidos, ocorre a fase inicial inflamatória, caracterizada por aumento do influxo celular e remodelamento da MEC acometida. A fase inflamatória é seguida pela fase proliferativa, com alta deposição de matriz, e finalmente pela fase de remodelamento, com a maturação do colágeno e organização de fibras. As células progenitoras do parênquima tendíneo e da vascularização do endotendão são responsáveis pela resposta celular nas fases iniciais de reparo. Portanto, pelas primeiras duas semanas após a lesão a expressão e produção de fatores de crescimento e MEC são concentradas no endotendão adjacente (DAHLGREN; MOHAMMED; NIXON, 2005a).

O aumento da vascularização proveniente do endotendão para a região central do tendão pode ser deletério à MEC dessa região. Wunderli e colaboradores (2019) estudaram a influência do oxigênio e elevação da temperatura em explantes tendíneos e associaram essas alterações ao aumento de proteases e perda progressiva do módulo elástico dos explantes. E adicionalmente, enfatizaram a possível correlação da condição

inflamatória da matriz com a ativação de expressão de Complexo Principal de Histocompatibilidade Classe II (MHC II) nos tenócitos (WUNDERLI et al., 2019). Portanto, mesmo que a vascularização seja um fenômeno essencial para o reparo da lesão, estratégias para controlar a inflamação mantendo o suporte celular e de MEC devem ser priorizadas.

Os fatores de crescimento presentes na MEC são importantes sinalizadores de reparo, entre eles o fator de transformação do crescimento beta1 ($TGF\beta$ -1) aumenta rapidamente durante a fase inflamatória inicial após lesão e se sobrepõe ao aumento de expressão gênica da matriz, influxo celular e de diferenciação celular no local da lesão (DAHLGREN; MOHAMMED; NIXON, 2005a). Além disso, o $TGF\beta$ também tem importante papel na projeção dos prolongamentos citoplasmáticos do tenócitos, e na ausência de fator de crescimento há diminuição dos tenócitos e seus prolongamentos, assim como ocorre na ausência da contração muscular (SUBRAMANIAN et al., 2018).

Por outro lado, o fator de crescimento semelhante à insulina - tipo 1 (IGF-I), uma proteína altamente presente em tendões saudáveis apresenta redução da sua expressão nas primeiras semanas após a lesão e possui um pico tardio (oito semanas após lesão) que corresponde com aumento de colágeno e glicosaminoglicanos (DAHLGREN; MOHAMMED; NIXON, 2005a).

Assim como demais tecidos, os tendões possuem células tronco adultas chamadas de células progenitoras de tendão, capazes de se renovarem e se diferenciarem em três linhagens mesenquimais (condrogênica, adipogênica e osteogênica), além de serem comprometidas com a linhagem tendínea com o papel de reposição de tenócitos e sinalizar em caso de lesão tendínea. Porém, se apresentam em pouca quantidade (aproximadamente 6% em animais jovens) e podem ser afetadas pelas alterações de MEC, com deposição de tecido conjuntivo fibroso, formando uma cicatriz e até calcificação comprometendo a função tendínea (BI et al., 2007).

5.2 A tenogênese

Durante o reparo de uma lesão tendínea, as células tronco nativas são muitas vezes ineficientes na reposição celular e de MEC (ANDARAWIS-PURI; FLATOW, 2018), por esse motivo alternativas vêm sendo estudadas dentro da bioengenharia, tanto no suporte de componentes de matriz e em sinalização quanto no fornecimento de fontes celulares externas para a obtenção de um reparo de melhor qualidade.

As células tronco são capazes de interagir com o meio onde se encontram, sinalizando para o meio onde estão e ao mesmo tempo respondendo aos estímulos presentes. Portanto, possuem a capacidade de receber um sinal e responder produzindo diferentes marcadores que influenciarão, por sua vez, nas características da matriz extracelular e nas demais células presentes pela sinalização parácrina. Células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (adCTMs) quando em co-cultura com células humanas de origem tendínea (hCDT), expressam marcadores de tenogênese enquanto modulam a ação das hCDT, melhorando as taxas de produção de colágenos e de deposição de matriz extracelular quando comparadas às culturas únicas de hCDT (COSTA-ALMEIDA et al., 2018).

Adicionalmente, *in vitro* as adCTMs puderam estimular a migração de tenócitos através de um explante acelular e até mesmo acelerar a proliferação tenocítica quando colocadas em co-cultura com tenócitos em pontos distantes do explante. Considerando, o baixo conteúdo celular do tendão e sua baixa taxa de proliferação, o uso de adCTMs em lesões tendíneas pode melhorar o reparo e a função tecidual com deposição de MEC de melhor qualidade e proliferação e migração de tenócitos para o local da lesão (LONG et al., 2018).

A influência positiva das adCTMs na sinalização do tecido tendíneo também já foi observada *in vivo*. O uso de adCTMs em lesões tendíneas induzidas em equinos gerou melhor deposição de colágeno tipo I, melhor alinhamento de fibras, diminuição de infiltrado inflamatório e vascularização e menor fibrose quando comparadas com o grupo controle. No mesmo estudo, o grupo que recebeu o tratamento adicionado de um protocolo de reabilitação com exercício controlado teve uma melhora mais significativa nesses parâmetros à avaliação histológica (CARVALHO et al., 2011).

Assim, além da modulação exercida pelas células tronco, os estímulos físico-químicos e mecânicos do meio também influenciam na deposição de matriz e na expressão celular tenocítica. *In vitro*, a presença de uma força de deformação intensa em um biomaterial muito macio induz a produção de metaloproteinases tipo 3 (MMP3) e interleucina 6 (IL-6) pelas células em cultivo, caracterizando uma resposta inflamatória ao estímulo naquele meio, o que não ocorre em um biomaterial com maior dureza (PATEL et al., 2018).

Essas características do arcabouço como a resistência, mas também a porosidade e contração, influenciam na manutenção da atividade metabólica dos tenócitos presentes no mesmo. Também, os tenócitos apresentam maior expressão de proteínas de MEC

(colágeno 1 A2, Colágeno 3 A1 e Decorin), maior expressão de marcadores de tenogênese (tenacin e scleraxis) e de remodelamento anti-inflamatório (COMP) quando o arcabouço apresenta poros de menor tamanho e maior dureza (maior formação de ligações cruzada entre fibrilas colágenas) e resistência à contração (GRIER; IYOHA; HARLEY, 2017), indicando a importância não só das células presentes no meio, mas também o meio onde se inserem no reparo adequado de uma lesão.

5.3 Bioengenharia Tendínea

O uso de hidrogéis como biomateriais para cirurgias reconstrutivas ou para promover regeneração de pele, por exemplo, vem sendo amplamente estudado nas últimas duas décadas. A possibilidade de ter um biomaterial líquido para ser implantado de forma minimamente invasiva para promover a regeneração de um tecido desperta a atenção. O uso de matriz extracelular para reconstrução tecidual já foi estudado para diversos tecidos, como, o trato urinário (FREYTES et al., 2008), cardíaco, esôfago (BADYLAK et al., 2005; GOLDFRACHT et al., 2019) e tecido musculoesquelético (YIN et al., 2013; CHEN et al., 2019; MCNULTY et al., 2020).

O baixo módulo de armazenamento dos biomateriais de matriz extracelular é uma importante limitação para seu uso em bioengenharia tendínea. Como a maioria dos hidrogéis de MEC são muito macios eles podem simular um ambiente inflamatório em vez de pró-regenerativo. Isso ocorre pois durante a fase inflamatória do reparo da lesão, o local se apresenta gelatinoso, macio, com coágulos sanguíneos e MEC desvitalizada (DAHLGREN; MOHAMMED; NIXON, 2005). Uma alternativa para melhorar o módulo elástico desses hidrogéis é simular a ação da enzima lisil oxidase - promotora de ligações covalentes entre fibrilas de colágeno no organismo –adicionando promotores químicos de ligações estáveis entre proteínas ou proteínas e cadeias peptídicas como EDC -N (3 – dimetilaminopropil) – hidrocloreto de N'- etilcarbodiimida e NHS – N – hidroxisuccinamida (SHEPHERD et al., 2015; AAMODT; GRAINGER, 2016; LIU et al., 2018).

No entanto, promotores químicos de ligações podem ter potencial citotóxico, diminuir a adesão celular e ainda causar resposta imunogênica do receptor (AHMAD et al., 2015). Recentemente o efeito de aumento das ligações cruzadas vem sendo testado de forma enzimática, com o uso da transglutaminase, uma enzima que depende de pH e temperatura para agir e é independente de catalisadores. Historicamente a transglutaminase é utilizada para conferir maior consistência em produtos alimentícios de

origem animal, aumentando a ligação entre as proteínas. Sua ação é na formação de ligações covalente entre o grupo amida de uma proteína ou de um peptídeo ligado a uma lisina ao grupo g-carboxamida de uma proteína ou a um peptídeo ligado à glutamina (TEIXEIRA et al., 2012). A citocompatibilidade dessa enzima foi testada em diferentes concentrações adicionadas a hidrogéis de gelatina, e observou-se melhor adesão celular, proliferação e morfologia tipo fibroblastóide de adCTMs quando aumentou-se a concentração de 4% para 8%, além de prolongar o tempo até a degradação do hidrogel (YANG et al., 2016).

Liu e colaboradores (2018) atribuíram escores de dureza para hidrogéis de gelatina baseados em seu módulo elástico, considerando baixo 2,4 KPa, médio 5,8 KPa e alto 20 KPa e encontraram que hidrogéis com dureza média e alta não só melhora a taxa de proliferação de células tronco derivadas de tendão (tdCTM), como também diminuem a possibilidade de diferenciação osteogênica e condrogênica dessas células. Além disso, a distribuição espacial das células e alongamento citoplasmático foram mais significativos em arcabouços com dureza média e alta (LIU et al., 2018).

A presença do arcabouço composto por ou componente semelhante à matriz extracelular pode por si só promover o aumento da expressão de fatores tenogênicos e de matriz tendínea por tdCTMs quando comparados ao cultivo em monocamada. E, quando esse arcabouço contendo células foi implantado no subcutâneo *in vivo*, promoveu formação de tecido tendíneo na região (após 8 semanas), o mesmo não ocorreu apenas com o arcabouço e apenas com as células (ZHANG; LI; WANG, 2011).

5.4 Resposta inflamatória aos biomateriais

A presença de um biomaterial no organismo ativa a resposta imune inata. Inicialmente, proteínas do hospedeiro (albumina, fibrinogênio, fibronectina, vitronectina, globulinas) vão para a superfície do biomaterial (adsorção) e dependendo da forma como elas se instalam na superfície, a resposta inflamatória pode ser exacerbada ou não. Dessa forma, a superfície do biomaterial é de extrema importância para a progressão de uma resposta inflamatória pró-resolutiva. Por exemplo, materiais que apresentem a superfície hidrofóbica alteram a conformação dessas proteínas induzindo a fagocitose (SHEIKH et al., 2015).

Após a adsorção dessas proteínas de adesão e outros componentes de matriz extracelular ao biomaterial, os macrófagos são atraídos para o local. A interação dos macrófagos com essas proteínas fará com que eles liberem quimiocinas, recrutando mais

células para o local, na tentativa de que a fagocitose seja alcançada. Biomateriais maiores do que 5 μm não podem ser fagocitados por um macrófago, e por esse motivo vários se fundem ao redor do biomaterial, em uma grande célula chamada célula gigante de corpos estranhos, e a consequência final desse evento é a formação de uma cápsula fibrosa que impede a integração com o tecido e perpetua a inflamação. No entanto, se os primeiros macrófagos tiverem boa conexão com as proteínas de adesão que foram inicialmente adsorvidas pelo material, estes poderão secretar citocinas anti-inflamatórias, como aIL-10 e atrair fibroblastos para o local, gerando remodelamento tecidual (SHEIKH et al., 2015; MARIANI et al., 2019).

A presença de um biomaterial oriundo de MEC pode modular a resposta do receptor, através da interação com os macrófagos, aumentando a expressão de macrófago do tipo 2 (pró-resolutivo), culminando com o reparo tecidual e finalização da resposta inflamatória. Estudos em camundongos mostraram que hidrogéis de MEC (submucosa intestinal e bexiga) e colágeno purificado induzem uma maior liberação de citocinas inflamatórias no tecido três dias após a aplicação, quando comparados à apenas a lesão cicatrizada sem biomaterial, por outro lado induziram maior expressão de IL-10 em estágios iniciais de reparo (1, 3 e 7 dias) quando comparados ao grupo controle, demonstrando uma resposta anti-inflamatória positiva. Tanto as lesões que receberam biomateriais quanto o controle apresentaram um fenótipo de macrófagos pró-resolutivo aos 28 dias (MEHRBAN et al., 2020). Considerando achados prévios com o uso de hidrogéis de MEC, o hidrogel de MEC tendínea possui elevado potencial de interação com macrófagos e indução de sua polarização em M2, de modo a desencadear uma resposta pró-resolutiva do processo.

5.5 Processos de produção de hidrogéis de MEC

O processo de descelularização da matriz é imprescindível para aplicação alogênica e até xenogênica, minimizando a resposta do hospedeiro. Para tendões de equinos dois protocolos de descelularização foram testados, analisando Dodecil sulfato de sódio (SDS), t-octyl-phenoxyethoxyethanol (Triton X - 100), congelamento e descongelamento (BURK et al., 2014). Ainda para tecidos tendíneos de outras espécies foi descrito o uso de DNases e tripsina para esse processo (NING et al., 2012; TOPRAKHISAR et al., 2018).

Para tendões de grandes proporções, como o TFDS equino, o protocolo mais eficiente é composto por cinco ciclos de descongelamento e congelamento com posterior

permanência em solução detergente de Triton X-100. Esse protocolo foi superior ao uso somente da solução detergente em minimizar componentes celulares dos fragmentos tendíneos. E também, apresentou melhor citocompatibilidade do que os fragmentos que passaram pela a solução detergente de SDS (BURK et al., 2014).

Todos os processos de descelularização descritos minimizam em menor ou maior grau a variedade de proteínas e glicosaminoglicanos quando comparados ao tecido inicial. O uso do SDS foi descrito como deletério com diminuição drástica de proteínas de membrana basal e matricel. As lamininas são especialmente afetadas, por vezes são totalmente excluídas do tecido após descelularização (GAETANI et al., 2018). As lamininas são glicoproteínas da MEC envolvidas na adesão celular, e a ausência delas pode interferir na interação da célula com o biomaterial (MINER; YURCHENCO, 2004).

Já uso do Triton X-100 foi deletério para os glicosaminoglicanos presentes no tecido causando diminuição em comparação às técnicas utilizando SDS (GAETANI et al., 2018). Por outro lado, esse detergente se demonstrou eficaz não só em eliminar os componentes celulares íntegros, como também reduzir o MHC na avaliação imunohistoquímica após descelularização do tecido aórtico, apresentando melhor compatibilidade quando aplicado de forma alogênica *in vivo* (MEYER et al., 2006).

Os colágenos da MEC descelularizada podem ser solubilizados através da digestão com pepsina em um meio ácido, isso porque, a pepsina desfaz as ligações de tripla hélice do tropocolágeno, tornando-o solúvel. Em condições ideais de pH (7,4) e temperatura (37°C) o colágeno solubilizado é capaz de se reaproximar em fibrilas semelhantes (espessura e comprimento) às anteriormente presentes na MEC, eliminando moléculas de água e formando um hidrogel. Essas ligações não são covalentes e podem se desfazer parcialmente, caso as condições de pH e temperatura se alterem (DE WILD; POMP; KOENDERINK, 2013).

Considerando a capacidade de automontagem do hidrogel de MEC, em condições consideradas fisiológicas este vem sendo utilizado de diversas formas: Injetável, pois, uma vez que está no hospedeiro (com pH 7,4 e temperatura próxima de 37°C, inicia o processo de formação de gel (FARNEBO et al., 2014); Também para a formação prévia de arcabouços que serão implantados como membranas (GOLDFRACHT et al., 2019); Como biotinta para bioimpressão (TOPRAKHISAR et al., 2018).

5.6 Bioimpressão 3D para lesões ortopédicas

O processo de bioimpressão utiliza a biotinta (i.e. material biocompatível, natural, sintético ou misto, carregado com células) para imprimir uma estrutura biofuncional para estudos *in vitro* ou reconstrução tecidual *in vivo*. O conceito de biotinta foi definido em 2018 e consiste em um biomaterial ou material biológico fluido contendo células, adequado para a bioimpressão. As biotintas devem apresentar características importantes, como: capacidade de ser impressa; biocompatibilidade; simular o tecido alvo; possuir integridade mecânica e estabilidade; e ainda ser bioabsorvível (ZHANG et al., 2018). Existem métodos diferentes de deposição da biotinta e bioimpressoras específicas para cada um. O método de extrusão consiste na aplicação de uma pressão constante sobre o êmbolo de uma seringa com eliminação de um filamento constante de biomaterial com células. A pressão pode ser exercida por uma coluna de ar (pneumática), por um pistão ou por uma rosca (extrusão direta). Existem ainda os métodos de jato de tinta que de forma elétrica formam-se bolhas de ar no interior da biotinta, eliminando gotículas do biomaterial. E ainda a bioimpressão a laser que o usa como fonte energética para eliminar a biotinta (LI et al., 2016).

A composição da biotinta varia de acordo com o tecido-alvo. No sistema locomotor foram utilizados componentes como policaprolactona com alginato (KUNDU et al., 2013) e fibrila de seda (DAS et al., 2015) para regeneração da cartilagem articular, colágeno e nano-hidroxiapatita para regeneração óssea (KERIQUEL et al., 2017) e alginato e fibrina com ou sem ácido hialurônico e colágenos para regeneração da pele em feridas extensas (HAKIMI et al., 2018). E, recentemente um hidrogel de matriz extracelular tendínea bovina foi utilizado como biotinta em uma avaliação de diferentes concentrações da mesma. Foi observado que as características reológicas do hidrogel variam de acordo com a concentração de MEC e tempo de digestão em pepsina (TOPRAKHISAR et al., 2018).

O uso de hidrogel apenas de colágeno já foi utilizado para bioimpressão, porém observou-se que esse componente puro apresenta características viscoelásticas e estabilidade baixas, além de demandar longo período até a gelificação, o que faz com que a estrutura impressa apresente muitos erros (WŁODARCZYK-BIEGUN; DEL CAMPO, 2017). As características viscoelásticas da solução antes do processo de impressão também são importantes, o módulo elástico ou de armazenamento (G') da solução pré-gel é um importante determinador do G' do gel após impressão, ou seja, quanto maior o G' da solução, maior será o do gel (DIAMANTIDES et al., 2017).

Sendo assim, a escolha do material para biotinta deve levar em conta além da biocompatibilidade, a capacidade de ser injetável e demais características reológicas do mesmo. A taxa de cisalhamento por exemplo é muito importante de ser avaliada, ela consiste na capacidade da solução de diminuir sua viscosidade, tornando-se quase líquido, quando uma pressão crescente é aplicada. Então, o ideal é que quanto maior a força exercida menor seja a viscosidade do material. Isso reflete diretamente na viabilidade celular, pois quanto menor a taxa de cisalhamento, menor a força que as células receberão do material e da parede da seringa durante a bioimpressão e maior será a viabilidade dessas células (BOULARAOUI et al., 2020).

Além da escolha do material a otimização do processo de bioimpressão é importante também para garantir a viabilidade das células e a impressão de boa qualidade. Por exemplo, a velocidade de extrusão, o tempo em que o material fica no interior da agulha que é o ponto de maior pressão, pode diminuir a viabilidade celular (PAXTON et al., 2017). E por fim o processo logo após a impressão também precisa ser otimizado. Alguns materiais necessitam um suporte de gelatina ou agarose onde serão impressos, que auxiliarão na manutenção da forma e na viabilidade celular. Após o tempo de cura do material esse suporte é removido parcial ou totalmente e meio de cultivo é adicionado. A agarose é eficaz quando utilizada como suporte, pois em forma fluida formam-se micro géis que são capazes de permanecer entre as camadas da biotinta formando um suporte até que a solidificação ocorra (COMPAAN; SONG; HUANG, 2019).

O banho de agarose ou o de gelatina são versáteis pois podem ser adicionados promotores de ligações cruzadas entre as fibras do biomaterial de MEC, por exemplo, ou CaCl_2 quando se utiliza o alginato, por exemplo. A promoção e aumento das ligações também pode ser alcançada, no caso de biomateriais de colágenos, com a transglutaminase. Esta é uma enzima que realiza ligações cruzadas entre proteínas e age como biocatalisador das reações entre as moléculas e intra-moleculares. Quando adicionadas nos hidrogéis de MEC são capazes de aumentar as características viscoelásticas e diminuir a degradabilidade sem interferir na biocompatibilidade (ZHAO et al., 2016).

Outros métodos promotores de ligações cruzadas como a utilização de luz ultravioleta são bastante utilizados para aumentar a resistência de materiais como polietilenoglicol e polimetacrilamida (ABBADESSA et al., 2016). Para biomateriais feitos de fibras de seda a sonicação e o uso da tirosinase também já foram descritos, antes da junção das células ao material (DAS et al., 2015).

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. **Heliyon**, 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.

▪ CAPÍTULO 2

Este trabalho será submetido ao periódico *Journal of Tissue Engineering* (Fator de impacto JCR 5,352), indexado em Pubmed e membro do *Committee on Publication Ethics* (COPE).

1. ARTIGO CIENTÍFICO

Hidrogel injetável de matriz extracelular tendínea equina como arcabouço natural para bioengenharia

Injectable hydrogel from equine tendon extracellular matrix as a natural scaffold for tissue engineering

STIEVANI, FERNANDA C., DOMINGUES, RUI, GOMEZ-FLORITZ, MANUEL, BAKHT, SYEDA M., PFEIFER, JOÃO P.H., ROSA, GUSTAVO S., APPOLONIO, EMANUEL V.P., ROSSI, MARIANA C., GOMES, MANUELA E., ALVES, ANA L.

G

RESUMO

O presente trabalho objetivou produzir e caracterizar um hidrogel de matriz extracelular tendínea equina, e avaliar a sua utilização como biotinta para bioimpressão e sua biocompatibilidade quando em cultivo com adCTM equinas *in vitro*. Na reologia os resultados foram compatíveis com a bioimpressão com a diminuição da viscosidade no teste do shear rate e a adição de transglutaminase no banho de agarose aumentou a capacidade de formação de gel da solução e conferiu mais resistência ao hidrogel. A avaliação microestrutural demonstrou maior quantidade de fibrilas no hidrogel com 2% de ECM e rede homogênea quando a transglutaminase foi adicionada. A bioimpressão em imersão de agarose foi satisfatória, resultando em hidrogel de boa qualidade e resistente ao cultivo de 7 dias. A viabilidade celular diminuiu de 87%, duas horas após impressão para 76%, 24 horas após impressão e se manteve durante os sete dias de cultivo. Pode-se concluir que o hidrogel de MEC tendínea equina tem características apropriadas para bioimpressão e apresenta boa biocompatibilidade após esse processo.

Key-words: tendon repair; biomaterial; stem cells; bioprinting

INTRODUÇÃO

Os tendões são estruturas responsáveis por transmitir o movimento da contração muscular a uma estrutura óssea. Além da transmissão da força, o tendão flexor digital superficial equino (TFDS) é capaz de sustentar o peso, armazenar e modular a energia proveniente do músculo, tendo importante papel na biomecânica do movimento (1).

Funcionalmente o TFDS se equivale ao tendão de Aquiles no homem, e ambos são importantes em lesões de atletas. Em cavalos puros sangue inglês de corrida, a prevalência de tendinites do TFDS varia de 11 a 30% (2). Como são estruturas mecanorresponsivas, cada tendão especificamente necessita do estímulo correto para produzir uma composição de matriz extracelular saudável e consequentemente exercer a sua função adequadamente.

O estímulo mecânico mais importante para manter a função do tecido tendíneo é a tração oriunda da contração muscular. Acredita-se que essa tração tenha importante papel em promover e manter o alinhamento e paralelismo das fibras colágenas (3). Embora o uso de células tronco para o tratamento de enfermidades tendíneas já seja realizado com bons resultados clínicos, muitas perguntas ainda devem ser respondidas para endossar o resultado com essa terapia celular. Portanto, dois grandes desafios permanecem na bioengenharia tendínea, desenvolver estratégias para induzir a diferenciação tenogênica de células tronco com origem não tendínea e conferir ao tecido neoformado a estrutura e organização tridimensional de um tendão saudável.

O uso de equinos para estudos translacionais na ortopedia já é bem descrito, porém apenas recentemente há esse foco 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 (4). As pesquisas de engenharia tendínea *in vitro* já comprovaram a importância do estímulo mecânico na matriz extracelular para promover a tenogênese e consequentemente a produção de colágeno Tipo I e a organização entre eles, por esse motivo a tenogênese *in vitro* ainda é um desafio.

O uso adequado de um arcabouço pode influenciar a sinalização parácrina das células presentes, auxiliando na diferenciação celular e na adequada produção de matriz extracelular e regeneração tendínea. O uso da forma geométrica adequada também auxilia a mimetizar o tecido alvo gerando respostas próximas à situação real. Embora os resultados sobre a interação do arcabouço com as células tronco mesenquimais ainda sejam preliminares, comprovou-se que co-cultivos de adCTM com células de explantes tendíneos apresentam diferenças, quando comparadas ao cultivo de adCTM puras, como o maior alongamento das células, característica desejável a um tecido tendíneo (5).

Uma alternativa para alcançar a regeneração tecidual é a bioimpressão, com biomateriais adequados em uma estrutura tridimensional específica para mimetizar o

tecido alvo. Biomateriais sintéticos servem como modelos estruturais para adesão celular, porém os biomateriais naturais como os de matriz extracelular (MEC) podem ser funcionais, além de estruturais, interagindo com as células (6). As células foram descritas como um material complexo, com características biomecânicas próprias e a resposta desse “material” depende da interação com o ambiente ao redor (7). Assim, a associação de MEC com células proporcionará características funcionais positivas ao biomaterial (8,9).

O hidrogel de MEC poderá ser aplicado no interior de lesões tendíneas circunscritas na forma injetável ou ainda após bioimpressão em reconstruções tendíneas em casos de rupturas parciais ou totais. Portanto, baseados na hipótese que a matriz extracelular tendínea equina descelularizada tem capacidade de ser bioimpressa e apresenta boa compatibilidade com células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo equino, o presente estudo objetivou desenvolver, caracterizar e testar como biotinta, um hidrogel oriundo da matriz extracelular tendínea equina solubilizada e avaliar sua biocompatibilidade com adCTM após bioimpressão. Para o conhecimento dos autores a matriz extracelular tendínea equina solubilizada não foi, até o momento, avaliada para bioimpressão.

MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento experimental

O presente estudo foi conduzido de acordo com as normas do Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista sendo aprovado sob número 0194/2019

O tendão flexor digital superficial equino foi assepticamente coletado, descelularizado, liofilizado, moído e esterilizado. Em seguida foi submetido à solubilização pela ação da pepsina e essa solução de MEC foi caracterizada na concentração de 1% e 2% de MEC quanto às características reológicas, bioquímicas e microestruturais. A reologia também foi realizada com a adição de promotor enzimático de ligação covalente às soluções. Na sequência a impressão em três dimensões dessa solução foi otimizada, estabelecendo-se a melhor concentração da solução de MEC, pressão de extrusão e velocidade de impressão para o processo. Então, a melhor solução foi adicionada a adCTM equina para o processo de bioimpressão 3D e posterior cultivo. Finalmente, a citocompatibilidade foi testada em três momentos; duas horas após a

impressão (M0), 24 horas após a impressão (M1) e sete dias após a impressão (M7) (Figura 1). Os experimentos ocorreram em triplicata.

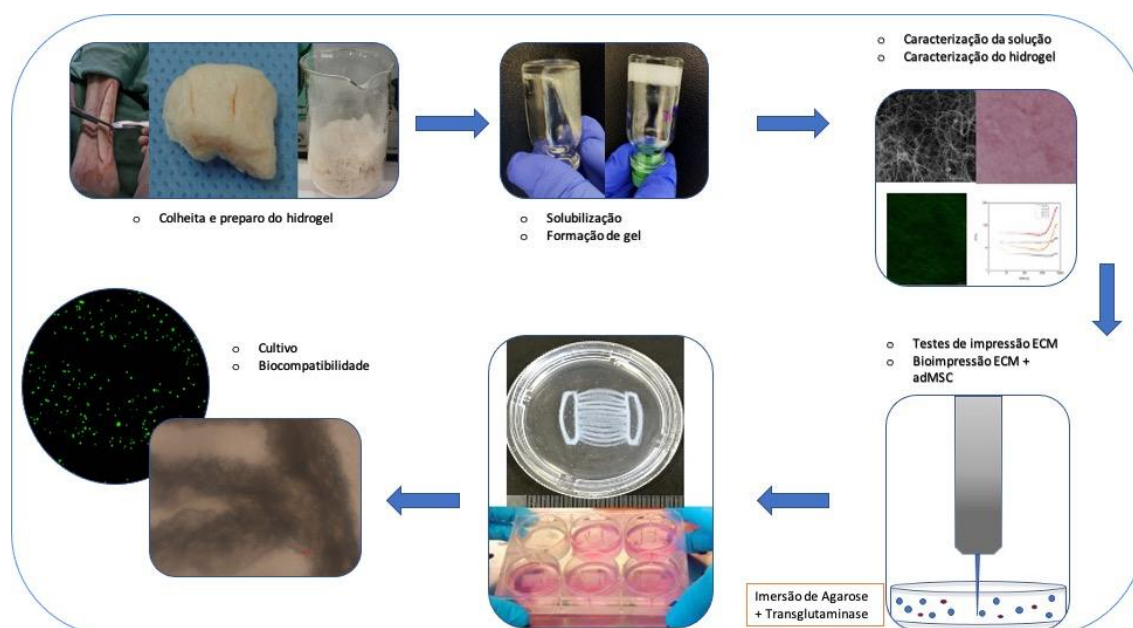


Figura 1: Demonstração da sequência dos processos realizados no estudo.

Preparo do hidrogel

Colheita do tendão equino

Os tendões flexores digitais superficiais (TFDS) de três equinos foram obtidos de animais submetidos à eutanásia por razões não sépticas e não que não envolveram o sistema musculoesquelético. Imediatamente após a eutanásia foram excisados cirurgicamente 10 cm do TFDS da região do metacarpo/metatarso de forma asséptica e imediatamente acondicionados em solução salina tampão (PBS) com antibiótico e antimicótico (PAA Laboratories, Waltham, Massachusetts - USA) a 1% por até 12 horas em geladeira. Na sequência foram dissecados para eliminação de tecido conjuntivo adjacente e fragmentados em 1cm para serem congelados a -80°C até a próxima etapa.

Descelularização do tendão

A descelularização dos fragmentos tendíneos foi realizada como o descrito por Burk (10). Inicialmente os fragmentos passaram por cinco ciclos de 2 minutos de congelação em nitrogênio líquido e descongelação por 10 minutos em PBS. Após esse processo foram acondicionados em água deionizada (Mili-Q) por 48 horas e sequencialmente incubados por 48 horas em Tris buffer (pH 7.6) com Triton X-100 a 1% sob constante agitação a 37°C. Por fim, foram lavados duas vezes por 15 minutos em PBS e incubados em meio de cultivo (DMEM 0.1% glicose, 10% soro fetal bovino (SFB), 1%

penicilina-estreptomicina e 0.1% gentamicina) por 12 horas e depois mais 12 horas em PBS a 37°C, e então foram acondicionados a -80°C para liofilização. A avaliação da descclularização foi realizada por coloração de hematoxilina e eosina (H&E) realizada em três fragmentos tendíneos após descclularização.

Liofilização, moagem e esterilização

Após a descclularização a liofilização foi realizada em um ciclo de 100 horas (Christ Gamma 2-16 LSC) a fim de sublimar o conteúdo de água dos fragmentos sem danificar a estrutura. Posteriormente, os fragmentos foram moídos em moinho de facas (Marconi MA 048) até que o pó passasse pelo filtro fino (0,5 mm), formando a matriz extracelular descclularizada. Na sequência, esta foi esterilizada em óxido de etileno e armazenada a - 20°C para posterior uso.

Solubilização e Formação de gel

A digestão de MEC a 2% (20mg/mL) foi realizada com 0,2% de pepsina (SIGMA – P7000) em HCl 0.02M a um pH de 2,2 por 48 horas. Após esse período o pH da solução foi neutralizado (7.4) adicionando-se 0,2M de NaOH (1/9 do volume inicialmente digerido) e 10x PBS (1/10 do volume final neutralizado) em banho de gelo (11).

Foi realizado o teste de injeção por agulha com pressão manual com os calibres 24G, 22G e 21G, a fim de determinar o calibre mais adequado para a bioimpressão. A gelificação foi confirmada pela inversão do frasco após 2 horas a 37 °C.

Composição Bioquímica

Para caracterização de colágenos e glicosaminoglicanos totais foram realizadas colorações *Sirius Red Fast Green* (9046, Chondrex, Inc) e *Alcian blue* (Merck Millipore) respectivamente nos hidrogéis de 2% de MEC após 40 minutos de gelificação a 37 °C. As colorações foram realizadas conforme orientação do fabricante. Como controle negativo foi utilizada a agarose também após polimerização.

A fim de observar as fibrilas colágenas de diferentes espessuras foi realizada a coloração de Picro Sirius #EP-11-20011 (Easy Path Diagnósticos, Indaiatuba, SP, Brasil) tanto no hidrogel após gelificação quanto após impressão do material sem células. As estruturas foram incluídas em blocos de parafina e seccionadas em 4µm de espessura, para posteriormente serem corados com Picro Sirius de acordo com as especificações do fabricante. Um corte longitudinal de tendão hígido foi utilizado como controle positivo pela mesma coloração. As lâminas foram avaliadas por microscópio de luz polarizada (LEICA DM4000 B LED) para de forma qualitativa observar as diferentes espessuras das

fibrilas de colágenos. Sendo verdes para fibrilas mais finas e alaranjadas e vermelhas para fibrilas mais espessas (12).

Caracterização Reológica

As características viscoelásticas das soluções de MEC e dos hidrogéis foram avaliadas pelo reômetro Knexus Pro (MAL1097376). Foram realizados os testes de taxa de cisalhamento, varredura da frequência e tensão de cisalhamento, demonstrando os diferentes valores dos módulos de armazenamento (G') e de perdas (G'') das diferentes composições e sua resistência à deformação.

O teste de taxa de cisalhamento (*shear rate*) foi realizado com as soluções de 1% e 2% de MEC sem a adição de transglutaminase a uma velocidade crescente de 0,01 a 1000 s^{-1} e as viscosidades foram computadas. Essas soluções também passaram pela avaliação de G' e G'' em relação à alteração de frequência (*Frequency sweep*) de 10 a 0,1 Hz por minuto, com porcentagem de deformação (1%), distância entre as placas (1mm) e temperatura constante (37 °C). Adicionalmente, os G' médios das soluções 1 e 2% de MEC a 37°C foram determinados (n=2).

As soluções de 1% e 2% de MEC com 1% transglutaminase foram avaliadas quanto ao G' e G'' ao longo do tempo após estabilização a 37 °C com deformação constante de 1% e frequência de 1,6 Hz por 167 minutos, até atingirem um platô de estabilidade.

Os módulos dos hidrogéis de 1% de MEC com e sem transglutaminase com 24 horas de incubação a 37 °C foram computados com a força de deformação aplicada em porcentagem até atingirem o ponto de inversão entre G' e G'' .

Caracterização microestrutural

Foram caracterizados hidrogéis com 1% e 2% de MEC pela microscopia confocal a laser (MCL), e na microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram avaliados hidrogéis com 2% de MEC avaliou-se a presença ou não de transglutaminase no banho de agarose. Os hidrogéis foram mantidos a 37°C por 24 horas até o momento da avaliação.

Microscopia confocal a laser

Para avaliação da fibrilação do colágeno com fluorescência própria foi utilizado o microscópio LEICA, TCS SP8, dos hidrogéis de 1% e 2% de MEC.

Microscopia eletrônica de varredura

Para avaliação por MEV as amostras de hidrogel passaram por um processo de desidratação em crescentes concentrações de etanol (5 % - 10% - 25% - 50% - 70% - 80% - 90% - 95%- 100%) por 25 minutos em cada, depois foram para a secagem em ponto

crítico (Autosamdri-815 - Series A, Tousimis) por 2 horas. A avaliação morfológica e do diâmetro das fibrilas, bem como da formação de porosidade foi mediante uso do detector de elétrons secundários (MP1000001280128, JEOL) com energia de 15 kV.

Impressão do hidrogel

O método de impressão de camada em camada em imersão de agarose foi utilizado. Foi utilizada a bioimpressora com extrusão pneumática BioEx (CellInk®, Boston, EUA) com cabeçote de extrusão sem alteração de temperatura de cartuchos e mesa. Para determinação da melhor solução para bioimpressão, foram testadas as concentrações de soluções de MEC a 1% e 2% sem a presença de células, com diferentes pressões de extrusão pneumática (3, 5 e 8 kPa) com agulha 25G e a estrutura de melhor qualidade de impressão foi considerada. Para evitar interrupção do fluxo pela agulha durante a impressão após a neutralização as soluções foram centrifugadas (4 °C, 4000 rpm por 5 minutos) e o sedimento foi descartado. As impressões foram realizadas em imersão, em banho de nanopartículas de agarose, e após a identificação da melhor solução para impressão, foi avaliada a adição ou não de 1% de transglutaminase à imersão de agarose.

Para isso, uma solução de 0,5% de agarose e 0,1% de Cloreto de Cálcio em Milli-Q foi autoclavada e ainda quente colocada em agitação a 700 rpm até o arrefecimento. Posteriormente foi armazenada de forma estéril a 4 °C até a utilização (não ultrapassando uma semana).

Imediatamente antes dos testes de impressão, 1% de transglutaminase (ACTIVA® wm, Ajinomoto) diluída em Milli-Q (concentração da solução mãe de 200 mg/mL) foi acrescida ao banho de agarose e homogeneizadas por 15 minutos.

Um modelo tridimensional simulando um tendão (*gcode*) foi criado para que fosse possível a avaliação de camadas paralelas de hidrogel com células, sendo essas camadas fixas nas extremidades a camadas de hidrogel perpendiculares a elas (Figura 2).

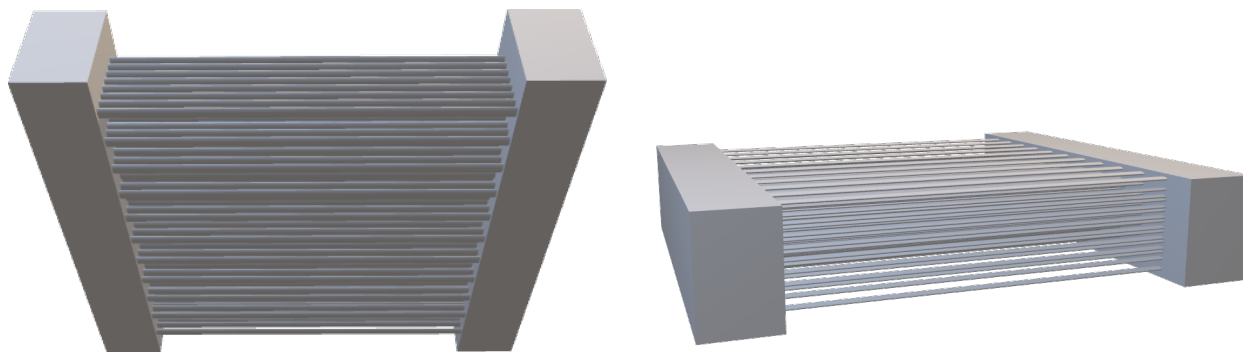


Figura 2. Modelo tridimensional criado para impressão com o objetivo de simular fibras tendíneas paralelas seguras por duas extremidades perpendiculares a elas.

Avaliação de biocompatibilidade *in vitro*

Fonte celular

Foram utilizadas adCTM equinas do banco de células do laboratório 3B's da Universidade do Minho, Portugal.

As células foram descongeladas em P4 e cultivadas em monocamada aderidas ao plástico em meio de cultivo DMEM F12 GLUTAMAX (Termo fisher) com 10% de SFB (SIGMA-ALDRICH) e 1% de antibiótico e antimicótico, com trocas a cada 3 dias, permaneceram em estufa com 5% de CO₂ até atingirem 95% de confluência em garrafas de 175 cm² para utilização para bioimpressão.

Bioimpressão

Após neutralização e centrifugação da solução de 2% MEC, a mesma permaneceu a temperatura de 4 °C até a adição das adCTM para evitar o início da gelificação. As células foram tripsinizadas por 5 minutos, depois foi adicionado de meio de cultivo com 10% SFB para inibir a ação da tripsina. Após a primeira centrifugação, as células foram ressuspensas em PBS (1X), contadas, fracionadas e passaram por nova centrifugação. Foram adicionadas 1x10⁶ células para cada mililitro de solução pré-gel de modo que cada estrutura impressa apresentasse aproximadamente 250.000 células.

Após a adição das células à solução esta se tornou mais viscosa e a pressão de impressão precisou ser ajustada para 10 kPa para evitar entupimento da agulha e comprometimento da qualidade da impressão.

Após a impressão as estruturas foram imediatamente incubadas a 37°C por duas horas. Após duas horas de formação de gel o banho de agarose e transglutaminase foi retirado e substituído pelo meio de cultivo. O meio de cultivo foi trocado pela primeira vez após 24 horas e em intervalos de 72 horas nas trocas subsequentes.

Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi avaliada duas horas após a impressão, (M0), 24 horas após a impressão, (M1) e após 7 dias, (M7). A técnica de coloração com calceína AM (C1359 SIGMA-ALDRICH) e Iodeto de propídio (SIGMA-ALDRICH) foi utilizada para quantificação de células e avaliação da viabilidade celular. Após lavagem do arcabouço duas vezes com meio de cultivo sem SFB, a solução de 0,1 nmol de calceína diluída em meio de cultivo sem SFB foi adicionada até recobrir a estrutura. Foi então incubada no escuro a 37 °C por 15 minutos e lavada uma vez com PBS. Na sequência adicionou-se 1,0 µL/mL de iodeto de propídio diluído em PBS por 10 minutos. As estruturas foram imediatamente avaliadas por MCL (LEICA, TCS SP8) em uma faixa de $\lambda = 494-517$ nm para calceína (fluorescência em verde) e $\lambda = 535-617$ nm para iodeto de propídio (fluorescência em vermelho). A avaliação da viabilidade celular pelas imagens foi realizada pelo software Image J, com o comando de separação de canais e contagem de partículas dos canais vermelho (iodeto de propídio) e verde (calceína), e as porcentagens foram consideradas. Foram realizadas avaliações em triplicatas de cada momento e realizadas 5 avaliações de cada imagem pelo Image J, sendo que a média das avaliações e das imagens de cada momento foi considerada.

Análise estatística

Até o momento foi realizada análise estatística dos resultados parciais. Após avaliação da normalidade pelo ensaio de Shapiro wilk, a distribuição dos valores de viabilidade não foi considerada normal, então foram realizados os testes de Friedman e Wilcoxon para avaliar a diferença ao longo dos momentos considerando significância com $P < 0,05$. Foi utilizado o software Statistica 10.0 para as análises estatísticas e Origin Pro 2018 para geração dos gráficos.

RESULTADOS

Preparo do hidrogel

Descelularização do tendão

O processo de descelularização foi confirmado pela coloração de hematoxilina e eosina com ausência da coloração pela eosina (Figura 3). Observou-se também perda estrutural parcial com separação das fibras em alguns pontos.

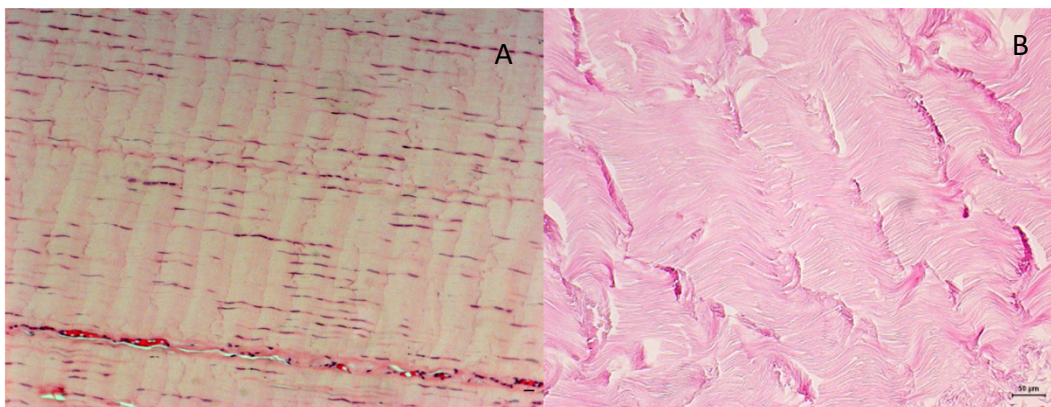


Figura 3. Coloração de hematoxilina e eosina de A. Tendão hígido; B. de um fragmento tendíneo após o processo de descclularização. Nota-se ausência de coloração por hematoxilina, indicando ausência de células (escala de 50µm).

Solubilização e Formação de gel

Após o processo de solubilização da MEC com pepsina, a solução resultante se apresentou altamente viscosa e translúcida, porém facilmente aspirada por uma agulha 21G. Após o processo de neutralização tornou-se turva e esbranquiçada, sendo possível realizar sua aspiração apenas por uma agulha 18G. Ao teste de injeção por uma agulha com pressão manual houve interrupção do fluxo quando agulhas de 22G e 25G foram utilizadas. Por esse motivo a etapa de centrifugação prévia ao processo de bioimpressão foi adicionada.

Após 2 horas a 37°C as soluções se apresentavam esbranquiçadas e após 24 horas foram facilmente manipuladas (Figura 4).

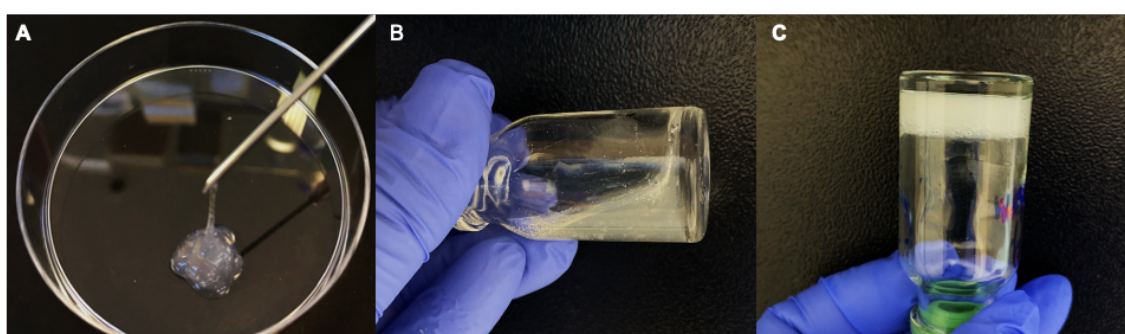


Figura 4. A teste de capacidade de injeção por uma agulha com pressão manual da solução viscosa após a neutralização; B solução de 2% MEC após a neutralização sob refrigeração; C formação de gel esbranquiçado após 2 horas a 37°C.

Composição bioquímica

Com a caracterização bioquímica até o momento foi possível identificar presença apenas de proteínas colágenas no hidrogel, marcadas pela coloração rósea da imagem corada por sirius red fast green e ausência de coloração verde, observada apenas

na gelatina. Também foi possível fazer a coloração com alcian blue e observou-se pouca coloração, com pontos mais fortes por maior absorção de corante pelo hidrogel (Figura 5).

Na avaliação por microscopia de luz polarizada da coloração de Picro Sirius observou-se no hidrogel predominância de fibrilas colágenas menores e intermediárias, caracterizadas pela coloração verde e amarela e pouca quantidade de fibrilas da coloração rosa (Figura 6-A). Já no material após a impressão em imersão de agarose com transglutaminase observou-se predominância de fibrilas marcadas por alaranjado e vermelho, indicando maior espessura destas e pouca quantidade de fibrilas marcadas por verde e amarelo (Figura 6-B). No corte histológico do tendão hígido observou-se predominância de fibrilas mais espessas, marcadas em vermelho (Figura 6-C).

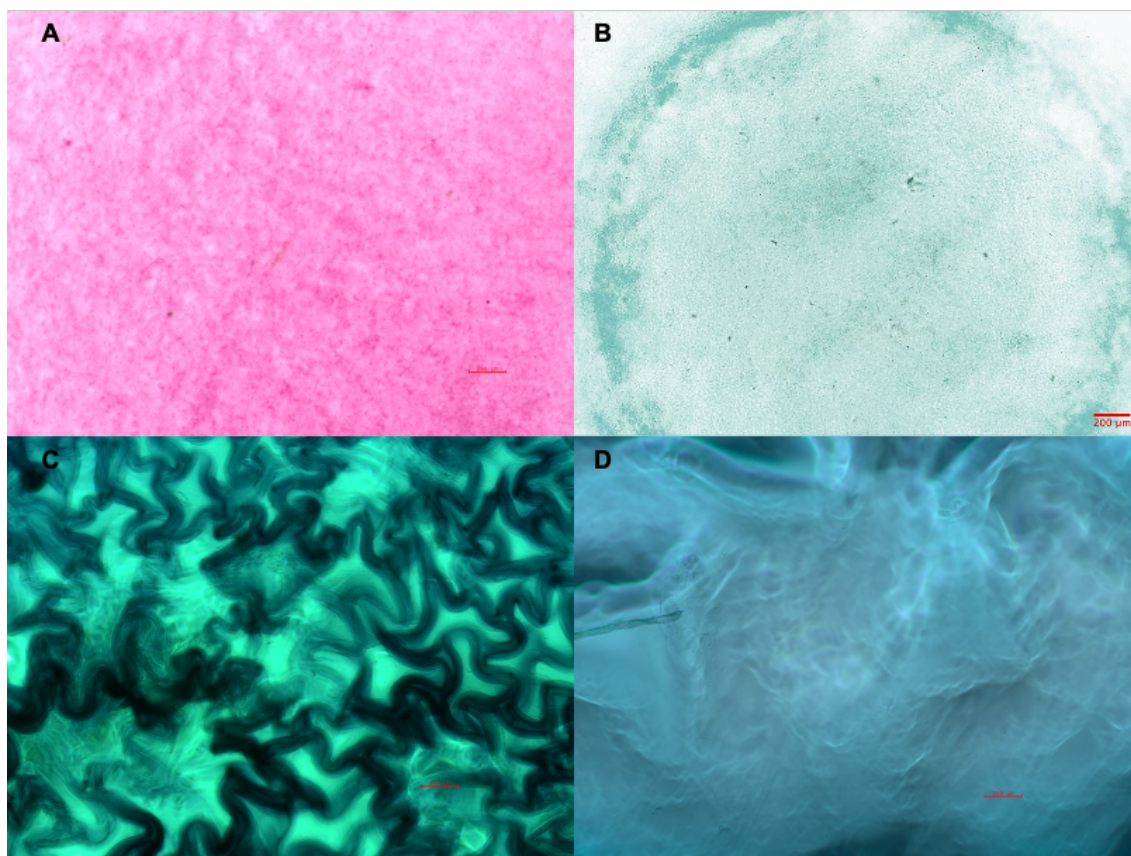


Figura 5. **A** Coloração de Sirius Red Fast Green do hidrogel 2% MEC e **B** Coloração de Alcian Blue do hidrogel 2% MEC; **C** e **D** são controles negativos de Sirius Red Fast Green e Alcian Blue respectivamente em gel de agarose. Escala de 200 µm.

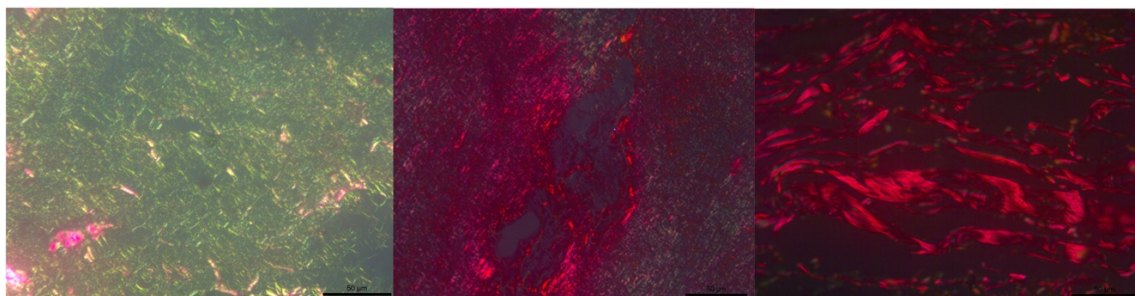


Figura 6. Coloração de Picro Sirius. **A** Hidrogel após gelificação; **B** Hidrogel após impressão em banho de agarose com transglutaminase; **C** Tendão hígido. Escala de 50 μ m.

Caracterização Reológica

Os testes de taxa de cisalhamento versus viscosidade 1 e 2% de MEC demonstraram que as viscosidades das duas soluções foram inversamente proporcionais ao aumento da taxa de cisalhamento. E embora a viscosidade inicial da solução de 2% de MEC fosse maior, com 10s⁻¹ obteve viscosidade mínima. Já o hidrogel de 1% de MEC chegou à viscosidade mínima antes de 1s⁻¹ e com o aumento da taxa houve pequeno aumento da viscosidade (Figura 7 A).

O teste de varredura de frequência (*frequency sweep*) das soluções de 1% e 2% de MEC, com frequência de 10 a 0,1 Hz com porcentagem de deformação (1%), distância entre as placas (1mm) e temperatura (37 °C constantes) demonstrou aumento do G' das duas soluções com o aumento da frequência.

G' médio (n=2) computado a 37°C foi maior na solução de maior concentração (2%) de MEC (46,95 $\pm$ 2,12) em relação à de 1% de MEC (21,2 $\pm$ 1,63) (Figura 6 C).

Os G' e G'' das soluções de 1% e 2% de MEC com 1% de transglutaminase foram computados a 37°C por 10000 segundos para observar a formação do gel a partir da solução. Os G' e G'' demonstraram uma fase de estabilidade seguida de aumento progressivo, sendo o hidrogel a 2% após 21 minutos com aumento constante até G' = 590 Pa e o 1% MEC com ligeiro aumento após 47 minutos com G' máximo = 27,9 Pa (Figura 7 D).

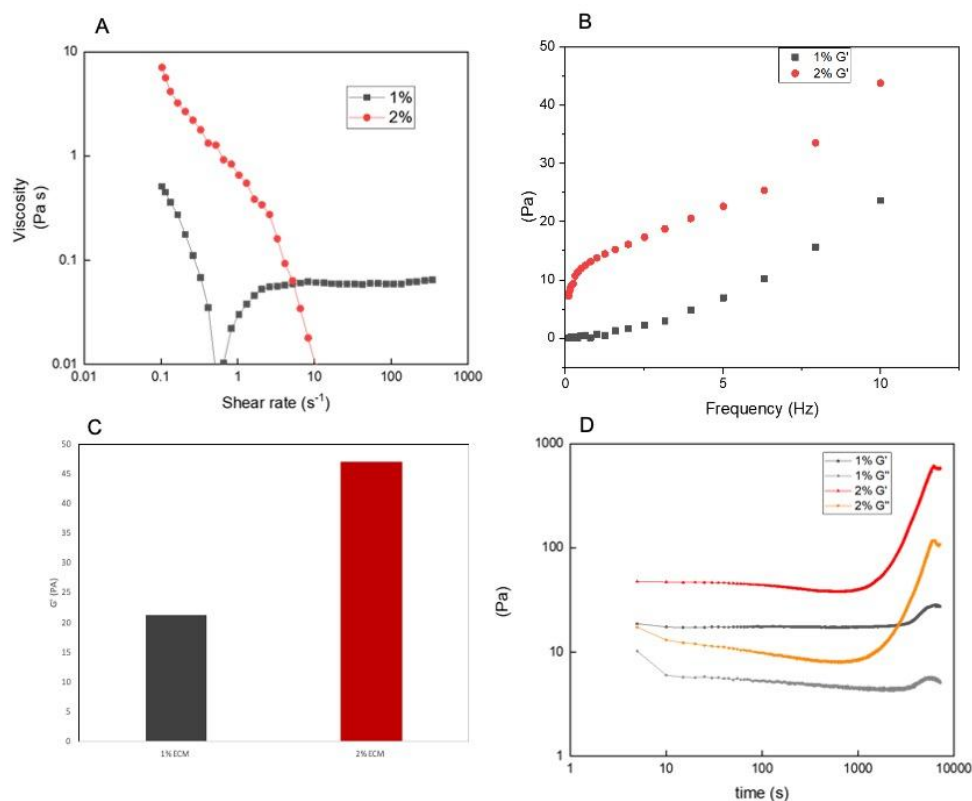


Figura 7: Reologia das soluções **A:** Taxa de cisalhamento das soluções a 1% (cinza) e 2% (vermelho) de ECM; **B:** Varredura da frequência das soluções 1% (cinza) e 2% (vermelho) de ECM, demonstrando o módulo de armazenamento com a alteração da frequência em Hertz, com distância entre placas constante (1mm) e temperatura constante (37°C); **C:** Média do módulo de armazenamento das soluções 1 e 2% de ECM (G') a 37°C; **D:** Aumento dos módulos de armazenamento (G') e de perda (G'') das soluções 1 e 2% de ECM com transglutaminase ao longo do tempo à temperatura de 37°C.

As características viscoelásticas do hidrogel de 1% de MEC após 24 horas em incubação a 37°C foi avaliada com e sem a adição de transglutaminase ao meio de agarose. Observou-se aumento da resistência à deformação aplicada (Shear strain %) e de G' e G'' no grupo contendo transglutaminase (Figura 8). O aumento da resistência do hidrogel com transglutaminase foi evidenciada pelo atraso da inversão do módulo de perdas (G'') com módulo de armazenamento (G') de 79% para 126% de força de deformação.

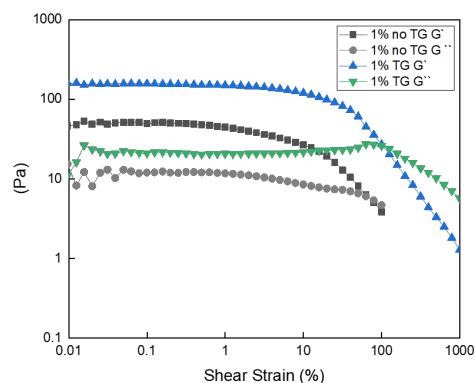


Figura 8. Módulos (G' e G'') dos hidrogéis (Pa) de 1% MEC com e sem transglutaminase (TG) sob força de deformação em porcentagem.

Caracterização Microestrutural

Microscopia Confocal a laser

À avaliação por microscopia confocal a laser da fibrilação colágena dos hidrogéis contendo 1% e 2% de MEC foi possível observar maior número de fibras colágenas, dispostas em uma malha mais densa e mais organizada na amostra contendo 2% de MEC (Figura 9).

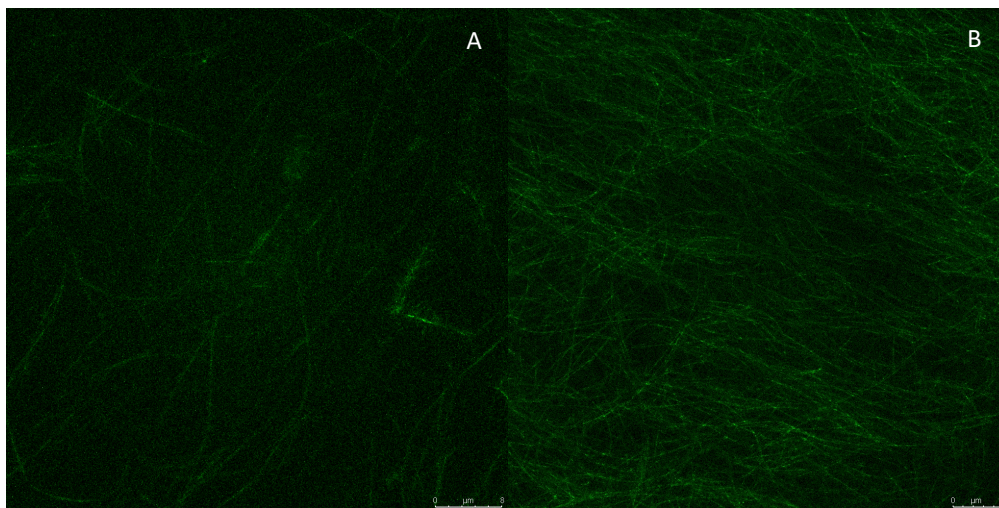


Figura 9. Microscopia confocal a laser da autofluorescência do colágeno. hidrogéis com 1% de MEC (A) e B: hidrogel com 2% de MEC.

Microscopia eletrônica de varredura

Na avaliação das imagens de MEV observou-se formação heterogênea de poros no hidrogel sem transglutaminase e feixes aglomerados de fibrilas de colágenos. Em contrapartida, o hidrogel que continha transglutaminase no banho de agarose demonstrou

distribuição homogênea das fibrilas e porosidade com uma malha aparentemente mais densa (Figura 10).

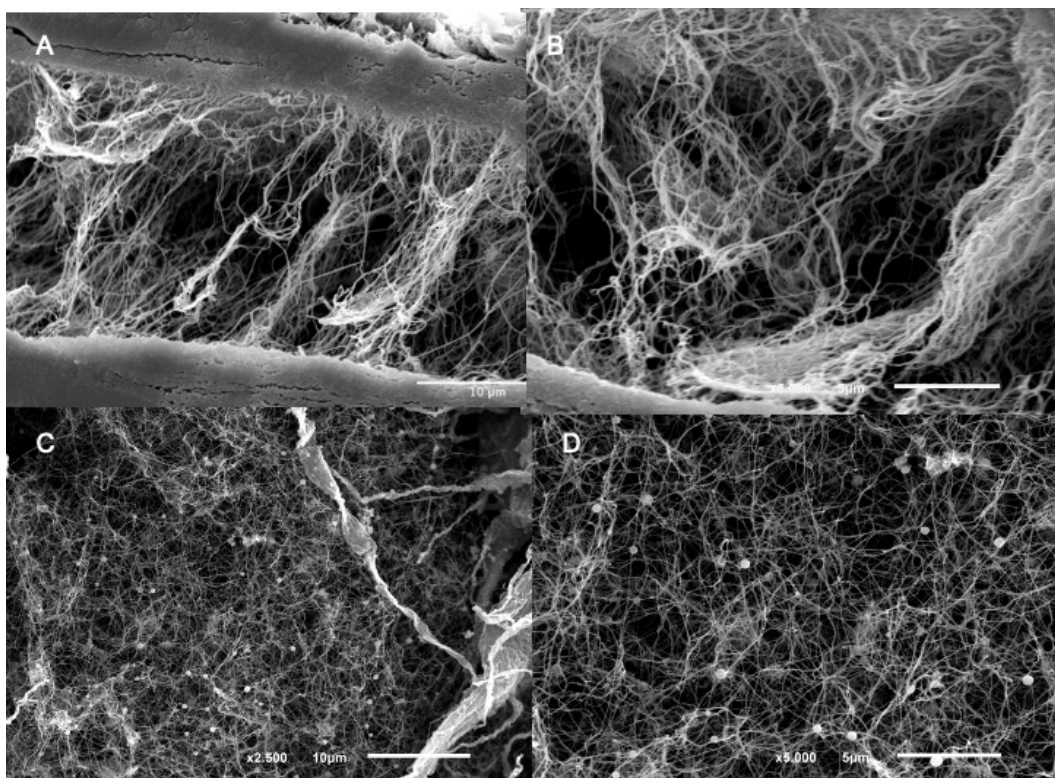


Figura 10. A e B são imagens de microscopia eletrônica de varredura de hidrogéis impressos sem transglutaminase no banho de agarose em aumentos de 2500x e 5000x e escalas de 10 µm e 5 µm respectivamente. C e D são hidrogéis impressos em banho de agarose com adição de transglutaminase em aumentos de 2500x e 5000x e escalas de 10 µm e 5 µm respectivamente.

Impressão do hidrogel

Os testes de impressão foram realizados com as soluções de 1 e 2% de MEC sem a presença de células nas pressões de extrusão de 3, 5 e 8 kPa a uma velocidade de 10m/s. Sob pressão de 3KPa todos os hidrogéis ficaram frágeis e com baixa qualidade de impressão. Dentre as outras pressões testadas, a de 5 kPa foi a de melhor qualidade para a solução de 1% MEC e a de 8kPa a que melhor imprimiu o hidrogel de 2% MEC. O hidrogel de 2% MEC foi considerado o melhor em qualidade de impressão e o mais resistente para manipulação, portanto foi utilizado nos testes seguintes para avaliar a influência da transglutaminase na qualidade de impressão e resistência do hidrogel à manipulação após duas horas da bioimpressão.

Portanto, foi adicionada a transglutaminase (1%) à agarose refrigerada, imediatamente antes da impressão, e para esse teste foi utilizado o código criado para simular o tendão. As estruturas que continham transglutaminase no banho de agarose ficaram com melhor qualidade após a impressão, foram mais resistentes à manipulação

para troca de agarose por meio de cultivo duas horas após a impressão e permaneceram com boa resistência e formato após 24 horas em incubação a 37 °C (Figura 11).

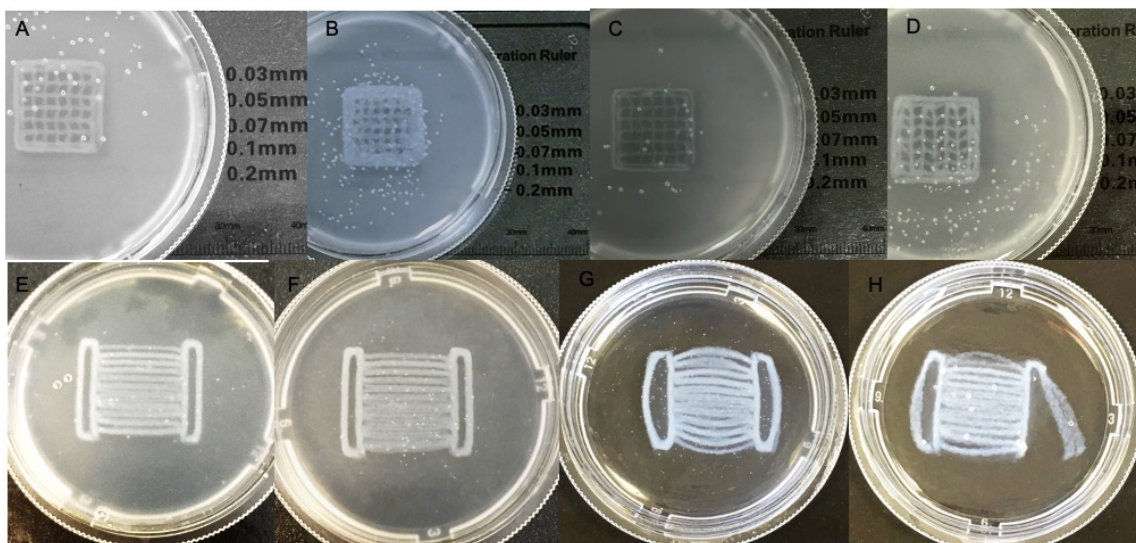


Figura 11. A e B hidrogéis de 1% MEC com 5 e 8 KPa de pressão; C e D hidrogéis de 2% MEC com 5 e 8KPa de pressão respectivamente. E e F são hidrogéis de 2% MEC logo após a impressão, sendo E com e F sem transglutaminase adicionada ao banho de agarose, respectivamente. G e H são os mesmos hidrogéis de E e F após 24 horas de permanência em estufa a 37 °C.

Avaliação de biocompatibilidade *in vitro*

Durante todo o cultivo (7 dias) as estruturas foram avaliadas a cada três dias no microscópio óptico invertido para observar morfologia celular e presença de contaminação e nessa avaliação permaneceram com formato globóide desde a impressão até o vigésimo primeiro dia de cultivo e permaneceram sem contaminação.

A distribuição das células pelo hidrogel foi avaliada apenas em M0, quando pode-se observar uma distribuição regular pelas camadas tanto na profundidade quanto no comprimento da estrutura (Figura 12).

Na avaliação ao microscópio óptico invertido foi possível observar células aderidas ao fundo da placa ao décimo dia de cultivo, momento também em que a observação celular no hidrogel ficou mais clara.

A avaliação da viabilidade no Image J demonstrou viabilidade celular média após duas horas da impressão (M0) de $86,21 \pm 4,9\%$. Após 24 horas de impressão (M1) a viabilidade diminuiu para $77,26 \pm 10,67\%$ e em M2 a média de viabilidade das células foi de $72,42 \pm 11,93\%$. Foi observada diferença estatística da viabilidade entre M0 e M1 ($P = 0,0066$) e entre M0 e M7 ($P = 0.034$), indicando menor número de células viáveis

em M1 e M7 quando comparados a M0. Quando comparados M1 e M7 o número de células viáveis não foi diferente.

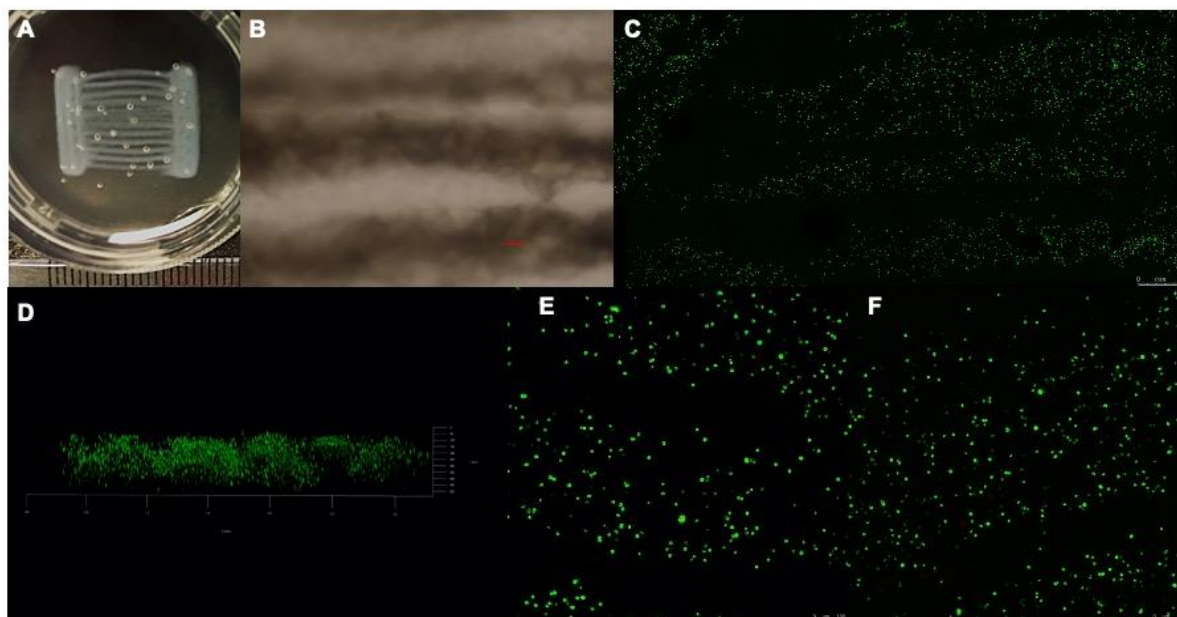


Figura 12: Avaliação da bioimpressão e viabilidade celular. (A) Estrutura bioimpressa com 25% de preenchimento nas barras laterais; (B) Microscopia eletrônica invertida do hidrogel em M7 escala = 200 μm ; (C) MCL de células marcadas com calceína e iodeto de propídio, evidenciando a distribuição das células no comprimento das faixas paralelas de hidrogel; (D) distribuição homogênea das células na profundidade do hidrogel, escala eixo z = 0 – 500 μm e eixo y = 0 – 3 μm ; (E) Teste de viabilidade com calceína (verde) e iodeto de propídio (vermelho) em M0, escala de 0 a 100 μm ; (F) Teste de viabilidade celular em M7, escala de 0 a 100 μm .

Discussão

O presente estudo caracterizou e investigou o potencial de bioimpressão e biocompatibilidade *in vitro* de um hidrogel de matriz extracelular tendínea equina descelularizada para uso como arcabouço em bioengenharia. O material contendo adCTM foi impresso com boa qualidade usando a técnica de impressão em imersão em gel de agarose com transglutaminase. Tendo em vista a boa viabilidade celular apresentada, não foi necessária a utilização de cartucho ou mesa aquecidos. Além de boa capacidade de bioimpressão, o hidrogel demonstrou também biocompatibilidade quando em cultivo até sete dias com adCTM.

Inúmeros estudos avaliaram métodos de descelularização para diferentes tecidos, como cardíaco, pancreático, bexiga, entre outros (13)(14)(15)(16), com todos os processos envolvendo o uso de soluções hipotônicas e detergentes para atingir a descelularização. A descelularização de tendões de grande calibre foi avaliada por diferentes técnicas para extrair a MEC e concluiu-se que o uso do Triton – 100X após ciclos de congelamento e descongelamentos é o processo mais eficaz para eliminar

componentes celulares desses tecidos (10). Com o uso desta técnica o presente trabalho demonstrou a eficácia da descelularização pela ausência de coloração de componentes celulares em lâminas de H&E.

No entanto, sabe-se que o uso do Triton – 100X minimiza a concentração de importantes componentes da matriz extracelular, tanto de proteínas não colágenas responsáveis pela adesão celular como proteoglicanos e glicoproteínas (14). Até o momento, pela utilização do *Sirius red fast green* pode-se observar grande quantidade de proteínas colágenas, porém o uso de métodos como a espectrometria de massas é desejável para explorar a permanência de demais proteínas e determinar com precisão os tipos de colágenos presentes.

A adição da transglutaminase ao banho de agarose foi benéfica para a manutenção estrutural macroscópica do hidrogel, bem como para o aumento nos módulos elástico e viscoso do mesmo. Também conferiu melhor homogeneidade das fibrilas colágenas com menor distância entre elas e melhor distribuição dos poros por toda a superfície, resultando em uma malha mais densa de colágeno. Biomateriais com menor tamanho de poros e maior resistência são aliados na expressão de fatores de diferenciação tenogênica (scleraxis) quando em cultivo com tenócitos, pois resistem à contração induzida por essas células, funcionando como estímulo mecânico. Por outro lado, arcabouços com poros grandes e maior distância entre as fibras sofrem maior contração durante o cultivo com tenócitos, que passam a expressar em maior quantidade, marcadores de metaloproteinases tipos 1, 3 e 13, indicando alta atividade de remodelamento (17).

Embora haja a necessidade de desenvolver um hidrogel com alto módulo de armazenamento e consequentemente alta resistência à contração, existe também a preocupação com a passagem do pré-gel pela agulha durante a bioimpressão ou injeção. A taxa de cisalhamento avalia essa característica, através da aplicação de uma deformação progressiva no material enquanto sua viscosidade é medida. Esse teste pode ser extrapolado para supor a força exercida no interior da agulha quando a pressão é aplicada para bioimpressão. É necessário que os materiais, para serem biotintas, apresentem uma diminuição homogênea da viscosidade conforme a taxa de deformação progressiva é aplicada, conferindo extrusão homogênea e menor pressão nas células (18). No presente trabalho a solução de 2% de MEC apresentou a melhor taxa de cisalhamento para a aplicação em bioimpressão, uma vez que a solução de 1% de MEC teve diminuição abrupta e depois leve aumento da viscosidade.

O G' da solução pré-gel permite prever a capacidade de bioimpressão da mesma, sendo importante adotar medidas para aumentar o G' antes de realizar a impressão, como por exemplo, aumentando a concentração de fibras no hidrogel ou promovendo ligações cruzadas (19). A solução de 2% de MEC apresentou G' maior do que a solução de 1% de MEC e, além de corroborar os resultados do estudo citado, também justifica a escolha por utilizá-la na bioimpressão.

A queda significativa na viabilidade celular entre M0 e M1 indica que esta diminuição ocorreu em decorrência do processamento inicial para a produção do arcabouço. A queda na viabilidade observada de M0 (87%) para M1 (76%) pode ser atribuída ao estresse térmico da adição das células ao hidrogel refrigerado, tendo em vista que outras variáveis como o calibre da agulha utilizada (25 G) ou a pressão de extrusão (10 KPa) já foram comprovados como não redutores da viabilidade nessas proporções (20)(18). A osmolaridade do ácido utilizado para digestão também pode ser um fator importante de queda na viabilidade celular (21). Baseando-se na ausência de diferença estatística na viabilidade celular entre o M1 e o M7, podemos inferir que o material apresentou boa biocompatibilidade, possibilitando a interação entre as células e o meio, de modo a manter as células vivas por até 7 dias.

Outro estudo utilizando MEC tendínea como arcabouço observou a viabilidade celular de 75% no primeiro dia após bioimpressão, que se manteve até o terceiro dia, corroborando os resultados de nosso estudo (22). No entanto, quando a fonte de MEC utilizada foi de tecido adiposo, cardíaco ou cartilagem a viabilidade ficou próxima a 90% após bioimpressão (9). No presente estudo foi possível realizar a bioimpressão de um hidrogel com características reológicas adequadas para a distribuição homogênea de células por toda a sua estrutura, apesar da viabilidade diminuir nas primeiras horas após a bioimpressão, esta manteve-se adequada por até sete dias.

No décimo dia de cultivo observou-se células aderidas ao fundo da placa de cultivo, indicando a capacidade de migração das células do hidrogel para o meio externo e a capacidade do hidrogel em manter as células no interior da sua malha fibrosa por período prolongado. O retardo na migração celular pode ser atribuído à densidade das fibras do hidrogel, associada à sua melhor organização e resistência, conferidas pela transglutaminase. Estudos comprovaram a migração de células tronco, após a aplicação, do tecido onde foram aplicadas para a circulação sistêmica e para outros tecidos lesados do organismo (23). Assim, a permanência mais prolongada das células tronco no local da

lesão é importante para manter sua sinalização parácrina e obtendo seu efeito biológico, auxiliando no processo de reparo tecidual.

Estudos subsequentes de engenharia tecidual utilizando hidrogéis de MEC em condições *in vivo* são extremamente desejáveis. Visando aprofundar a gama de conhecimento existente através da avaliação do conjunto de eventos transcorridos em um ambiente cuja constante flutuação metabólica o torna único, apresentando uma complexidade de reações irreprodutível *in vitro*.

CONCLUSÃO

Pode-se concluir que o hidrogel de matriz extracelular tendínea equina possui características reológicas, bioquímicas e microestruturais que permitem qualidade na bioimpressão e biocompatibilidade adequada *in vitro*, demonstrando a possibilidade de aplicação *in vivo* para avaliar a resposta do hospedeiro e a regeneração tecidual resultante.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa concedida, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo Processo: 2017/12815-0, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) e ao Programa CAPES-PRINT.

Referências

1. Thorpe CT, Clegg PD, Birch HL. A review of tendon injury: why is the equine superficial digital flexor tendon most at risk? *Equine Vet J* [Internet]. 2010 Mar [cited 2011 Jul 21];42(2):174–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20156256>
2. Patterson-Kane JC, Becker DL, Rich T. The Pathogenesis of Tendon Microdamage in Athletes: The Horse as a Natural Model for Basic Cellular Research. *J Comp Pathol*. 2012;147(2–3):227–47.
3. Gonçalves AI, Rodrigues MT, Gomes ME. Tissue-engineered magnetic cell sheet patches for advanced strategies in tendon regeneration. *Acta Biomater*. 2017;63:110–22.
4. Hillmann A, Ahrberg AB, Brehm W, Heller S, Josten C, Paebst F, et al. Comparative Characterization of Human and Equine Mesenchymal Stromal Cells: A Basis for Translational Studies in the Equine Model. *Cell Transplant*. 2016;25(1):109–24.

5. Costa-Almeida R, Calejo I, Reis RL, Gomes ME. Crosstalk between adipose stem cells and tendon cells reveals a temporal regulation of tenogenesis by matrix deposition and remodeling. *J Cell Physiol.* 2018;233(7):5383–95.
6. Mironov V, Visconti RP, Kasyanov V, Forgacs G, Drake CJ, Markwald RR. Organ printing: Tissue spheroids as building blocks. *Biomaterials.* 2009;30(12):2164–74.
7. Kasza KE, Rowat AC, Liu J, Angelini TE, Brangwynne CP, Koenderink GH, et al. The cell as a material. *Curr Opin Cell Biol.* 2007;19(1):101–7.
8. Saldin LT, Cramer MC, Velankar SS, White LJ, Badylak SF. Extracellular Matrix Hydrogels from Decellularized Tissues: Structure and Function. *Acta Biomater* [Internet]. 2018;49:1–15. Available from: file:///C:/Users/Carla Carolina/Desktop/Artigos para acrescentar na qualificação/The impact of birth weight on cardiovascular disease risk in the.pdf
9. Pati F, Jang J, Ha DH, Won Kim S, Rhie JW, Shim JH, et al. Printing three-dimensional tissue analogues with decellularized extracellular matrix bioink. *Nat Commun.* 2014;5.
10. Burk J, Erbe I, Berner D, Kacza J, Biol D, Kasper C, et al. Freeze-Thaw Cycles Enhance Decellularization of Large Tendons. 2014;20(4):276–84.
11. Farnebo S, Woon CYL, Schmitt T, Joubert L-M, Kim M, Pham H, et al. Design and Characterization of an Injectable Tendon Hydrogel: A Novel Scaffold for Guided Tissue Regeneration in the Musculoskeletal System. *Tissue Eng Part A.* 2014;20(9–10):1550–61.
12. Rich L, Whittaker P. Collagen and picrosirius red staining: a polarized light assessment of fibrillar hue and spatial distribution. *J Morphol Sci.* 2005;22(2):97–104.
13. Singelyn JM, DeQuach JA, Seif-Naraghi SB, Littlefield RB, Schup-Magoffin PJ, Christman KL. Naturally derived myocardial matrix as an injectable scaffold for cardiac tissue engineering. *Biomaterials.* 2009;30(29):5409–16.
14. Gaetani R, Aude S, DeMaddalena LL, Strassle H, Dzieciatkowska M., Wortham M, et al. Evaluation of different decellularization protocols on the generation of pancreas-derived hydrogels. *Tissue Eng - Part C Methods* [Internet]. 2018;24(12). Available from: doi: 10.1089/ten.TEC.2018.0180
15. Freytes DO, Martin J, Velankar SS, Lee AS, Badylak SF. Preparation and rheological characterization of a gel form of the porcine urinary bladder matrix.

- Biomaterials. 2008;29(11):1630–7.
16. Vishwakarma SK, Sarwar S, Adil MAM, Khan AA. Biofabrication of cell-laden allografts of goat urinary bladder scaffold for organ reconstruction/regeneration. *Tissue Cell*. 2020;67(September).
 17. Grier WK, Iyoha EM, Harley BAC. The influence of pore size and stiffness on tenocyte bioactivity and transcriptomic stability in collagen-GAG scaffolds. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2017;65:295–305.
 18. Paxton N, Smolan W, Böck T, Melchels F, Groll J, Jungst T. Proposal to assess printability of bioinks for extrusion-based bioprinting and evaluation of rheological properties governing bioprintability. *Biofabrication* [Internet]. 2017;9(4):44107. Available from:
<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L622913577%0Ahttp://dx.doi.org/10.1088/1758-5090/aa8dd8>
 19. Diamantides N, Wang L, Pruiksma T, Siemiatkoski J, Dugopolski C, Shortkroff S, et al. Correlating rheological properties and printability of collagen bioinks: The effects of riboflavin photocrosslinking and pH. *Biofabrication*. 2017;9(3).
 20. Williams LB, Russell KA, Koenig JB, Koch TG. Aspiration, but not injection, decreases cultured equine mesenchymal stromal cell viability. *BMC Vet Res*. 2016;12(1).
 21. Zhao F, Cheng J, Zhang J, Yu H, Dai W, Yan W, et al. Comparison of three different acidic solutions in tendon decellularized extracellular matrix bio-ink fabrication for 3D cell printing. *Acta Biomater*. 2021;131:262–75.
 22. Toprakhisar B, Nadernezhad A, Bakirci E, Khani N, Skvortsov GA, Koc B. Development of Bioink from Decellularized Tendon Extracellular Matrix for 3D Bioprinting. *Macromol Biosci*. 2018;18(10):1–12.
 23. Burk J, Berner D, Brehm W, Hillmann A, Horstmeier C, Josten C, et al. Long-term cell tracking following local injection of mesenchymal stromal cells in the equine model of induced tendon disease. *Cell Transplant*. 2016;25(12):2199–211.

CAPÍTULO 3

Artigo científico a ser submetido para o periódico *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, com fator de impacto JCR 5,8. As imagens serão inseridas ao longo do texto para facilitar a leitura.

TENOGENESE APÓS BIOIMPRESSÃO DE MATRIZ EXTRACELULAR TENDÍNEA EQUINA COM CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS.

Running title: Tenogênese após bioimpressão de matriz extracelular

TENOGENESIS AFTER EQUINE TENDON EXTRACELLULAR MATRIX BIOPRINTING WITH ADIPOSE TISSUE MESENCHYMAL STEM CELLS.

Running Title: Tenogenesis after extracellular matrix bioprinting

STIEVANI, F.C.; APPOLONIO, E.V.; ROSA, G.S.; PFEIFER, J.P.H.; ALTHEMAN, V.; FONSECA-ALVES, C.E.; DOMINGUES, R.; GOMES, M.E.; ALVES, A.L.G.

RESUMO

A dificuldade de regeneração tendínea desperta a necessidade de desenvolver técnicas inovadoras de bioengenharia para o tratamento das tendinopatias. A união de um arcabouço composto de matriz extracelular, organizado com células com capacidade tenogênica como as células tronco mesenquimais de origem de tecido adiposo (adCTM) através da bioimpressão é uma técnica promissora para alcançar o reparo do tecido tendíneo. O presente trabalho objetivou avaliar uma biotinta de matriz extracelular tendínea equina adicionada de adCTM equinas quanto à viabilidade, expressão celular, e produção de matriz *in vitro*, além de biocompatibilidade desse composto quando implantado *in vivo*. Foi realizada a bioimpressão do hidrogel de matriz extracelular tendínea equina e foram avaliados cultivos com as estruturas fixas (Gtênsil) ou livres (Glivre) por 21 dias. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de Calceína e Iodeto de propídio após 24 horas (M1), e 7 e 14 dias (M7 e M14) da bioimpressão. Os bioimpressos foram cultivados e avaliados quanto à expressão gênica celular em M0 (duas horas após a impressão) e M21 (21 dias de cultivo) de Gtênsil e Glivre. A produção de matriz extracelular (colágeno I e colágeno III) foi quantificada por imunohistoquímica. Também foi analisada a biocompatibilidade da estrutura após implantação cirúrgica na região sub-fascial do músculo esplênio de um equino por avaliação histológica de biópsias realizadas 30 dias após o implante. Observou-se manutenção da viabilidade celular ao longo dos momentos 1, 7 e 14. Também foi observada maior organização do arcabouço e paralelismo das fibras colágenas no Gtênsil após 21 dias de cultivo em relação aos demais grupos. As células do Gtênsil expressaram significativamente os marcadores de tenogênese Mohawk e Tenascina C e os genes de matriz extracelular Decorin, Biglycan, Col I e Col III, além de significativa produção de proteínas da matriz extracelular. Foi observada a tenogênese e organização do arcabouço no Gtênsil e Glivre, no entanto, foi observada uma notória superioridade com a fixação das extremidades da

estrutura, facilitando a contração celular e promovendo força tênsil contrária à essa contração. Os resultados deste estudo sugerem que a biotinta de matriz extracelular tendínea equina, quando utilizada com adCTM equinas, foi capaz de promover a expressão de genes de tenogênese e produção de proteínas da matriz extracelular, além de manter a viabilidade das células, tornando-se uma potencial estratégia para o tratamento de lesões tendíneas.

Keywords: Tissue engineering; Tenogenesis; bioink; tendon regeneration; hydrogel

INTRODUÇÃO

A laceração tendínea é uma enfermidade que acomete equinos e homens com consequências graves para a funcionalidade do tendão, pois a porcentagem de retorno à atividade atlética é de apenas 18% após o reparo de uma lesão tendínea, compreendendo um índice de bom prognóstico muito baixo (1). O tratamento cirúrgico das lacerações, para ambas as espécies, não se modificou muito ao longo dos anos consistindo em tenorrafia seguida de imobilização prolongada da região (2–4). Em equinos, a imobilização permanece até a formação do tecido de reparação no local da tenorrafia, possibilitando o apoio do peso do animal, e só então inicia-se a movimentação do local com o protocolo de reabilitação do tecido.

Sendo assim, a fisioterapia na reabilitação de lesões tendíneas é de suma importância, pois busca estabelecer a funcionalidade ao tecido de reparo, conferindo mais elasticidade e força minimizando as aderências e promovendo melhor alinhamento das fibras tendíneas, proporcionando ao paciente um retorno mais rápido duradouro às suas atividades. O protocolo de fisioterapia para recuperação dessas lesões pode durar de algumas semanas até mais de um ano, dependendo do animal e da extensão da lesão e, a função da estrutura pode não ser totalmente restabelecida. (5,6).

Considerando a baixa habilidade regenerativa do tendão, vêm se estudando terapias com técnicas inovadoras que busquem a bioengenharia tecidual, aliando o uso de células tronco mesenquimais a arcabouços associados a fatores de crescimento, para promover melhor sinalização celular e expressão gênica melhorando a produção de matriz extracelular (7). A medicina veterinária está avançando no processo de conhecimento e domínio de novas técnicas de terapia regenerativa. Em equinos, o uso de células tronco mesenquimais de origem de tecido adiposo já foi comprovada como benéfica ao reparo tendíneo de lesões induzidas experimentalmente (8,9), e também é utilizada em casos clínicos selecionados com bons resultados (10). Porém, para a utilização em lacerações tendíneas e lesões extensas é necessário o uso de um arcabouço que permitirá a

manutenção das células no local (11) em um ambiente propício para sua sinalização parácrina (12) no local da lesão.

A bioengenharia com as estratégias de bioimpressão permite a estruturação do formato tridimensional dos bio-compostos e da disposição celular (13). O material utilizado para confecção da biotinta interfere diretamente na sinalização celular e a utilização de biotintas provenientes de matriz extracelular estão sendo descritas para o tecido cardíaco (14), vascular (15), renal (16), hepático (17) e cartilágneo (18). Recentemente a capacidade de bioimpressão da matriz extracelular tendínea bovina (19) e murina foi investigada (20) através de análises reológicas, caracterizações, citocompatibilidade, e expressão gênica e em ambos os resultados foram promissores.

A utilização da matriz extracelular proveniente do tecido alvo, comprovou-se vantajosa em infiltração e sinalização celular e também em modulação da resposta inflamatória *in vivo* (21). Baseado na hipótese de que a biotinta de matriz extracelular tendínea é capaz de induzir a sinalização de tenogênese às células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (AdCTM) o presente trabalho objetivou avaliar a biocompatibilidade da biotinta de matriz extracelular tendínea equina descelularizada *in vitro* e *in vivo* bem como, avaliar a organização e produção de matriz extracelular e expressão gênica de marcadores tendíneos quando em cultivo com adCTM equinas de forma livre ou fixos sob tensão.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi conduzido de acordo com as normas do Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista sendo aprovado sob número 0194/2019.

Delineamento experimental

A biotinta foi preparada de acordo com o método previamente descrito no capítulo 2. Foram adicionadas adCTM equina na concentração de 1×10^6 células/mL, e as estruturas foram impressas por bioimpressora de extrusão direta. A avaliação *in vitro* de viabilidade celular foi determinada nos momentos 24 horas, 7 e 14 dias de cultivo. Deste ponto em diante foram avaliadas duas formas de cultivo distintas, sendo uma com as estruturas fixas em uma superfície de dimetil polissiloxano (PDMS), permitindo uma força contrária à contração celular, chamado assim de Gtênsil ou em suspensão em placas de petri (Glivre). O cultivo foi mantido por 21 dias e as estruturas foram avaliadas quanto

à microestrutura, pela organização das fibras colágenas, produção de colágeno tipo I e tipo III, por ensaio de imunohistoquímica e por expressão gênica dos marcadores de tenogênese e de matriz extracelular por rt-qPCR, duas horas após a bioimpressão (M0) e após 21 dias de cultivo (M21). Já a avaliação *in vivo* foi realizada com o implante cirúrgico da estrutura bioimpressa na região sub-fascial do músculo esplênio bilateral de um equino. A biópsia excisional para avaliação histológica foi realizada 30 dias após o implante (M30).

Preparo da biotinta e Bioimpressão

O preparo da biotinta foi realizado como descrito no capítulo 2, brevemente, o tendão flexor digital superficial (TFDS) de equinos hípidos foi coletado de forma asséptica, descelularizado, liofilizado e moído. Após, foi realizada a solubilização com pepsina 0,2% e HCl (0,02M) por 48 horas sob agitação. Essa solução foi então neutralizada, refrigerada e foram adicionadas adCTM previamente caracterizadas, provenientes do biobanco, na concentração de 1×10^6 células/mL. Após adição de adCTM foi realizada uma centrifugação de 40 segundos, a $5000 \times g$ 4°C para retirada de eventuais bolhas de ar.

Foi utilizada bioimpressora de extrusão direta BioEdPrinter v.2 (BioEd Tech[®], São Paulo), com agulha de 25G, em imersão de nanopartículas de agarose a 5% acrescida de 1% de transglutaminase.

Cultivo tridimensional

Logo após a impressão as estruturas foram transferidas para estufa a 37°C por duas horas para garantir completa gelificação do hidrogel. Após esse período o material suporte contendo agarose e transglutaminase foi gentilmente removido e substituído por 2 mL de meio de cultivo composto por Meio Eagle Dulbecco Modificado F12 Glutamax[®] (DMEM)[®] (Thermo Fisher, MA – USA) com 10% Soro Fetal Bovino (SFB, Thermo Fisher, MA – USA) e 1% de antimicótico e antibiótico (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo.USA). Metade das estruturas (n=9) permaneceram livres nas placas de petri (Glivre) (Figura 1-A) enquanto a outra metade passou para placas de seis poços revestidas com PDMS, chamado de Gtênsil. As estruturas do Gtênsil foram fixadas com hastes de agulhas 0,45x13 nas quatro extremidades (Figura 1-B). O cultivo foi mantido por 21 dias, com trocas de meio a cada 72 horas.

Para a implantação da estrutura no equino, o mesmo protocolo foi utilizado, porém após 24 horas de cultivo, o meio de cultivo foi substituído por meio de cultivo sem soro

fetal bovino e após 24 horas, as estruturas foram lavadas com solução salina tampão (PBS; Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo.USA) e implantadas no animal. A depleção do soro fetal bovino foi realizada para reduzir a possibilidade de reação imune após o implante, uma vez que o SFB é um componente xenogênico passível de reconhecimento pelo receptor, com consequente geração de resposta imune.

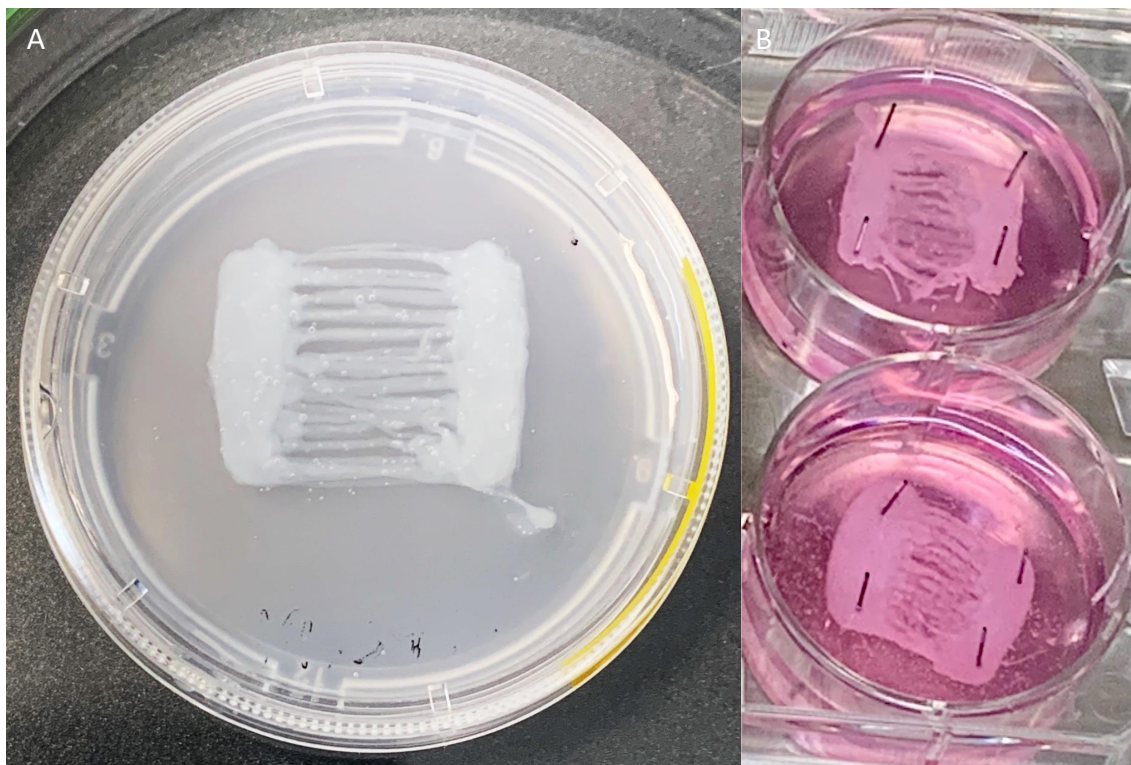


Figura 1. A. Estrutura Bioimpressa, logo após impressão, imersa em agarose 5% e transglutaminase 1%. B. Cultivo do Gtênsil, após retirada da agarose e substituição por meio de cultivo e fixação das extremidades das estruturas com hastes metálicas em base de PDMS.

Procedimento cirúrgico

Um equino hígido, puro sangue árabe, macho de 350Kg e 8 anos de idade foi utilizado para a avaliação de biocompatibilidade da estrutura impressa. O animal foi submetido à sedação com Xilazina 10% (Venco Saúde animal, São Paulo, Brasil) na dose de 0,8mg/Kg). Foi realizada tricotomia da região cervical bilateral e antisepsia cirúrgica de toda região. Na sequência, foi realizada no local do procedimento cirúrgico anestesia local infiltrativa em “L invertido” (Figura 2-C). Pele e subcutâneo foram incisados até exposição da fáscia do músculo esplênio (Figura 2-B). Foi realizada uma incisão horizontal na fáscia do músculo esplênio e esta foi divulsionada do epimísio, para implante sub-fascial da estrutura. As extremidades superiores da estrutura impressa foram suturadas com fio poliglactina 910 #3-0 (Ethicon J&J Medical Devices, São Paulo, Brasil) (Figura 2-C). A fáscia muscular foi igualmente suturada com pontos simples

interrompidos seguida de sutura de pele. O animal recebeu dose única de penicilina benzatina (Zoetis, São Paulo, Brasil) na dose de 22.000UI/Kg intramuscular e duas aplicações de flunixin meglumine (J.A. Saúde Animal, Paraná, Brasil) na dose de 1,1mg/kg, IV, SID e 10.000 UI de soro anti-tetânico (Venco Saúde animal, São Paulo Brasil). O animal foi monitorado a respeito de qualquer reação ao implante e foram realizados curativos diários com higienização da ferida cirúrgica e aplicação de repelente por 14 dias, quando as suturas de pele foram retiradas. Ao completar 30 dias de pós-operatório foi realizada biópsia excisional no local desde a epiderme até o plano muscular.

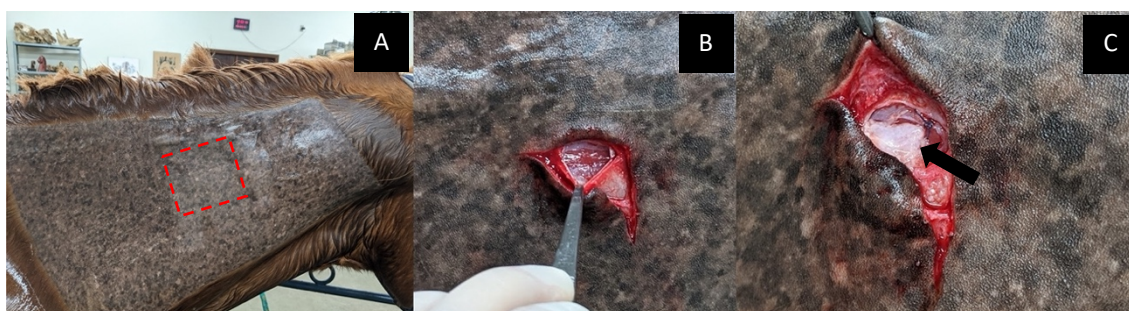


Figura 2. A. Local de acesso cirúrgico na região do músculo esplênio direito do equino, demarcado com linha pontilhada vermelha. B. acesso cirúrgico com divulsão da fáscia muscular, evidenciando o local da implantação. C. Ferida cirúrgica após implantação da estrutura bioimpressa (seta preta) e fixação da extremidade superior à musculatura com fio de sutura absorvível.

Avaliação confocal de viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada 1 dia (M1), 7 dias (M7) e 14 dias após a impressão (M14). A técnica de marcação com calceína AM (C1359 SIGMA-ALDRICH, Saint Louis, EUA) e iodeto de propídio (P4170 SIGMA-ALDRICH, Saint Louis, EUA) foi utilizada para quantificação de células e avaliação da viabilidade celular. Após dupla lavagem do arcabouço com meio de cultivo sem SFB, este foi imerso em a solução de 0,1 nM de calceína diluída em meio de cultivo sem SFB. Foi então incubada no escuro a 37 °C por 15 minutos e lavada uma vez com PBS. Na sequência adicionou-se 1,0 µL/mL de iodeto de propídio diluído em PBS por 10 minutos. As estruturas foram imediatamente avaliadas por microscopia confocal à laser (LEICA, TCS SP8) em uma faixa de $\lambda = 494-517$ nm para calceína (fluorescência em verde) e $\lambda = 535-617$ nm para iodeto de propídio (fluorescência em vermelho). A avaliação da viabilidade celular pelas imagens foi realizada pelo software Image J, com o comando de separação de canais e contagem de partículas dos canais vermelho (iodeto de propídio) e verde (calceína), e as porcentagens foram consideradas em relação à contagem total de células.

Avaliação morfológica do arcabouço

As estruturas bioimpressas foram avaliadas por microscópio invertido e por lupa, para observação da distribuição organizacional das células e da estrutura das fibrilas de colágenos ao longo dos 21 dias de cultivo. Também foi realizada a avaliação por microscopia eletrônica de varredura (MEV) após fixação, secagem em ponto crítico seguida de banho de ouro, nos momentos, M0 e M21 do Gtênsil e Glivre. Oriunda da avaliação por MEV a análise quantitativa de diâmetro das fibras (n=20) e ângulo das fibras em relação ao plano horizontal, ambas com o uso do software ImageJ. Os ângulos foram demonstrados por histograma de acordo com a distribuição.

Avaliação histológica

Foi realizada a avaliação histológica com coloração de Hematoxilina e Eosina das estruturas bioimpressa, duas horas após a impressão (M0), com 14 dias (M14) e 21 dias (M21) de cultivo. Já a biópsia foi avaliada 30 dias após o implante. Nos determinados momentos as estruturas foram fixadas com formol 10% por 24 horas, seguidas de conservação em etanol 70% até processamento convencional de inclusão em blocos de parafina. Na sequência os blocos foram cortados com 4µm de diâmetro para posteriormente passarem por desparafinização e corados com Hematoxilina e Eosina. As lâminas foram avaliadas quanto ao infiltrado inflamatório, à vascularização, à hemorragia e à organização do colágeno e o escore definido para as avaliações foram: 0 para ausente; 1 para discreto; 2 para moderado e 3 para intenso.

Avaliação Imunohistoquímica de Colágenos Tipo I e III

Para a avaliação imunohistoquímica foram utilizadas amostras de cultivo com células duas horas após a impressão (M0) e após 21 dias de cultivo (M21), foram também utilizados, controle negativo (sem marcação com DAB) e controle positivo (tendão hígido). Foram avaliados colágeno Tipo I (Col I) e colágeno tipo III (Col III). Para isso, os blocos foram cortados em 3µm de espessura e os cortes foram montados em lâminas com carga positiva. O processamento, previamente descrito por Carvalho et al., (2013)(8), iniciou-se por desparafinização em Xilol, seguida por incubação decrescente de concentração de etanol até 85%. Após lavagens 10 lavagens em água destilada, a recuperação antigênica foi realizada pela incubação com tripsina, seguida do bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio (3%) e metanol. Os anticorpos policlonais bovinos de colágeno 1 (Novotec, Saint Martin La Garenne, França) e colágeno 3 (Novotec, Saint Martin La Garenne, França) foram diluídos em 1:1000, depositados

sobre as lâminas e incubados por 18 horas a 4°C. Após lavagem com Tris foi incubado com anticorpo secundário EnVision (K4061, DAKO Dinamarca A/S) por 60 minutos a 27 °C, depois com DAB (K3468, DAKO Dinamarca A/S) e por fim corado com hematoxilina. As lâminas foram montadas pelo processo de incubação em concentrações crescentes de etanol, seguido de xilol. As imagens foram avaliadas em microscópio invertido e a produção de colágeno foi mensurada pelo software Image J.

Avaliação por rt-qPCR

Para a avaliação de fatores de transcrição associados à tenogênese foram utilizadas amostras de cultivo com células duas horas após a impressão (M0) e após 21 dias de cultivo (M21). Os genes selecionados foram Scleraxis (SCX), Mohawk (MHK), Tenacin C (TNC), Biglican (BGN), Decorin (DCN), Colágeno 1 (COL1A1), Colágeno 3 (COL3A1). Também foi avaliado o gene de osteogênese *runt-related transcription factor 2* (RUNX2).

Os primers utilizados foram sintetizados pela Exxtend Biotecnologia (Paulinia, SP, BRA) e serão apresentados em material suplementar. Para o ensaio de RT-PCR foi realizada a extração total de RNA da amostra utilizando Qiazol do miRNeasy Mini kit (#217004, Qiagen, Germantown, MD, USA). Para realizar o ensaio de RT-qPCR foi preparada a transcrição reversa cDNA com High-Capacity cDNA reverse transcription kit (#4368813 Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

A expressão dos genes alvos foi normalizada utilizando-se a expressão relativa do controle interno GAPDH pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$. O equipamento de RT-qPCR QuantStudio 3 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) foi utilizado para o processamento.

Análise Estatística

Os resultados foram avaliados quanto à análise de variâncias e quando diferença estatística foi detectada foi realizado teste T quando as amostras eram independentes ou Tukey quando foi avaliada a evolução ao longo do tempo. A significância foi atribuída quando $P < 0,05$.

RESULTADOS

As estruturas do Glivre e Gtênsil permaneceram íntegras pelos 21 dias de cultivo. Observou-se, no Glivre, que as estruturas se tornaram mais difíceis de manusear e mais

frágeis e o contrário foi observado no Gtênsil em que as estruturas se tornaram mais firmes ao manuseio e mais organizadas com o tempo de cultivo.

Viabilidade Celular

A viabilidade celular oscilou ao longo do período de cultivo e pode ser observada à avaliação confocal do teste de Calceína e Iodeto de Propídio (Figura 3).

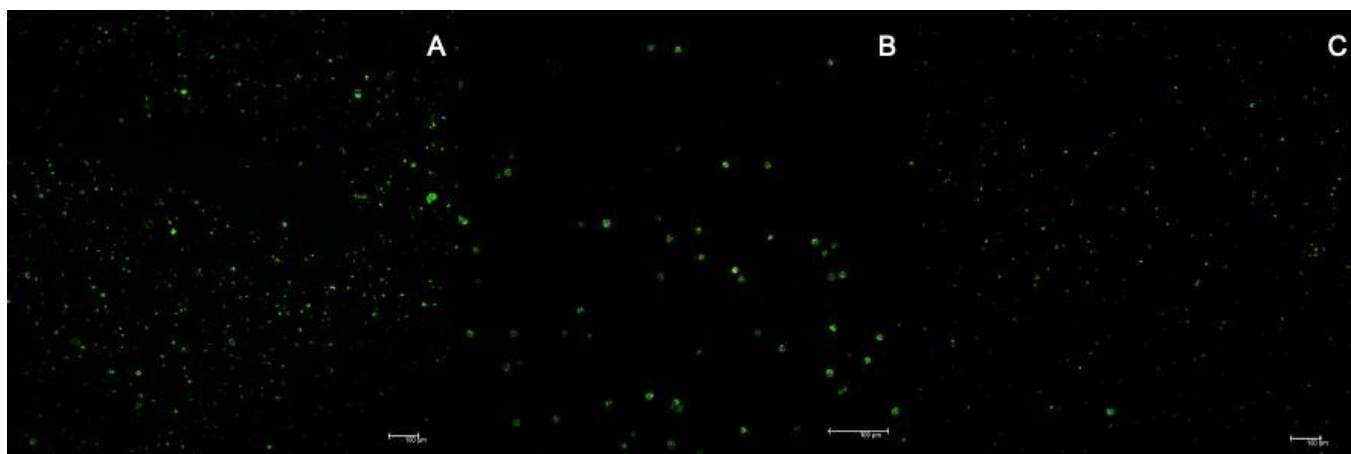


Figura 3. Avaliação do ensaio de viabilidade com calceína e iodeto de propídio, onde as células verdes indicam viabilidade e metabolismo presentes. A, B e C correspondem a M1, M7 e M14 respectivamente.

Porém, na avaliação quantitativa pelo Image J essa oscilação não foi estatisticamente significativa (Tabela 1).

Tabela 1. Viabilidade celular quantitativa obtida pela avaliação das imagens de microscopia confocal do ensaio de calceína e iodeto de propídio utilizando o software ImageJ nos momentos M1, M7 e M14, como valor de P.

	Porcentagem de células vivas (%)
Dia 1	$0,837 \pm 0,04$
Dia 7	$0,674 \pm 0,22$
Dia 14	$0,704 \pm 0,08$
P	0,350

Avaliação Morfológica do hidrogel

A avaliação qualitativa do hidrogel antes e após o cultivo nos diferentes grupos demonstrou melhor organização das fibras colágenas no Gtênsil (Figura 4). A partir do

décimo dia de cultivo havia expressiva diferença entre a região fixada às hastes metálicas (bordas e filamentos) e, a região que não estava recebendo tensão, no centro do hidrogel (Figura 4-G). O Glivre também apresentou reorganização, porém de aparência mais sutil à lupa e ao microscópio (Figura 4-D). A microscopia eletrônica de varredura e a avaliação ao microscópio óptico revelaram alinhamento das fibrilas colágenas em uma rede mais densa e organizada no Gtênsil (Figura 4-I) se comparado ao M0 (Figura 4-C) e Glivre (Figura 4-F).

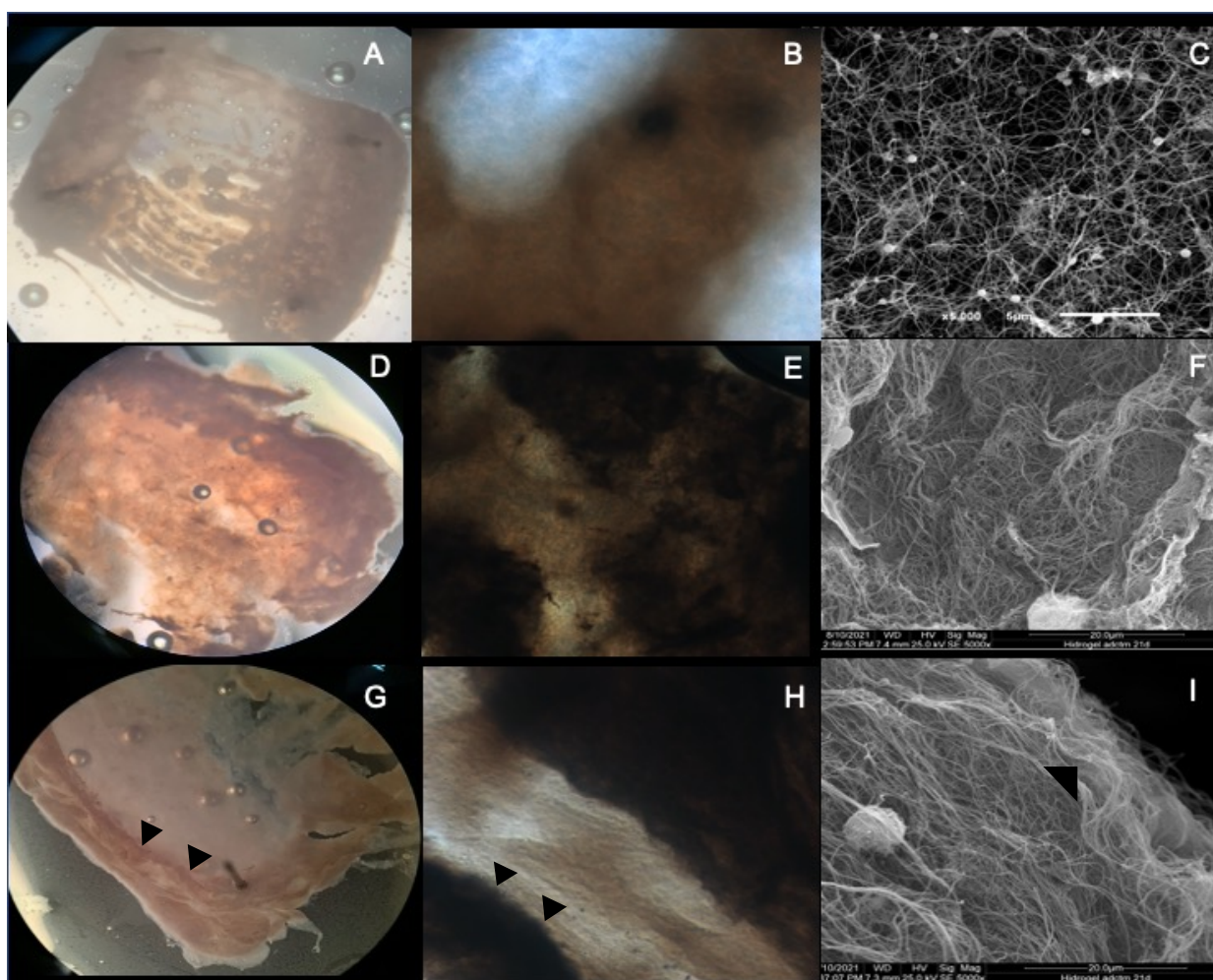


Figura 4. Representação estrutural e microestrutural da estrutura antes e ao fim do cultivo. A, D e G são imagens das estruturas duas horas após bioimpressão, e após 21 dias de cultivo de Glivre e Gtênsil respectivamente. B, E e H são fotomicrografias de microscopia óptica invertida dos cultivos M0, M21 Glivre e M21 Gtênsil respectivamente. As imagens C, F e I são microscopias eletrônicas de varredura com 5000 vezes de aumento das estruturas bioimpressa em M0, M21 Glivre e M21 Gtênsil, respectivamente. Cabeças de seta indicam a organização das fibrilas no Gtênsil.

O diâmetro das fibrilas colágenas aumentou com o cultivo, a média em M0 era de $0,12 \pm 0,03 \mu\text{m}$ e passou para $0,31 \pm 0,1 \mu\text{m}$ em Gtênsil ($P < 0,001$) e para $0,32 \pm 0,09 \mu\text{m}$ em Glivre ($P < 0,001$).

Já na distribuição dos ângulos das fibrilas em relação ao plano horizontal, observou-se 75% das fibrilas do Gtênsil em um intervalo de angulação (0-45 graus), indicando maior paralelismo entre elas, enquanto nos outros grupos a distribuição nos diferentes ângulos foi aleatória entre os intervalos de ângulos, indicando fibras em diferentes disposições (Figura 5).

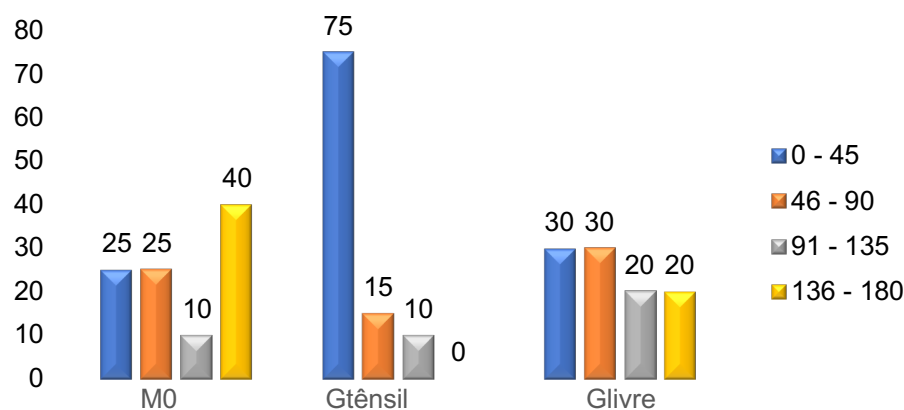


Figura 5. Representação gráfica dos ângulos em relação à disposição horizontal das fibrilas colágenas das estruturas a partir da avaliação por microscopia eletrônica de varredura.

Avaliação Imunohistoquímica de colágeno Tipo I e Tipo III

A avaliação por imunohistoquímica dos Col I e Col III qualitativamente permitiu a observação de aumento no alinhamento das fibras do hidrogel após 21 dias de cultivo no Gtênsil, tanto em comparação ao M0 quanto ao Glivre (Figura 6). No controle negativo não houve marcação pelo corante DAB, como esperado.

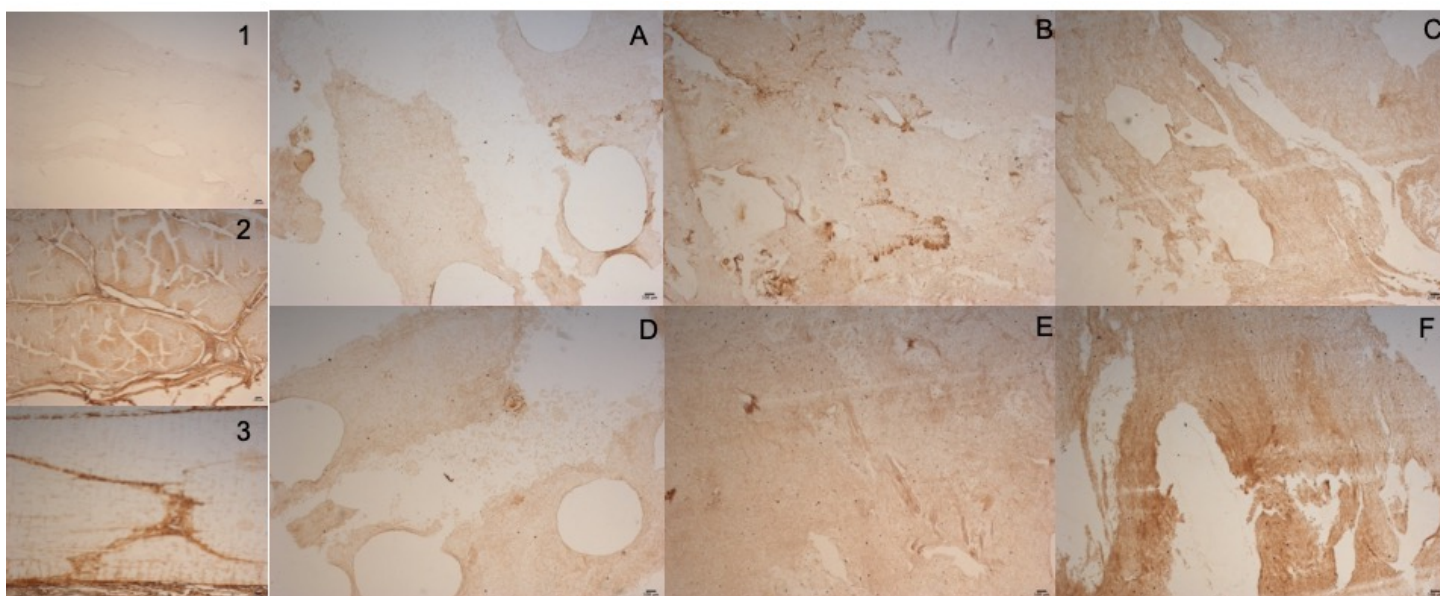


Figura 6. Fotomicrografias da marcação imunohistoquímica das estruturas bioimpressas. 1. Controle Negativo; 2. Controle positivo de Col I e 3. Controle positivo de Col III. A. Marcação de Col I bioimpresso em M0; B. Marcação de Col I bioimpresso em M21 Glivres; C. Marcação de Col I em M21 bioimpresso Gtênsil; D. Marcação de Col III bioimpresso em M0; E. Marcação de Col III bioimpresso em M21 Glivres; F. Marcação de Col III bioimpresso em M21 Gtênsil.

Quanto à avaliação quantitativa da imunohistoquímica houve expressivo aumento tanto de Col I quanto de Col III no grupo Gtênsil após 21 dias de cultivo. Em comparação ao controle positivo o Gtênsil apresentou produção semelhante de Col I e uma produção significativamente mais alta de Col III. Em relação ao M0 e ao Glivres, o Gtênsil foi superior na produção de ambas as proteínas de matriz extracelular ($P < 0,001$) (Tabela 6).

Tabela 2. Análise semi-quantitativa pelo software ImageJ da marcação de colágenos I e III por imunohistoquímica

	Colágeno I	Colágeno III
Controle Negativo	$0,027 \pm 0,04$ b	$0,027 \pm 0,04$ c
Controle Positivo	$43,33 \pm 9,58$ a	$10,51 \pm 4,57$ b
M0	$15,48 \pm 5,15$ b	$11,34 \pm 2,41$ b
M21 Gtênsil	$33,40 \pm 10,96$ a	$31,10 \pm 5,18$ a
M21 Glivres	$9,84 \pm 4,15$ b	$9,76 \pm 4,23$ bc
P	<0,001	<0,001

RT-qPCR

Na avaliação por RT-qPCR não houve diferença estatística na comparação entre os grupos apenas na expressão do gene Scleraxis. Os demais marcadores de tenogênese ou de matriz extracelular tendínea demonstraram aumento significativo entre m0 e G fixo (Tenascina - $P = 0,0002$, Mohawk - $P = 0,0007$, Decorin $P < 0,0001$, Biglican - $P < 0,0001$, Colágeno 1a1 - $P < 0,0001$ e colágeno 3a1 - $P = 0,0169$), e/ou no m21D entre Glivres e

Gtênsil (Tenascina – $P=0,0012$, Mohawk – $P=0,0094$, Decorin $P<0,0001$, Biglican – $P<0,0001$, Colágeno 1a1 – $P<0,0001$). O marcador de osteogênese Runx2 foi significativamente mais alto no Gtênsil, quando comparado ao m0. Na comparação entre m0 e Glivre houve diferença no mRNA referente ao Decorin ($P=0,0378$) apenas com maior expressão em Glivre (Figura 7).

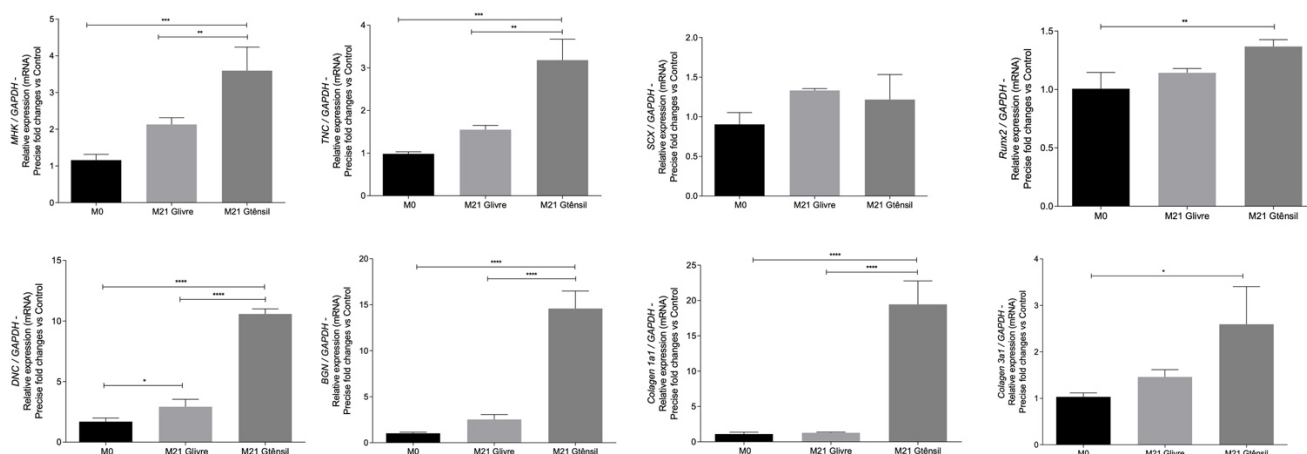


Figura 7. Representação gráfica da expressão gênica dos marcadores de tenogênese e de matriz extracelular por RT-qPCR dos cultivos em diferentes momentos. Em preto está representado o controle inicial do cultivo, em M0; Em Cinza claro está representado o M21 do Glivre e em Cinza escuro o M21 de Gtênsil.

Avaliação da biocompatibilidade *in vivo*

Foi possível perceber a sensibilidade local durante as primeiras 48 horas após o procedimento cirúrgico, a partir do terceiro dia havia pouca formação de edema e ausência de dor à palpação local. Não houve formação de secreção ou seroma e os pontos de pele foram retirados após 14 dias, sem intercorrências. No momento das biópsias observou-se total integração do biomaterial ao tecido adjacente e ainda foi possível observar resquícios do fio de sutura utilizado (Figura 8).

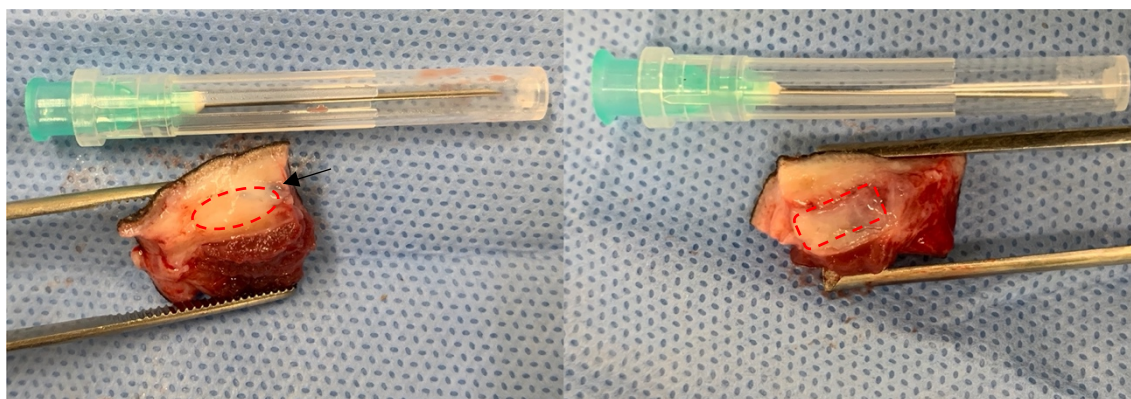


Figura 8. Biópsias realizadas 30 dias após o implante do biomaterial, o pontilhado em vermelho indica o local de implante do biomaterial, e a seta preta indica o fio de sutura utilizado para fixar o biomaterial.

Foram avaliados cinco cortes diferentes de cada biópsia, totalizando dez lâminas. As alterações avaliadas permaneceram em sua maioria entre leves e moderadas, com poucas

avaliações consideradas graves ou ausentes (Tabela 3). A inflamação variou de intensidade, porém o infiltrado celular foi de mononucleares em todas as lâminas (Figura 9).

Tabela 3. Avaliação das lâminas de H&E e Tricromo de Masson das biópsias com 30 dias após o implante do biomaterial.

Avaliação	Mediana	Min	Max
Hemorragia	1,5	0	3
Inflamação/Infiltrado celular	2	1	3
Desorganização do colágeno	1	0	3
Neovascularização	1	0	3

Nota. Escore de avaliação sendo 0 considerado ausente; 1 considerado discreto; 2 considerado moderado e 3 considerado intenso.

Foi possível observar também desorganização do tecido no local do implante, com presença de parte do biomaterial (Figura 9).

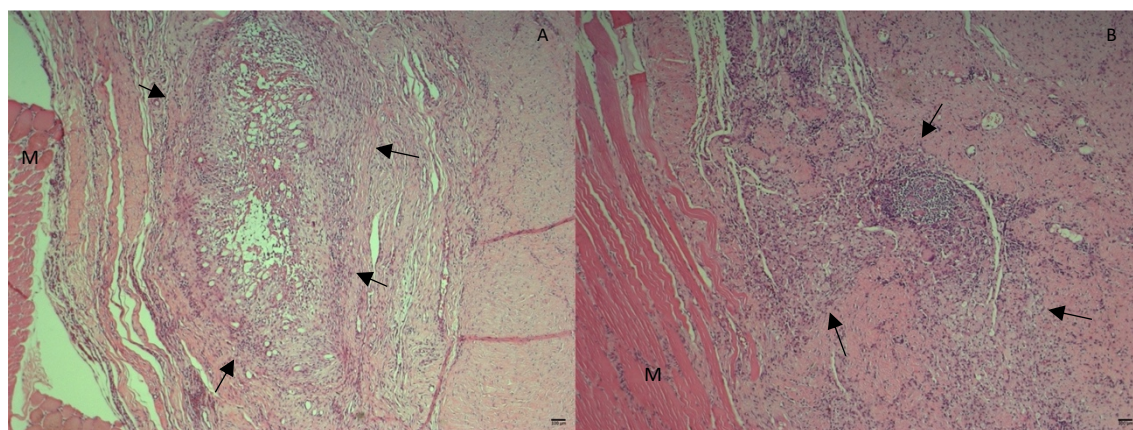


Figura 9. Fotomicrografias com coloração de H&E das biópsias realizadas do lado direito (A) e esquerdo do pescoço do equino (B). Observa-se o tecido muscular esquelético marcado com a letra M, na imagem A em corte transversal e na imagem B longitudinal.

DISCUSSÃO

Visando promover a regeneração tendínea por meio de terapias inovadoras, o presente estudo testou a biocompatibilidade de uma nova biotinta composta por matriz extracelular tendínea equina descélularizada com adCTM após bioimpressão. Foi avaliada também a tenogênese e a produção e organização de matriz extracelular em cultivos prolongados tanto com as estruturas fixas em uma plataforma de PDMS, recebendo assim uma força tênsil contra a contração celular, quanto livres em meio de cultivo. Sabe-se que no reparo tendíneo, a condição da lesão, as células e a força tênsil

são fatores primordiais para a obtenção de um tecido de excelente qualidade. Com esse estudo foi possível observar a influência da força tênsil à resposta celular e à organização da matriz extracelular, no momento analisado, neste biomaterial. A sinalização celular indicou melhor expressão de genes relacionados à tenogênese e à matriz extracelular tendínea no grupo que recebeu força tênsil, além de melhor alinhamento e organização das fibrilas de colágeno neste grupo.

Dentre a expressão de genes diretamente ligados à tenogênese, os principais fatores de transcrição descritos para essa diferenciação foram Mohawk e Scleraxis. Ambos são capazes de se ligarem aos receptores de membrana Smad3 gerando assim a sinalização para manter a produção de TGF- β , fator de crescimento com importante papel nesse processo (22). Nossos resultados estão de acordo com estudos prévios em que o Mohawk aparece como fator inicial de tenogênese e orchestra essa diferenciação, através do aumento de sua expressão, estando diretamente associado ao aumento da expressão de outros fatores importantes na formação do tendão, como: Tenascina, Decorin e Colágeno tipo I (23). Comprovou-se previamente que a sua adição ao meio de cultivo através de um adenovírus foi capaz de induzir a expressão de tenascina, tenomodulina e colágeno tipo I por células tronco mesenquimais de origem de medula óssea humana (24).

Por outro lado, no nosso estudo não foi observada diferença significativa na expressão de scleraxis entre os grupos, e em M0 já houve expressão desse gene nas células, ainda que baixa, esses resultados corroboram com estudos recentes em que o grupo controle de adCTM humanas apresentavam expressão da Scleraxis, indicando que pode haver expressão do gene nessa origem celular (25). A scleraxis já foi indicada como fator inicial de tenogênese e em um estudo recente, de tenogênese em biomaterial de colágeno, foi observado seu pico após 14 dias de cultivo (26), nosso estudo pode ter perdido o pico de scleraxis uma vez que a análise foi feita após 21 dias de cultivo.

Os colágenos I e III são os principais compostos da matriz extracelular tendínea e, em nosso estudo, os genes foram mais expressos no Gtênsil, em comparação aos M0 e Glivre. Além da expressão pelas células, a produção dessas proteínas também foi confirmada quando as estruturas bioimpressas foram avaliadas por imunohistoquímica. Portanto, a presença do hidrogel de origem de matriz extracelular tendínea associado à força tênsil durante o cultivo foram estímulos suficientes não só para a indução da expressão dos genes de matriz extracelular, mas também para a produção efetiva dessas proteínas. Outro estudo comprovou a influência do arcabouço na expressão gênica de proteínas da matriz extracelular por células tronco humanas, advinda do alinhamentos das

fibras de colágeno adicionadas de caprolactona e da rugosidade de superfície do material (27). No entanto esse estudo não investigou a produção de fato dessas proteínas. Outro estudo demonstrou o aumento da produção de Col I e Col III, quando a tenogênese foi induzida com a adição de fatores de crescimento ao meio de cultivo das células em arcabouço de caprolactona, indicando a necessidade de um fator indutor além do arcabouço (28).

Decorin, assim como o biglican, é um proteoglicano altamente encontrado em tendões (29). Foram descritos como essenciais para a formação tendínea e estão associados à fibrilação adequada das fibras colágenas. A ausência desses proteoglicanos leva à união inadequada das fibrilas de colágeno, gerando um tecido frágil, com deficiência de ligações entre as fibras (30,31). A deficiência de Decorin e Biglican na matriz extracelular foi associada à resposta inadequada de células tronco de origem tendínea aos fatores de crescimento BMP e TGF- β 1, levando à osteogênese (29). No presente estudo houve aumento da expressão de Decorin em comparação ao momento inicial de contato com o hidrogel nos dois grupos, ainda mais expressivo no cultivo Gtênsil. Biglican também foi significativamente mais expresso no grupo Gtênsil, indicando importante influência da tensão na expressão desses proteoglicanos.

Muitos estudos apontam a importância da força tênsil cíclica para promover a tenogênese de células tronco, simulando a contração muscular (23,32). Já o alongamento constante e de baixa intensidade de fibras colágenas *in vitro*, simulando o crescimento ósseo durante a fase embrionária, resulta em melhor união e organização da matriz colágena, com produção de uma estrutura mais firme com 10 dias de cultivo (33). Em nosso estudo, o grupo que foi fixado com hastes (Gtênsil) apresentou melhor organização das fibras nos locais em que a fixação foi realizada, indicando uma força contrária à contração celular nesses locais. Também foi possível observar maior expressão de fatores de tenogênese nesse grupo, sedimentando a importância da força tênsil tanto na diferenciação celular em tenócitos quanto na organização da matriz extracelular.

A alta expressão de Runx2 é associada à osteogênese e à inibição da diferenciação adipogênica em adCTMs (34). Além disso, a ausência de expressão desse gene pode estar associada à falta de reparo tendíneo, uma vez que também contribui para o processo de diferenciação em si (35). Embora Runx2 seja expresso em adCTMs quando há a tenogênese (36) sua expressão - ainda que baixa - em AdCTM submetidas a meio de cultivo basal controle também pode existir (37). Em um estudo comparando diferentes módulos de armazenamento, observou-se maior expressão desse gene no biomaterial de

maior módulo, este foi associado a maior capacidade de diferenciação celular e tenogênese (26).

Para que ocorra a tenogênese *in vitro* é importante a associação de alguns fatores, como tipo celular, meio de indução com fatores de crescimento, biomaterial utilizado no arcabouço e força tênsil aplicada (35,38,39). Recentemente, corroborando o resultado do nosso estudo, apenas o biomaterial com alinhamento das fibras foi suficiente para indução da tenogênese afirmando a importância do meio em que as células estão localizadas para que a diferenciação ocorra (27). Embora o material utilizado não apresentasse alinhamento das fibras colágenas inicialmente, a fixação do mesmo com hastes metálicas permitiu uma força tênsil contra a contração celular e consequentemente o alinhamento das fibras durante o cultivo, o que aumentou expressão tenogênica dessas células.

A viabilidade celular nesse estudo não variou significativamente. Vinte e quatro horas após a impressão a viabilidade estava 83,7% e após 14 dias passou para 70%, recentemente investigou-se a viabilidade celular em matriz extracelular tendínea porcina após a impressão e foi constatado que a osmolaridade do ácido utilizado para a digestão pode influenciar negativamente na viabilidade celular nas primeiras horas após a impressão. Além disso a utilização de ácido clorídrico a 0,02M, o mesmo utilizado neste estudo, foi associada à menor viabilidade ao longo de duas semanas de cultivo (20).

A importância da adesão celular e capacidade de distribuição organizacional em um substrato determina a interação entre eles, e pode influenciar diretamente na diferenciação e sinalização celular (39,40). A falta de formato fibroblástico das células, identificada tanto na microscopia confocal quanto na histologia, pode indicar poucos prolongamentos citoplasmáticos dos filamentos de F-actina. Esses prolongamentos, no tendão, são responsáveis por coordenar a mecanotransdução entre as células e matriz extracelular através das quinases de adesão (Vinculina, N-caderina) (41). A permanência do formato globóide das células foi associada a características reológicas de materiais, visto que nos materiais menos resistentes, com menores módulos de armazenamento e de perdas, as células (linhagem de células de câncer murino) não adotaram o formato fibroblástico (42).

Recentemente, a composição e quantidade de água nos materiais foi relacionada à adesão celular, indicando que materiais com alto conteúdo de água livremente ligada ao material têm a capacidade de adesão celular à superfície diminuída (43). Um fator limitante do nosso estudo foi que não realizamos a avaliação da permanência de proteínas de adesão celular tanto nas células após a bioimpressão quanto na matriz extracelular,

para investigar assim, a causa da falta do formato fibroblastóide das células durante o cultivo.

O uso de uma fonte celular facilmente obtida, como as adCTM, favorece a utilização da bioengenharia futuramente de forma clínica. A capacidade dessas células se diferenciarem em tenócitos *in vivo* ainda deve ser investigada e comprovada, porém, se houver a sinalização parácrina para a tenogênese em um tecido em reparo, o hidrogel contendo adCTM terá futuro promissor para utilização terapêutica. Uma vez que as adCTM já tiveram comprovada ação benéfica na migração e resposta de tenócitos humanos quando em co-cultivo *in vitro* com adCTM (44,45).

A aplicação *in vivo* da estrutura bioimpressa foi importante para demonstrar a capacidade de integração do biomaterial ao tecido adjacente, possibilitando inclusive a infiltração vascular e celular ao biomaterial o que pode ser benéfico ao reparo de uma lesão (46). Apesar da ausência de resposta clínica do animal de dor ou rejeição ao implante, foi possível observar que o material não é inerte, gerando uma resposta inflamatória local com hemorragia e moderado infiltrado inflamatório, com presença de macrófagos. A presença do biomaterial de MEC vascular recobrimo biomateriais absorvíveis sintéticos já foi associada à diminuição de resposta inflamatória, quando comparada apenas à presença do biomaterial sintético indicando melhor reconhecimento do organismo à matriz (47).

Os macrófagos são células-chave na regulação da resposta inflamatória aos biomateriais e manutenção do equilíbrio pois é a partir da polarização deles em tipo 1 (M1) ou tipo 2 (M2) e tempo de resposta de cada um que haverá a manutenção da inflamação ou resolução com reparo da lesão (48). O tipo de resposta obtida pelo tecido varia conforme o tipo de material, a superfície do mesmo, sua porosidade bem como sua rugosidade (49). Isto porque, a capacidade do material de integrar determinadas proteínas em sua superfície influenciará diretamente na ativação da resposta inflamatória a corpos estranhos e pior desempenho do material no organismo (50). Embora o presente estudo não tenha investigado a polarização dos macrófagos, ressalta-se a importância dessas células para implantes de biomateriais e a sua presença não indica necessariamente uma resposta ruim ao material. E estudos com grupos controle e maior número de animais serão importantes para definir esses pontos.

Os resultados deste estudo demonstram a influência da força tênsil à resposta celular e à organização da matriz extracelular. A sinalização celular indicou melhor expressão de genes relacionados à tenogênese e à matriz extracelular tendínea no grupo

que permaneceu fixo sob tensão durante o cultivo, além de apresentar melhor alinhamento e organização das fibrilas de colágeno. Embora o processo de preparo do arcabouço com adCTM não seja totalmente inócuo, a viabilidade celular foi mantida, indicando potencial deste biomaterial para aplicações clínicas que visem a melhora no processo de reparação tendínea ou ligamentar. Importantes contribuições para a bioengenharia tendínea e para o entendimento da sinalização de adCTM nesse cenário foram alcançadas. As estratégias futuras para a utilização desse hidrogel *in vivo* consistem em promover alterações bioquímicas e reológicas que aumentem a capacidade de adesão celular e alongamento das células e investigar o resultado de reparo obtido quando implantado na lesão tendínea.

A possibilidade de administração do hidrogel de matriz extracelular tendínea equina em tecidos e regiões naturalmente detentores de força tênsil é potencialmente promissora e, também deve ser explorada, uma vez que esta foi capaz de alterar a organização e resistência deste biomaterial.

Agradecimentos

Agradecemos à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio pesquisa número de processo: 2017/12815-0 e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado, financiamento pelo CAPES/PRINT e apoio ao Programa de pós-graduação.

REFERÊNCIAS

1. Jann HW. Current concepts and techniques in the management of tendon lacerations. Clin Tech Equine Pract. 2004;3(2 SPEC. ISS.):215–24.
2. Skinner S, Isaacs J. Extensor Tendon Injuries in the Athlete. Clin Sports Med [Internet]. 2020;39(2):259–77. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.csm.2019.12.005>
3. Adair HS, Gobel DO, Rohrback BW. In vitro comparison of the locking loop and the three loop pulley suture techniques in the repair of equine flexor tendons. J Equine Vet Sci. 1989;9(4):186–90.
4. Liu W, Diao Y, Wang Z, Guo L, Yang W, Luo Y, et al. Optimization of the knot configuration for early accelerated rehabilitation after Achilles tendon rupture. Clin Biomech [Internet]. 2020;80(July 2019):105139. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.clinbiomech.2020.105139>
5. Wang J, Qian L, Liu Z, Wang X, Li-Tsang C, Li J, et al. Ultrasonographic

- assessment in vivo of the excursion and tension of flexor digitorum profundus tendon on different rehabilitation protocols after tendon repair. *J Hand Ther* [Internet]. 2021;(xxxx). Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jht.2021.01.006>
6. Tamura N, Kodaira K, Yoshihara E, Mae N, Yamazaki Y, Mita H, et al. A retrospective cohort study investigating risk factors for the failure of Thoroughbred racehorses to return to racing after superficial digital flexor tendon injury. *Vet J* [Internet]. 2018;235:42–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2018.03.003>
 7. Li W, Midgley AC, Bai Y, Zhu M, Chang H, Zhu W, et al. Subcutaneously engineered autologous extracellular matrix scaffolds with aligned microchannels for enhanced tendon regeneration: Aligned microchannel scaffolds for tendon repair. *Biomaterials*. 2019;224(December 2018).
 8. Carvalho ADM, Badial PR, Álvarez LEC, Yamada ALM, Borges AS, Deffune E, et al. Equine tendonitis therapy using mesenchymal stem cells and platelet concentrates: A randomized controlled trial. *Stem Cell Res Ther*. 2013;4(85):1–13.
 9. Carvalho ADM, Alves ALG, Galvão P, Oliveira PGG De, Álvarez LEC, Amorim RL, et al. Use of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells for Experimental Tendinitis Therapy in Equines. *J Equine Vet Sci*. 2011;31:26–34.
 10. Guercio A, Di Marco P, Casella S, Russotto L, Puglisi F, Majolino C, 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. *J Equine Vet Sci*. 2015;35(1):19–26.
 11. Santos VHD, Pfeifer JPH, Souza JBD, Stievani FDC, Hussni CA, Golim MDA, et al. Evaluation of alginate hydrogel encapsulated mesenchymal stem cell migration in horses. *Res Vet Sci*. 2019;124.
 12. de Souza JB, Rosa G dos S, Rossi MC, Stievani F de C, Pfeifer JPH, Kriek AMT, et al. In Vitro Biological Performance of Alginate Hydrogel Capsules for Stem Cell Delivery. *Front Bioeng Biotechnol*. 2021;9(August):1–10.
 13. Kim WJ, Lee H, Lee JU, Atala A, Yoo JJ, Lee SJ, et al. Efficient myotube formation in 3D bioprinted tissue construct by biochemical and topographical cues. *Biomaterials*. 2020;230(October).
 14. Shin YJ, Shafrank RT, Tsui JH, Walcott J, Nelson A, Kim DH. 3D bioprinting of mechanically tuned bioinks derived from cardiac decellularized extracellular

- matrix. *Acta Biomater* [Internet]. 2021;119:75–88. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.11.006>
15. Dikyol C, Altunbek M, Bartolo P, Koc B. Multimaterial bioprinting approaches and their implementations for vascular and vascularized tissues. *Bioprinting* [Internet]. 2021;24(March):e00159. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bprint.2021.e00159>
 16. Addario G, Djudjaj S, Farè S, Boor P, Moroni L, Mota C. Microfluidic bioprinting towards a renal in vitro model. *Bioprinting*. 2020;20(July).
 17. Mao Q, Wang Y, Li Y, Juengpanich S, Li W, Chen M, et al. Fabrication of liver microtissue with liver decellularized extracellular matrix (dECM) bioink by digital light processing (DLP) bioprinting. *Mater Sci Eng C* [Internet]. 2020;109(December 2019):110625. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110625>
 18. Zhang X, Liu Y, Luo C, Zhai C, Li Z, Zhang Y, et al. Crosslinker-free silk/decellularized extracellular matrix porous bioink for 3D bioprinting-based cartilage tissue engineering. *Mater Sci Eng C* [Internet]. 2021;118(August 2020):111388. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111388>
 19. Toprakhisar B, Nadernezhad A, Bakirci E, Khani N, Skvortsov GA, Koc B. Development of Bioink from Decellularized Tendon Extracellular Matrix for 3D Bioprinting. *Macromol Biosci*. 2018;18(10):1–12.
 20. Zhao F, Cheng J, Zhang J, Yu H, Dai W, Yan W, et al. Comparison of three different acidic solutions in tendon decellularized extracellular matrix bio-ink fabrication for 3D cell printing. *Acta Biomater*. 2021;131:262–75.
 21. Zhu M, Li W, Dong X, Yuan X, Midgley AC, Chang H, et al. In vivo engineered extracellular matrix scaffolds with instructive niches for oriented tissue regeneration. *Nature*. 2019;10(4621).
 22. Berthet E, Chen C, Butcher K, Schneider RA, Alliston T, Amirtharajah M. Smad3 binds Scleraxis and Mohawk and regulates tendon matrix organization. *J Orthop Res*. 2013;31(9):1475–83.
 23. Yang F, Zhang A, Richardson DW. Regulation of the tenogenic gene expression in equine tenocyte-derived induced pluripotent stem cells by mechanical loading and Mohawk. *Stem Cell Res* [Internet]. 2019;39(June):101489. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.scr.2019.101489>
 24. Otabe K, Nakahara H, Hasegawa A, Matsukawa T, Ayabe F, Onizuka N, et al.

- Transcription factor mohawk controls tenogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in vitro and in vivo. *J Orthop Res*. 2015;33(1):1–8.
25. Haramshahi SMA, Bonakdar S, Moghtadaei M, Kamguyan K, Thormann E, Tanbakooei S, et al. Tenocyte-imprinted substrate: A topography-based inducer for tenogenic differentiation in adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Biomed Mater*. 2020;15(3).
 26. Islam A, Mbimba T, Younesi M, Akkus O. Effects of substrate stiffness on the tenoinduction of human mesenchymal stem cells. *Acta Biomater* [Internet]. 2017;58:244–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2017.05.058>
 27. Sankar D, Mony U, Rangasamy J. Materials Science & Engineering C Combinatorial effect of plasma treatment , fiber alignment and fiber scale of poly (ϵ -caprolactone)/ collagen multiscale fibers in inducing tenogenesis in non-tenogenic media. 2021;127(May).
 28. Su Y, Denbeigh JM, Camilleri ET, Riester SM, Parry JA, Wagner ER, et al. Extracellular matrix protein production in human adipose-derived mesenchymal stem cells on three-dimensional polycaprolactone (PCL) scaffolds responds to GDF5 or FGF2. *Gene Reports* [Internet]. 2018;10(September 2017):149–56. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2017.12.004>
 29. Bi Y, Ehrichtiou D, Kilts TM, Inkson CA, Embree MC, Sonoyama W, et al. Identification of tendon stem/progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche. *Nat Med*. 2007;13(10):1219–27.
 30. Danielson KG, Baribault H, Holmes DF, Graham H, Kadler KE, Iozzo R V. Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility. *J Cell Biol*. 1997;136(3):729–43.
 31. Corsi A, Xu T, Chen XD, Boyde A, Liang J, Mankani M, 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. *J Bone Miner Res*. 2002;17(7):1180–9.
 32. Deniz P, Guler S, Çelik E, Hosseinian P, Aydin HM. Use of cyclic strain bioreactor for the upregulation of key tenocyte gene expression on Poly(glycerol-sebacate) (PGS) sheets. *Mater Sci Eng C* [Internet]. 2020;106(August 2018):110293. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110293>
 33. Kalson NS, Holmes DF, Herchenhan A, Lu Y, Starborg T, Kadler KE. Slow stretching that mimics embryonic growth rate stimulates structural and

- mechanical development of tendon-like tissue in vitro. *Dev Dyn*. 2011;240(11):2520–8.
34. Zhang X, Yang M, Lin L, Chen P, Ma KT, Zhou CY, et al. Runx2 overexpression enhances osteoblastic differentiation and mineralization in adipose - Derived stem cells in vitro and in vivo. *Calcif Tissue Int*. 2006;79(3):169–78.
 35. Rajpar I, Barrett JG. Multi-differentiation potential is necessary for optimal tenogenesis of tendon stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2020;11(1):1–12.
 36. Chen S, Wang J, Chen Y, Mo X, Fan C. Tenogenic adipose-derived stem cell sheets with nanoyarn scaffolds for tendon regeneration. *Mater Sci Eng C* [Internet]. 2021;119(September 2020):111506. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111506>
 37. Xiao W, Le Q, Zhu D, Dighe A, Cui Q, Yang X. Association of Fpr1 gene expression with osteogenesis and adipogenesis of adipose derived stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2021;574:33–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.08.044>
 38. Gonçalves AI, Rodrigues MT, Gomes ME. Tissue-engineered magnetic cell sheet patches for advanced strategies in tendon regeneration. *Acta Biomater*. 2017;63:110–22.
 39. Theodossiou SK, Tokle J, Schiele NR. TGFβ2-induced tenogenesis impacts cadherin and connexin cell-cell junction proteins in mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019;508(3):889–93.
 40. Wang Y, Yang Y, Wang X, Kawazoe N, Yang Y, Chen G. The varied influences of cell adhesion and spreading on gene transfection of mesenchymal stem cells on a micropatterned substrate. *Acta Biomater* [Internet]. 2021;125:100–11. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.01.042>
 41. Ralphs JR, Waggett AD, 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 Biol*. 2002;21(1):67–74.
 42. Charrier EE, Pogoda K, Wells RG, Janmey PA. Control of cell morphology and differentiation by substrates with independently tunable elasticity and viscous dissipation. *Nat Commun*. 2018;9(1):1–13.
 43. Tanaka M, Morita S, Hayashi T. Role of interfacial water in determining the interactions of proteins and cells with hydrated materials. *Colloids Surfaces B*

- Biointerfaces [Internet]. 2021;198(October 2020):111449. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111449>
44. Costa-Almeida R, Berdecka D, Rodrigues MT, Reis RL, Gomes ME. Tendon explant cultures to study the communication between adipose stem cells and native tendon niche. *J Cell Biochem*. 2018;119(4):3653–62.
 45. Long C, Wang Z, Legrand A, Chattopadhyay A, Chang J, Fox PM. Tendon Tissue Engineering: Mechanism and Effects of Human Tenocyte Coculture With Adipose-Derived Stem Cells. *J Hand Surg Am*. 2018;43(2):183.e1-183.e9.
 46. Foglia ML, Mitarotonda R, De Marzi MC, Desimone MF. Silicified collagen materials: Modulation of the in vitro and in vivo response. *Mater Sci Eng C*. 2019;99(January):47–56.
 47. Zou D, Luo X, Han C zhen, Li J an, Yang P, Li Q, et al. Preparation of a biomimetic ECM surface on cardiovascular biomaterials via a novel layer-by-layer decellularization for better biocompatibility. *Mater Sci Eng C [Internet]*. 2019;96(January 2018):509–21. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.11.078>
 48. Martin KE, García AJ. Macrophage phenotypes in tissue repair and the foreign body response: Implications for biomaterial-based regenerative medicine strategies. *Acta Biomater*. 2021;133:4–16.
 49. Abaricia JO, Shah AH, Chaubal M, Hotchkiss KM, Olivares-Navarrete R. Wnt signaling modulates macrophage polarization and is regulated by biomaterial surface properties. *Biomaterials*. 2020;243(April 2019).
 50. Araújo-Gomes N, Romero-Gavilán F, Zhang Y, Martinez-Ramos C, Elortza F, Azkargorta M, et al. Complement proteins regulating macrophage polarisation on biomaterials. *Colloids Surfaces B Biointerfaces [Internet]*. 2019;181(February):125–33. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.05.039>

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.