

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**IMPLANTES DE MATRIZES DE COLÁGENO ISOLADAS OU
ASSOCIADAS ÀS CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS
MULTIPOTENTES AUTÓLOGAS NA REPARAÇÃO TENDÍNEA
EM OVINOS.**

Maria Cristina Hernandez Tovar

Orientador: Profa.Dra.Silvana Martinez Baraldi Artoni

Co-orientador: Prof.Dr. José Wanderley Cattelan

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias–Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Cirurgia Veterinária.

**JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Novembro de 2009**

H558i Hernández Tovar, María Cristina
Implantes de matrizes de colágeno isoladas ou associadas às células estromais mesenquimais multipotentes autólogas na reparação tendínea em ovinos. / Gilvan José Campelo dos Santos. – Jaboticabal, 2009
xx, 76 f. il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009
Orientador: Silvana Martinez Baraldi Artoni
Co-Orientador: José Wanderley Cattelan
Banca examinadora: Aparecida Maria Fontes, Ana Maria de Guzzi Plepis, Aureo Evangelista Santana, Antonio Carlos Alessi
Bibliografia

1. Células-tronco mesenquimais. 2. Matriz de colágeno. 3. Tendão flexor superficial. 4. Ovino. 5. Microscopia Eletronica de Varredural. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:617:636.3

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Maria Cristina Hernández Tovar, nascida em 05 de fevereiro de 1973 em Bogotá, Colômbia, formou-se médica veterinária pela Universidad de Ciencias Agropecuarias (Bogotá – Colômbia). Ingresso no programa de Pós-Graduação da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Jaboticabal em março de 2004. Em Julho de 2005 adquiriu o título de Mestre em Cirurgia Veterinária. Ingressou no curso de Doutorado no programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária.

DEDICATÓRIA

Aos Meus Pais, Ana María e José (jn memorian) pelo amor e dedicação durante todos os momentos da minha vida, permanecendo ao meu lado tanto nas vitórias quanto nas dificuldades.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Prof^a Dra. Silvana Martinez Baraldi Artoni pela confiança, apoio e preocupação. Muito obrigada.

Ao meu Co-orientador Prof. Dr. Jose Wanderley Cattelan pelo incentivo, ensinamentos e paciência na fase do experimento e pelas correções.

Ao Dr. Dimas Tadeu Covas e a Dra. Aparecida Fontes, pertencentes ao Hemocentro de Ribeirão Preto, pela valiosa colaboração no desenvolvimento de nosso experimento.

Aos funcionários e estudantes do Hemocentro de Ribeirão Preto, especialmente à Fernanda Ursoli Ferreira pela cooperação, dedicação e paciência.

A minha colega Maristela pela sua excelente colaboração durante as cirurgias sem a qual não teria conseguido levar adiante meu experimento e obtido meus resultados. Você foi muito importante. Obrigada.

A minhas queridas amigas colombianas Astrid Rivera e Andrea pelos conselhos, apoio e ajuda incondicional, e pela sua disposição de tempo.

Aos funcionários do Hospital Veterinário da FCAV, Carlos Roberto Januário, Arildo Pereira dos Santos, Roberto Bertanha, Marco Rogério, Edson Giangrecco, Laerte Sant'Anna de Oliveira, Isaias Pereira, José Carlos Busoli, Roberto Aparecido Pereira, Eugenio, pela indispensável ajuda no manejo dos carneiros.

A Claudia e Claudinha, funcionárias do laboratório de microscopia eletrônica da FCAV pelos bons momentos compartilhados durante o experimento e pelo incentivo e auxílio oferecidos.

Aos professores e Pós-Graduandos do Departamento de Morfologia Animal, pela convivência e amizade.

A todos os que puderam fazer parte deste momento, o meu sincero agradecimento.

À FAPESP, pelo importante auxílio financeiro.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE GRÁFICOS.....	xvii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xviii
RESUMO.....	xix
ABSTRACT.....	xx
1 INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
3. OBJETIVOS.....	8
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	9
4.1. FASE PRE-EXPERIMENTAL.....	9
4.1.1. Unidades experimentais.....	9
4.1.2. Protocolo anestésico.....	9
4.1.3. Obtenção e caracterização das membranas de colágeno.....	10
4.1.4. Coleta das células mononucleares da medula.....	11
4.1.4.1. Isolamento das CTMs de ovinos.....	11
4.1.4.2. Cultivo das CTMs de ovinos.....	13
4.1.4.3. Tripsinização.....	14
4.1.4.4. Expansão das CTMs de ovinos.....	14
4.1.4.5. Caracterização das CTMs de ovinos.....	15
A. Caracterização Imunofenotípica das CTMs.....	15
4.1.4.6. Ensaio de diferenciação celular.....	15
A. Diferenciação das CTMs em adipócitos.....	18
B. Diferenciação das CTMs em osteócitos.....	18
4.1.4.7. Produção lentiviral.....	20
4.1.4.8. Modificação Gênica das CTMs de ovinos.....	21
4.1.4.9. Protocolo imunofluorescência.....	24
4.2. FASE EXPERIMENTAL.....	24

4.2.1. Procedimentos cirúrgicos.....	24
4.2.1.1. Grupo controle (G1).....	24
4.2.1.2. Grupo submetido ao implante de matriz de colágeno (G2).....	25
4.2.1.3. Grupo submetido ao implante da matriz de colágeno associadas às CTMs (G3).....	25
4.2.2. Critérios usados nas avaliações clinica dos grupos experimentais....	25
4.2.3. Exames ultrassonográficos.....	28
4.2.4. Avaliação macroscópica dos implantes após o sacrifício.....	28
4.2.5. Avaliação histopatológica	29
4.2.6. Microscopia eletrônica de varredura.....	29
4.2.7. Análise morfométrica.....	30
4.2.8. Análise estatística.....	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
5.1. Resultados clínicos dos ovinos.....	35
5.2. Resultados ultrassonográficos	35
5.3. Resultados macroscópicos relativos à fibrose tendínea.....	38
5.4. Resultados histopatológicos.....	42
5.5. Resultados microscopia eletrônica de varredura	50
5.6. Análise morfométrica.....	54
7. CONCLUSÕES.....	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
APÊNDICES.....	67

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Valores absolutos, médios e desvios padrão das diferentes passagens de duplicações (PDs) no decorrer do tempo das CTMs de ovino, na cultura.....	31
Tabela 2. Porcentagens das CTMs apresentando o lentivirus 1054 GFP no citômetro de fluxo.....	32
Tabela 3. Valores densimétricos das CTMs da medula óssea dos ovinos durante as 19 passagens no decorrer de 109,2 dias.....	34
Tabela 4. Avaliação do numero de fibroblastos e desvio padrão do grupo controle (G1), do grupo tratado com implante da matriz de colágeno (G2) e no grupo com implante da matriz de colágeno associada às CTMs (G3) no tendão do músculo flexor superficial dos dedos de ovinos, durante o período experimental.....	55
Tabela 5. Avaliação do numero de fibrócitos e desvio padrão do grupo controle (G1), do grupo tratado com implante da matriz de colágeno (G2) e no grupo com implante da matriz de colágeno associada às CTMs (G3) no tendão do músculo flexor superficial dos dedos de ovinos, durante o período experimental.....	55
Tabela 6. Temperatura retal (°C) observada no pré-jejum e às 24 horas após a intervenção cirúrgica do grupo dos ovinos do grupo controle (G1), do grupo com implante da matriz de colágeno (G2) e no grupo com implante da matriz de colágeno associada às CTMs (G3).....	68

Tabela 7. Frequência cardíaca (nº de batimentos /minuto) observada no pré-jejum e às 24 horas após a intervenção cirúrgica do grupo dos ovinos do grupo controle (G1), do grupo com implante da matriz de colágeno (G2) e no grupo com implante da matriz de colágeno associada às CTMs (G3).....	69
Tabela 8. Frequência respiratória (nº de movimentos /minuto) observada no pré-jejum e às 24 horas após a intervenção cirúrgica do grupo dos ovinos do grupo controle (G1), do grupo com implante da matriz de colágeno (G2) e no grupo com implante da matriz de colágeno associada às CTMs (G3).....	70
Tabela 9. Contagens de hemácias (nº de células x 10 ⁶ /µL) observadas no pré-jejum dos ovinos do grupo controle (G1), do grupo com implante da matriz de colágeno (G2) e no grupo com implante da matriz de colágeno associada às CTMs (G3).....	71
Tabela 10. Hematócrito (%) observado no pré-jejum dos ovinos do grupo controle (G1), do grupo com implante da matriz de colágeno (G2) e no grupo com implante da matriz de colágeno associada às CTMs (G3).....	72
Tabela 11. Concentrações de hemoglobina (g/dL) observadas no pré-jejum dos ovinos do grupo controle (G1), do grupo com implante da matriz de colágeno (G2) e no grupo com implante da matriz de colágeno associada às CTMs (G3).....	73
Tabela 12. Contagens de leucócitos (nº células x 10 ³ /µL) observadas no pré-jejum dos ovinos do grupo controle (G1), do grupo com implante da matriz (G2) e no grupo com implante da matriz de colágeno associada às CTMs (G3).....	74

Tabela 13. Valores absolutos de basófilos (BAS), eosinófilos (EOS), neutrófilos bastonetes (NB), neutrófilos segmentados (NS), linfócitos (LINF) e monócitos (MON) observados no pré-jejum dos ovinos do grupo controle (G1), do grupo com implante da matriz (G2) e no grupo com implante da matriz de colágeno associada às CTMs (G3).....	75
---	----

Tabela 14. Valores plasmáticos de proteínas totais (g/dL) e fibrinogênio (mg/dL) observados no pré-jejum dos ovinos do grupo controle (G1), do grupo com implante da matriz de colágeno (G2) e no grupo com implante da matriz de colágeno associada às CTMs (G3).....	76
---	----

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Aspiração da medula óssea obtida da crista ilíaca de ovino SRD.....	12
Figura 2	Fotomicrografias do cultivo celular ilustrando a proliferação das células-tronco indiferenciadas de ovino. Intensa confluência celular (A). Células com prolongamentos citoplasmáticos e formatos fusiformes com núcleos grandes e centrais (B).....	16
Figura 3	Representação gráfica da caracterização das CTMs de Ovinos por citometria de fluxo. Utilizando-se o anticorpo CD44 e o anticorpo CD45. As CTMs apresentaram porcentagens de 86,66 para marcadores CD44 (células mesenquimais) e 2,16 para marcadores CD45 (células hematopoiéticas).....	17
Figura 4	Fotomicrografias da diferenciação celular das CTM em adipócitos (A) destacando os vacúolos de gordura e os núcleos dos adipócitos e (B) osteócitos.....	19
Figura 5	Fotomicrografias da marcação das CTMs de ovino. Células Hek 293T de rim usadas para a produção do lentivirus (A). Células 239T do rim transduzidas com os três plasmídios lentivirais (B). Cultivo de CTMs de ovinos (C). MSCs de ovinos traduzidas com o lentivirus 1054 GFP (D).....	22
Figura 6	Membrana de colágeno no meio de cultivo das CTMs de ovinos.....	23

Figura 7	Membrana de colágeno com CTMs de ovinos transduzidas com o lentivirus 1054 GFP.....	23
Figura 8	Vista palmar do membro torácico de ovino onde foi realizada tenectomia parcial no tendão do músculo flexor superficial dos dedos do membro torácico esquerdo dos ovinos do grupo G1. (A), (B), (C) e (D).....	26
Figura 9	Vista palmar antes (A) e após (B) a implantação da matriz de colágeno no tendão do Músculo Flexor superficial dos dedos do membro torácico esquerdo dos ovinos do grupo G2.....	27
Figura 10	Vista palmar antes (A) e após (B) a implantação da matriz de colágeno associada às CTMs no tendão do Músculo Flexor superficial dos dedos do membro torácico esquerdo de ovinos do grupo G3.....	27
Figura 11	Representação gráfica da porcentagem do lentivirus 1054 GFP nas CTMs de ovino, por citometria de fluxo.....	32
Figura 12	Fotomicrografia das CTMs no tendão flexor superficial dos dedos de ovino, expressando o lentivirus GFP, em microscópio de luz fluorescente. 40x.....	33
Figura 13	Avaliação ultrasonográfica do tendão do músculo flexor superficial dos dedos de ovinos no grupo G1 aos 30 (A), 60 (B) e 90 (C) dias, no grupo G2 aos 30 (D), 60 (E) e 90 (F) e no	

	grupo G3 aos 30 (G), 60 (H) e 90 (I) dias após cirurgia.....	37
Figura 14	Espessura do tendão do músculo flexor superficial dos dedos de ovinos. Tendão normal (A), grupo G1 (B), grupo G2 (C) e grupo G3 (D) aos 30 dias após a cirurgia.....	39
Figura 15	Espessura do tendão do músculo flexor superficial dos dedos de ovinos. Tendão normal (A), grupo G1 (B), grupo G2 (C) e grupo G3 (D) aos 60 dias após a cirurgia.....	40
Figura 16	Espessura do tendão do músculo flexor superficial dos dedos de ovinos. Tendão normal (A), grupo G1(B), grupo G2 (C) e grupo G3 (D) aos 90 dias após a cirurgia.....	41
Figura 17	Fotomicrografias do tendão flexor superficial dos dedos do membro torácico de ovinos. Tendão normal (A). Tendão do grupo controle G1 (B), tendão do grupo com implante da matriz de colágeno G2 (C) e tendão do grupo com implante da matriz de colágeno associada às CTMs G3 (D) aos 30 dias após o procedimento cirúrgico evidenciando a presença de abundantes fibroblastos e a organização das fibras colágenas. Coloração HE. Aumento de 100x.....	43
Figura 18	Fotomicrografias do tendão flexor superficial dos dedos do membro torácico de ovinos. Tendão normal (A). Tendão do grupo controle G1 (B), tendão do grupo com implante da matriz de colágeno G2 (C) e tendão do grupo com implante da matriz de colágeno associada às CTMs G3 (D) aos 60 dias após o procedimento cirúrgico mostrando fibroblastos e a organização das fibras colágenas. Coloração HE. Aumento de	

100x.....	44
Figura 19 Fotomicrografias do tendão flexor superficial dos dedos do membro torácico de ovinos. Tendão normal (A). Tendão do grupo controle G1 (B), tendão do grupo com implante da matriz de colágeno G2 (C) e tendão do grupo com implante da matriz de colágeno associada às CTMs G3 (D) aos 90 dias após o procedimento cirúrgico mostrando quantidade de fibroblastos e a organização das fibras colágenas. Coloração HE. Aumento de 100x.....	45
Figura 20 Fotomicrografia do tendão flexor superficial dos dedos do membro torácico de ovinos, evidenciando a organização das fibras colágenas do tendão normal (A), tendões do grupo G1 (B), tendões do grupo G2 (C) e tendões do grupo G3 (D) aos 30 dias em microscópio de luz polarizada. Coloração PS. Aumento de 20x.....	47
Figura 21 Fotomicrografia do tendão flexor superficial dos dedos do membro torácico de ovinos, apresentando a organização das fibras colágenas do tendão normal (A), tendões do grupo G1 (B), tendões do grupo G2 (C) e tendões do grupo G3 (D) aos 60 dias em microscópio de luz polarizada. Coloração PS. Aumento de 20x.....	48
Figura 22 Fotomicrografia do tendão flexor superficial dos dedos do membro torácico de ovinos, evidenciando a organização das fibras colágenas do tendão normal (A), tendões do grupo G1 (B), tendões do grupo G2 (C) e tendões do grupo G3 (D) aos 90 dias em microscópio de luz polarizada. Coloração PS. Aumento de 20x.....	49

- Figura 23** Eletronmicrografias do tendão flexor superficial dos dedos do membro torácico de ovinos ilustrando a disposição das fibras colágenas regulares do tendão normal (A), e o arranjo irregular dos tendões no grupo controle G1 (B), com o implante da matriz de colágeno G2 (C) e com implante da matriz de colágeno associada às CTMs G3 (D) aos 30 dias após a cirurgia..... 51
- Figura 24** Eletronmicrografias do tendão flexor superficial dos dedos do membro torácico de ovinos ilustrando a disposição das fibras colágenas regulares do tendão normal (A), e o arranjo irregular dos tendões no grupo controle G1 (B), com o implante da matriz de colágeno G2 (C) e com implante de matriz de colágeno associada às CTMs G3 (D) aos 60 dias após a cirurgia..... 52
- Figura 25** Eletronmicrografias do tendão flexor superficial dos dedos do membro torácico de ovinos ilustrando a disposição das fibras colágenas regulares do tendão normal (A), e o arranjo irregular dos tendões no grupo controle G1 (B), com o implante da matriz de colágeno G2 (C) e com implante da matriz de colágeno associada às CTMs G3 (D) aos 90 dias após a cirurgia..... 53

LISTA DE GRÁFICOS**página**

Gráfico 1	Média e desvio padrão da proliferação celular e do tempo das CTMs de ovinos, na cultura (A e C) e dos valores médios de todos os ovinos (B e D).....	31
Gráfico 2	Representação gráfica da densidade das CTMs de ovinos obtidos nas 19 passagens no decorrer de 109,2 dias.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS

CMNs	Células mononucleares
CTMs	Células-tronco mesenquimais
FGFb	Fator básico de crescimento fibroblástico
TGFβ_3	Fator transformador de crescimento beta
MEC	Matriz extracelular
PBS	Solução salina tamponada
PPT	Proteínas plasmáticas totais
SRD	Sem raça definida
SFB	Soro fetal bovino
TMFSD	Tendão do músculo flexor superficial dos dedos

IMPLANTES DE MATRIZES DE COLÁGENO ISOLADAS OU ASSOCIADAS ÀS CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS MULTIPOTENTES AUTÓLOGAS NA REPARAÇÃO TENDÍNEA EM OVINOS.

RESUMO

Este projeto tem como proposta avaliar o comportamento biológico das células estromais mesenquimais multipotentes autólogas associadas ou não às matrizes de colágeno, na reconstrução tendínea. Optou-se em trabalhar com ovinos e, para isso, os ovinos foram submetidos à ferida no tendão flexor superficial do membro torácico esquerdo, que consistiu na realização de uma tenectomia parcial medindo 1,5cm de comprimento e 0,3cm de largura. Aos 30, 60 e 90 dias após o procedimento cirúrgico foram retirados os tendões flexores superficiais dos membros torácicos dos animais e os fragmentos colhidos foram destinados para procedimento histológico, e de microscopia eletrônica de varredura. Nas avaliações histopatológicas evidenciou-se aumento na quantidade de fibroblastos aos 30, 60 e 90 dias após a intervenção cirúrgica, além de uma desorganização severa da matriz colágena nos diferentes grupos. A microscopia eletrônica de varredura mostrou nos tendões do grupo controle (G1) aos 30, 60 e 90 dias após o procedimento cirúrgico, fibras colágenas finas, ramificadas com perda do arranjo, quando comparadas com as fibras colágenas do tendão normal. O grupo G2 apresentou melhor organização das fibras, porém similares às observadas no G1. Já no grupo G3 a melhor organização e arranjo das fibras colágenas foram evidentes. Dessa maneira, esses resultados permitem inferir que a engenharia de tecidos utilizando CTMs associadas a enxertos biológicos apresentam tratamento clínico promissor para a reparação de tendões.

Palavras chave: Células-tronco mesenquimais, matriz de colágeno, ovino, tendão flexor superficial, microscopia eletrônica de varredura.

IMPLANTS OF COLLAGEN SCALFOLD ISSOLATED OR ASSOCIATED WITH AUTOLOGOUS MESENCHYMAL STROMAL CELLS IN TENDONS REPAIR IN SHEEPS.

ABSTRAC

This project has as purpose to pick, cultivate, characterize and study the biological behavior of the Mesenchymal Stem Cells and the collagen scalfold, in the reconstruction of the connective tissue Tendons. It was decided to work with sheep and, therefore, three treatments were accomplished using Autologous Mesenchymal Stem Cells and applied in the superficial flexor tendon of the left thoracic member of the sheep, injured for the experience. The sheep were submitted to the wound in the superficial flexor tendon of the left thoracic limb that consisted of an accomplishment of a partial tenectomy measuring 1,5cm of length and 0,3cm of width. After 30, 60 and 90 days after the surgical procedure, the superficial flexor tendons of the left thoracic limb of the animals were withdrawn and the picked fragments were sent to histology procedure, and Scan electron microscopy. In the histopatology evaluations, there was an increase of fibroblast amount after 30, 60 and 90 days after the surgical intervention of the control group (G1), the one treated with collagen scalfod, and the one treated with collagen scalfold associated to the Mesenchymal Stem Cells, besides of sever disorganization of the main collage which was more severe at the 30 days in the different groups when compared to the normal tissue. The Scan electron microscopy showed in the tendons of the control group (G1) after, 30, 60 and 90 days after the surgical procedure thin collagen fibers, ramified with lose of arrangement, when compared to the collagen fibers of the normal tendon. Group G2 showed better organization of the fibers, however, similar to the ones observed in G1. In G3, the best organization and arrangement of the collagen fibers were evident. Finally, it can be verified that the implantation of collagen scalfold associated to Mesenchymal Stem Cells is of great importance to the wound healing.

Keywords: Mesenchymal stem cells, collagen graft, sheep, flexor superficial tendon.

1. INTRODUÇÃO

Grandes avanços na reparação de lesões tendíneas têm ocorrido nas últimas décadas, representados, em grande parte, por um interesse crescente no uso de membranas biológicas, e de células-tronco em terapia de doenças degenerativas ou que apresentem resposta pobre aos tratamentos tradicionais. Esta técnica é denominada de terapia celular, constituindo-se como objeto de estudo multidisciplinar, para a solução de diferentes problemas nas cirurgias humana e veterinária.

Os tendões dos equinos são agredidos por etiologias diversas, que se manifestam por problemas degenerativos e inflamatórios em diferentes graus de intensidade. Acredita-se que, fisiologicamente, os tendões são submetidos à tensão de modo elástico, não sendo lesados (ALVES; MIKAIL, 2006). A função do tendão é transmitir a ação do músculo ao osso. Além da sua principal função, outras lhe são atribuídas como amplificação dinâmica durante as contrações musculares rápidas, reserva de energia elástica e atenuação de forças durante movimentos abruptos e inesperados (McILWRAITH, 1994).

Dentre as injúrias do sistema músculo-esquelético, uma das mais frequentes e mais complicada, é a tendinopatia que acomete o tendão flexor superficial dos dedos (TFS), pois o tempo de recuperação pode ser longo e a cicatrização é reparadora e não regeneradora. Em animais da raça Puro Sangue Inglês são observados índices de até 13% de casos de tendinopatias do TFDS, dentre as causas de afastamento das pistas. Dessas tendinopatias, 25% ocorrem antes da primeira corrida do potro (ROONEY e GENOVESE, 1981) e, além disso, dos animais que retornam ao treinamento após a recuperação da tendinite, cerca de 70% não conseguem competir em páreos (OIKAWA e KASASHINA, 2002).

A dificuldade na reparação de lesões de tendões e ligamentos devido a sua pobre oxigenação, irrigação e nutrição em animais que praticam esportes, é uma das causas que requer de maior atenção pelo seu comprometimento no alto custo que estes animais representam além do seu desenvolvimento atlético.

As injúrias do sistema músculo-esquelético em eqüinos apresentam alta frequência, especialmente em animais que participam de atividades esportivas, resultando no seu afastamento temporário dos treinos, altas taxas de recidiva das lesões e o alto custo de manutenção durante o tempo de recuperação, e possivelmente, final de sua carreira atlética.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O músculo flexor superficial dos dedos divide-se em duas partes superficial e profunda. Sua origem é no epicôndilo medial do úmero, ao nível do carpo a parte profunda está unida ao tendão do músculo flexor profundo dos dedos, por meio do músculo interflexor proximal. Este músculo possui dois tendões que correm na face palmar do carpo e do metacarpo, sendo que o tendão superficial passa no interior do ligamento anular do carpo, enquanto que o tendão da parte profunda passa pelo canal do carpo, onde está unido ao tendão do músculo flexor profundo dos dedos pelo músculo interflexor distal. No terço distal do metacarpo, os tendões fundem-se num curto tendão comum. Após, este se divide num ramo para cada dedo principal. Ao nível dos sesamóides, cada ramo une-se a parte superficial do músculo interósseo III e IV, constituindo um canal fibroso para o tendão do músculo flexor profundo dos dedos. Flexiona as articulações metacarpofalângica e interfalângica proximal e auxilia na sustentação do corpo do animal sendo suas ações principais. O suprimento sanguíneo é fornecido pelas artérias ulnar colateral, braquial, interóssea caudal e interóssea cranial. Os nervos ulnar, e mediano são os encarregados do suprimento nervoso do flexor dos dedos (GETTY, 1996).

Os tendões são estruturas cilíndricas alongadas formadas por tecido conjuntivo denso modelado que ligam os músculos esqueléticos aos ossos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995). Consistem em feixes paralelos de fibras colágenas firmemente

agrupadas, apresentando entre as mesmas, fileiras de fibroblastos (ENWEMEKA, 2001), orientando as fibras do tendão e tornando-o resistente a resposta tensora. Esses feixes primários se agrupam em feixes secundários ou fascículos e estes, por sua vez, se agregam em grandes feixes tendíneos terciários. O endotendão, que consiste em trabéculas de tecido conjuntivo frouxo, situa-se entre os feixes tendíneos e conduz vasos sangüíneos, linfáticos e nervos. Esta estrutura é uma extensão do epitendão, uma camada delicada de tecido conjuntivo frouxo que reveste a superfície tendínea. Externamente ao epitendão, o tendão é revestido por uma bainha de tecido conjuntivo vascular frouxo o paratendão ou, onde há uma mudança de direção ou fricção aumentada, por uma bainha tendínea com o mesotendão (McILWRAITH, 1994).

Os fibroblastos (tenócitos) são as células principais do tendão, encarregadas de secretar as fibras colágenas, e os componentes da matriz extracelular controlando sua manutenção (ALVES; MIKAIL, 2006). A unidade básica do tendão são as fibras colágenas predominantemente do tipo I com uma pequena proporção dos tipos III e V (GOODSHIP *et al.*, 1994). Além do colágeno, os tendões apresentam, em sua composição, proteínas estruturais como a elastina e os glicosaminoglicanos que fazem parte da matriz extracelular. O processo de reparação do tendão pode prover uma arquitetura de tendão normal, porém, dificilmente irá reproduzir a formação prévia ou retornará às suas propriedades mecânicas originais de deslizamento sobre os tecidos vizinhos (MACHADO *et al.*, 2000). McILWRAITH (1994) relata que o tendão é uma estrutura dinâmica que renova todo o seu colágeno a cada seis meses.

O tendão recebe suprimento vascular de pequenas arteríolas de músculos adjacentes que se ramificam longitudinalmente entre os fascículos e no local da inserção óssea com vasos originados do osso e do periósteo. O músculo e o osso, porém, suprem apenas 25% do aporte de sangue para o tendão nas regiões proximal e distal. Desta forma, a maior parte do tendão adquire suprimento sanguíneo regional ou segmentar de vasos oriundos do mesotendão ou paratendão.

As propriedades físicas dos tendões incluem força de tensão, flexibilidade e elasticidade. No tendão ocorre inicialmente extensão relativamente grande a partir de aumento discreto da força, resultando, assim, em deformação não linear. A seguir, ocorre deformação linear, onde cada aumento na força resulta em aumento equivalente

na extensão. Nessas regiões, o tendão irá se recuperar, quando a carga for removida, sem lesões, comportando-se como um sistema elástico (GOODSHIP *et al.*, 1994; ALVES; MIKAIL, 2006). Segundo McILWRAITH (1994), os tendões possuem grande resistência às tensões e baixa extensibilidade e, em sua atividade fisiológica, nunca excede o seu limite elástico.

Alguns tendões passam ao redor das polias dos ossos recebendo forças de compressão e tensão (MERRILESS e FLINT, 1980; VOGEL e KOOB, 1989). Nas regiões sobre compressão, tais tendões apresentam aumento na quantidade de proteoglicanas como também de colágeno tipo II e distribuição de feixes de colágeno tipo I associados com colágeno tipo II e V (VAN DER REST e GARRONE, 1991). As células dos tendões e ligamentos podem sofrer modificações físicoquímicas de sua matriz extracelular em resposta à força de compressão, que leva à formação de matriz fibrocartilaginosa (BENJAMIN e RALPHS, 1998).

A causa mais comum de tendinite é o esforço exagerado de extensão sobre os tendões, ocorrendo distensão de suas fibras que, por não suportarem a tração mecânica, podem apresentar rupturas parciais desenvolvendo intensa e dolorosa reação inflamatória local (THOMASSIAN, 1999). Essas rupturas resultam em hemorragia de arteríolas e capilares locais e formação de hematoma no interior do tendão, podendo estender-se para o paratendão. O resultado imediato é a deposição de fibrina, que atrai neutrófilos para a região. Congestão e acúmulo de fluidos ocorrem no local da agressão, podendo ser observados também, isquemia e necrose de tenócitos. Esta necrose varia de acordo com o grau de comprometimento vascular (ALVES; MIKAIL, 2006).

Por apresentar baixa vascularização, oxigenação e nutrição, o tendão possui diminuta capacidade de regeneração (ENWEMEKA, 1989). Segundo MAFFULI *et al.* (2002), apesar do intenso remodelamento do tendão, após a lesão, a regeneração completa não é alcançada, pois as fibras de colágeno que substituem a lesão apresentam diâmetro menor, resultando em redução na força biomecânica do tendão.

A cicatrização intrínseca do tendão está baseada nos fibroblastos que rodeiam as bandas tendinosas e pela irrigação intrínseca, que nutre aproximadamente 25% do tendão. Já a cicatrização extrínseca é o resultado da estimulação do tecido

peritendíneo de maneira a ocorrer proliferação de células e capilares necessária a cicatrização tendínea, sendo este processo responsável pelas aderências do tendão às estruturas que o rodeiam e 90% da reparação é fornecida pela cicatrização extrínseca (McILWRAITH, 1994).

A terapia celular, bem como a engenharia de tecidos provê opções novas de tratamento para o reparo de tecidos lesados. Neste último caso, há adição de células a vários veículos e de estímulos mecânicos e químicos na cultura, para tentar criar tecidos de reparação seguros e funcionais (BUTLER et al., 2000). A aplicação de concentrações elevadas de células-tronco mesenquimais (CTMs), indiferenciadas, nos defeitos do tecido conectivo mostrou-se promissora nos estudos feitos em animais para a reparação de osso, cartilagem e tendão (WAKITANI et al., 1994; YOUNG et al., 1998; AWAD et al., 1999; RICHARDS et al., 1999; AWAD et al., 2003).

Para ser definida como célula-tronco multipotente, a célula deve ter a capacidade de se auto-renovar e a habilidade de gerar uma progênie de múltiplas linhagens celulares. As células-tronco mesenquimais (CTMs) estão presentes em uma variedade de tecidos, incluindo a medula óssea, o sangue, o músculo, o tecido adiposo (PITTINGER et al., 1999; GRONTHOS et al., 2001) e outros tecidos conectivos (OWEN 1988; DENNIS et al., 1999). Geralmente são isoladas da medula óssea, mas podem ser obtidas dos tecidos musculares, adiposo ou sinovial e podem ser multiplicadas fora do animal sem perda do fenótipo ou da multipotencialidade (PEREIRA et al., 1995).

A medula óssea contém duas populações prototípicas de células-tronco, as caracterizadas como células-tronco hematopoiéticas que dão origem as células de todas as linhagens do sangue e podem reconstituir o sistema hematopoiético de ratos irradiados (TILL e McCOULOD, 1961), e as células-tronco mesenquimais do estroma da medula do osso que dão sustentação estrutural e funcional à hematopoiese (TAVASSOLI e FRIEDENSTEIN, 1983). Esta última população de células é derivada do estroma complexo e são conhecidas como Células-tronco Mesenquimais (CTMs), que podem se diferenciar em múltiplas linhagens celulares de origem mesodérmica (PROCKOP, 1997). A evidência definitiva de que a medula óssea contém células com a

capacidade de se diferenciar em fibroblastos e outras células mesodérmicas foi proposta primeiramente por FRIEDENSTEIN et al., (1976).

Os enxertos contendo células-tronco mesenquimais, da medula óssea, são considerados os de melhores resultados pós-operatórios pelas propriedades osteogênicas e osteoindutivas das referidas células (SIMION et al., 2004). Experimentos realizados demonstraram que aplicações de gel de colágeno associado às CTMs, nos defeitos de tendões, apresentaram melhoria da estrutura e da função biomecânica (YOUNG et al., 1998; AWAD et al., 2003).

AWAD et al., (1999, 2003), comparando a efetividade de géis de colágeno contendo ou não CTMs, relataram que a deposição sobre a falha do tendão patelar de coelho aumentou as propriedades biomecânicas deste como força e resistência ao estresse máximo. Neste estudo os tendões tratados desenvolveram focos ectópicos de tecido ósseo independente de concentração de células-tronco utilizada ou do tempo decorrido após a intervenção cirúrgica.

A adição de células-tronco às membranas com quitosana e $TGF\beta_3$ em ovino para reparação de cartilagem, apresentou produção de colágeno tipo II, proliferação celular e observou-se integração do tecido novo com a cartilagem do animal em estudo. Sendo que quando comparado com a implantação de MSC ou de enxertos sem a presença do $TGF\beta_3$ foi observada uma pobre reparação da falha parcial da cartilagem (MRUGALA et al., 2007).

Outros métodos usados na reparação de tendões e ligamentos dizem respeito aos biomateriais sintéticos, que incluem as cerâmicas, metais, polímeros sintéticos e biomateriais naturais, que dizem respeito aos biopolímeros tais como: colágeno, seda, queratina, polissacarídeos e tecidos naturais (SILVER et al., 1989). Os requisitos fundamentais para se utilizar materiais em organismos vivos incluem a biocompatibilidade, a estabilidade, a reprodutibilidade e, em algumas situações, a biodegradabilidade (FOLKMANN, 1990).

O colágeno é uma proteína bem conhecida, bastante usada em aplicações médicas, sendo do tipo I, o principal componente do tecido conectivo dos mamíferos, correspondendo a 30% do total das proteínas corporais. Este colágeno, pelas suas propriedades de biodegradação e biocompatibilidade, pode ser empregado de várias

formas como gel, esponja, fibra e filme na área de engenharia de tecidos e é isolado da pele de vários animais incluindo bovino, rã, peixe e porco e de tendões de eqüinos (YUNG e LIU, 2005).

Apresenta a função de orientar tecidos em desenvolvimento, além da formação de fibras insolúveis com alta resistência elástica. Possui carga nula que pode ser alterada por reações de esterificação originando matrizes carregadas positiva (matrizes catiônicas) ou negativamente (matrizes aniônicas) que podem ser obtidas por succinilação, tratamento com glutaraldeído, desaminação do grupo α -amino da lisina, proteção dos grupos guanidinos dos resíduos de arginina ou mediante hidrólise seletiva dos grupos amida das cadeias laterais dos resíduos de asparaginas e glutamina de proteínas (KASAL, S, 1982).

As matrizes extracelulares (MEC) podem ser de natureza sintética ou derivada de materiais naturais e devem possuir algumas características para estimular adequadamente a proliferação celular como biocompatibilidade, sustentação do crescimento celular, propriedades mecânicas adequadas ao local destinado e permitir a associação destas matrizes tridimensionais com fatores de crescimento (VATS et al., 2003).

Utilizando-se de matrizes extracelulares naturais que são constituídas por colágeno, elastina e proteoglicanas pode-se desenvolver MECs artificiais, pois esses polímeros interagem com receptores específicos na superfície celular (FARELLY et al., 1999; GRINNELL et al., 1999), participando ativamente dos processos que regulam a expressão fenotípica da célula, proporcionando remodelagem (KATO, 1983; TROJANOWSCA et al., 1998).

O uso de enxertos biológicos pode ser benéfico para a reconstrução de ligamentos ou tendões. A sobrevivência de um enxerto autólogo vai depender da adequada nutrição, uma vez que o enxerto está desprovido de circulação. Para sobreviver e incorporar-se a sua nova posição, o enxerto deve adquirir um suprimento sanguíneo local (MADDEN, 1970).

VALDÉS-VASQUEZ et al., (1996), usaram enxertos autógenos, já CRAWFORD & INGLE (1997), WANG (1998) utilizaram implantes sintéticos em eqüinos com bons resultados funcionais. Os experimentos dos diferentes autores demonstram que

principalmente no caso de enxertos autólogos ou heterólogos, a grande barreira concerne na antigenicidade dessas estruturas.

O implante de duramáteres bovina e suína conservadas em glicerina, na bainha do músculo reto abdominal de cães, foi avaliado sem observar-se sinal de rejeição (INATOMI et al., 1980). Já CORONADO et al., (1998) estudaram a esterilização de metatarsos de gatos e concluíram que o óxido de etileno e a glicerina são inadequados para esterilização do vírus da leucemia felina na cortical de enxertos ósseos.

GUEDES e AMARAL (1998), ao estudarem as propriedades da matriz de colágeno associado ao alginato em úlceras venosas evidenciaram o rápido fechamento destas e a diminuição de sua recorrência.

O uso experimental da biomembrana de látex da seringueira com finalidade terapêutica foi realizado inicialmente como substituto do esôfago cervical de cães, evidenciando aumento na vascularização, epitelialização e neoformação da mucosa esofágica, e quando banhada com polilisina, possuindo risco baixo de transmissão de doenças em relação a outros materiais provenientes de tecidos animais (MRUÉ, 1996).

SAINI et al., (1998) testaram a eficácia do plasma homólogo contendo ampicilina, na conservação de segmentos de tendão flexor digital superficial de burros e concluíram ao exame histológico, que não houve rejeição do sítio receptor.

Uma variedade de materiais biológicos e não biológicos têm sido pesquisados na reparação de tendões e ligamentos; entre eles estão os enxertos de tecidos, as fibras sintéticas e biológicas e os biomateriais produzidos pela engenharia de tecidos (KOOB, 2002).

3. OBJETIVOS

Estudar o comportamento biológico de enxertos de membranas de colágeno associadas ou não às células-tronco autólogas na regeneração do tendão do músculo flexor superficial dos dedos do membro torácico de ovinos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. FASE PRÉ-EXPERIMENTAL

Os ovinos foram submetidos a um período de adaptação prévio de aproximadamente 60 dias, sendo que os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética e Bem Estar Animal (CEBEA/UNESP, protocolo nº 005699-07), para posterior início das fases experimentais.

4.1.1. Unidades experimentais

Neste estudo foram utilizados 21 ovinos sem raça definida (SRD), machos, castrados, hígidos, mantidos em baias com acesso a água, sal mineral, feno de Coast Cross e alfafa, além da ração balanceada fornecida uma vez ao dia.

Os ovinos apresentando idade entre 12 e 18 meses e com pesos entre 35 e 40 kg foram submetidos à tenectomia parcial (falha de 1,5cm de comprimento e 0,3cm de largura) no tendão do músculo flexor superficial dos dedos do membro torácico esquerdo de ovinos. Esses animais distribuíram-se em três grupos de sete animais, respectivamente, sendo o grupo um (G1) utilizado como o controle do processo de cicatrização normal, o grupo dois (G2) avaliado com enxerto da matriz de colágeno e o grupo três (G3) com o enxerto da matriz de colágeno associado às células-tronco mesenquimais (CTMs).

Para as diferentes avaliações realizadas no decorrer do período experimental (aos 30, 60 e 90 dias após o procedimento cirúrgico), foram utilizados dois ovinos aos 30 e 60 dias, respectivamente e três ovinos aos 90 dias.

4.1.2. Protocolo anestésico

O protocolo anestésico consistiu na administração, por via intramuscular, de 0,5 mg/kg de cloridrato de xilazina a 2%. Decorridos 15 minutos, induziu-se à anestesia

geral pela administração intravenosa de cloridrato de quetamina 5%, na dose de 1mg/kg.

Em seguida foi introduzido um cateter¹ na veia jugular dos ovinos para manutenção anestésica pela administração, por infusão contínua, de anestesia total intravenosa (TIVA), na dose de 2 mL/kg/hora. A solução anestésica empregada foi constituída por solução de glicose a 5% contendo 50mg/mL de éter gliceril guaiacol e 1mg/mL de cloridrato de quetamina.

Após o início da infusão anestésica, os animais foram submetidos à intubação orotraqueal com sonda de Magill de diâmetro adequado, por onde foi administrado oxigênio, num fluxo de 50 ml/kg/min, para proporcionar a ventilação dos animais durante o procedimento cirúrgico.

Jejuns alimentar e hídrico foram de 48 e 24 horas, respectivamente.

4.1.3. Obtenção e caracterização das matrizes de colágeno

As matrizes de colágeno foram obtidas mediante preparo de tendões de bovinos, oriundos de matadouro comercial da cidade de Taquaritinga. A preparação da matriz de colágeno foi realizada no Laboratório de Bioquímica e Biomateriais da USP de São Carlos, sob a orientação da Profa. Dra. Ana Maria Plepis.

Após a remoção, mediante secções na altura da região metatarsofalangeana, os tendões flexores superficiais dos dedos de bovinos, foram lavados várias vezes em solução fisiológica a 0,9% a fim de retirar o excesso de sangue presente. Em seguida, os referidos tendões, permaneceram imersos em solução fisiológica durante quatro horas, trocada a cada hora, e posteriormente os tendões foram mantidos sob refrigeração.

O material assim obtido e preservado foi tratado com uma solução alcalina contendo hidróxidos, sulfatos e cloretos de Na⁺, K⁺ e Ca²⁺ por um período de 72h, a 25°C. Em seguida, as matrizes obtidas foram equilibradas com solução de cloretos e sulfatos de K⁺, Na⁺ e Ca²⁺, seguido de lavagens com ácido bórico 3%, água destilada, EDTA 0,3% a pH 11 e água deionizada até obter o pH constante e equilibradas em

¹ Catéter BD Insyte 22GA-Becton, Brasil

tampão fosfato $0,13 \text{ molL}^{-1}$ pH 7,4, lavadas com água deionizada, congeladas e liofilizadas.

4.1.4. Coleta das células mononucleares da medula

A coleta da medula óssea de ovino foi realizada sob anestesia geral, após a tricotomia da região glútea e preparo do campo operatório, conforme a técnica antisséptica de rotina, mediante utilização de álcool 70% e solução de povidona-iodo. A aspiração da medula óssea foi conduzida na crista ilíaca dos seis animais, por intermédio de um procedimento cirúrgico estéril. Para isso foram utilizadas agulhas de Rosenthal, acopladas a seringas de 20ml, previamente heparinizadas (figura 1). A quantidade coletada de cada amostra foi um total de 20 ml para cada animal, sendo obtido em parcelas de cinco ml, objetivando a preservação celular.

4.1.4.1. Isolamento das CTMs de ovinos

A metodologia utilizada foi desenvolvida no laboratório de terapia gênica do Centro Regional de Hemoterapia do HCFMRP-USP de Ribeirão Preto, sob a orientação da Profa. Dra. Aparecida Maria Fontes, para isolamento das células mononucleares.

A técnica consistiu na separação por centrifugação em gradiente de *Ficoll-Hypaque* de densidade 1077 g/ml , descrito originalmente por Boyum (1968), porém com algumas modificações, descritas a seguir.

A amostra foi diluída em solução salina tamponada (PBS, *phosphate buffered saline*) até completar 30 ml. A seguir, foram lentamente acrescentados no fundo de cada tubo, 13 ml de Ficoll² sem misturar as fases líquidas.

As amostras foram centrifugadas a 900rpm por 30 minutos à temperatura ambiente (22°C). O anel de células mononucleares presentes na interface das duas fases líquidas foi coletado com o auxílio de uma pipeta *Pasteur* e transferido para outro tubo. Foi acrescentado PBS até o volume final de 50 ml, centrifugado por 10 minutos a 328rpm e à 22°C , desprezando o sobrenadante, e acrescentando PBS até o volume final de 50 ml.

²Ficoll-Hypaque Plus, Amersham-Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Inglaterra

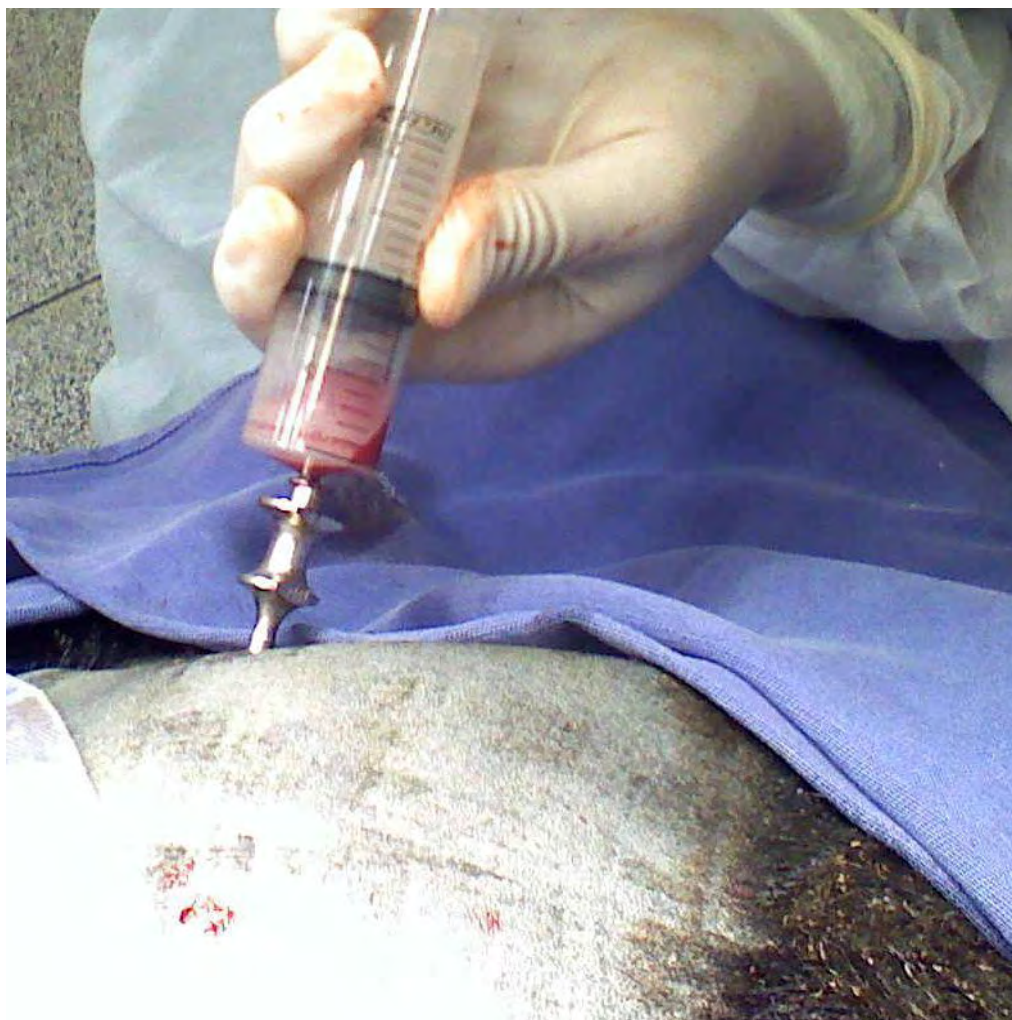


Figura 1. Aspiração da medula óssea obtida da crista ilíaca de ovino SRD.

Novamente a solução foi centrifugada por 10 minutos a 328rpm à 22°C. Imediatamente foi desprezado o sobrenadante, homogeneizada a sedimentação das células mononucleares e acrescentado 10 ml de PBS e separada uma alíquota de 10 a 50µl da suspensão celular para contagem em câmara de Newbauer.

Uma amostra da suspensão celular foi diluída em solução de Turk em tubo *ependorf*, de 1,5 ml. A seguir a amostra foi homogeneizada e foram colocados 10µl na câmara de Newbauer.

As células coradas, presentes nos quatro quadrados grandes angulares da câmara, foram contadas com o auxílio de um microscópio óptico³. O número de células nucleadas por ml foi determinado pela divisão do número total de células contadas, multiplicadas por quatro e por 10.000 (fator de correção) e pelo fator de diluição das células em tampão.

4.1.4.2. Cultivo das CTMs de ovinos

As CTMs foram isoladas das CMNs da medula óssea pela sua capacidade de aderência ao plástico e de expansão, sem perda da capacidade multipotencial, em meio de cultivo pobre em glicose, com altas concentrações de aminoácidos e proteínas (soro bovino fetal), sem a necessidade de citocinas.

As condições de cultivo utilizadas foram: a) meio de cultivo: α -MEM, 100U/ml de penicilina e 100µg/ml de estreptomicina⁴ e 2g/l de bicarbonato de sódio⁵ conforme orientação do fabricante e enriquecido com 15% de soro bovino fetal⁶ previamente inativado a 56 °C por 45 minutos; cultivo em estufa úmida a 37 °C com 5% de CO₂.

Após separação e contagem das CMNs totais da medula óssea, alíquotas de 1 a 6 x10⁷ CMNs foram resuspendidas em 15 ml de α -MEM 15% SBF. A seguir, a suspensão celular foi colocada em cultivo em garrafas de 75 cm² (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Alemanha), visualizada com o auxílio de um microscópio de contraste de fase⁷ e incubada em estufa úmida a 37 °C com 5% de CO₂.

³Olympus CBA, Tóquio, Japão

⁴Penicillin – Streptomycin, Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, EUA

⁵Merck, São Paulo, SP, Brasi

⁶Fetal Bovine Serum Standard - HyClone™, Logan, UT, EUA

⁷Olympus IX50, Tóquio, Japão

4.1.4.3. Tripsinização

Neste trabalho foi utilizada solução de tripsina-EDTA⁸ por 2 a 4 minutos a 37°C e a técnica utilizada se encontra descrita abaixo.

O frasco de cultivo foi lavado com 10 ml de PBS por duas vezes, após a remoção de todo o meio. A seguir, a tripsina foi acrescentada no volume de quatro ml para as garrafas de 75 cm² (T75), com o objetivo de recobrir toda a monocamada de células. Em seguida, a amostra foi incubada a 37°C por 3 a 4 minutos e após, as células foram visualizadas ao microscópio de contraste de fase. Quando as células estavam soltas, a tripsina era inativada com oito ml (T75) de α -MEM 15% SBF e as células coletadas. Estas células foram transferidas para um tubo de polipropileno, centrifugadas por sete minutos a 500rpm, à 22°C. O sobrenadante foi desprezado, o sedimento celular homogeneizado e acrescentado 1 a 3 ml de meio de cultivo ou PBS e uma amostra destas células foi separada para contagem em câmara de Newbauer.

4.1.4.4. Expansão das CTMs de ovinos

Após a tripsinização, alíquotas de 2×10^5 das CTMs foram diluídas em um tubo de polipropileno contendo 18ml de α -MEM 15% SBF. A seguir, a solução de células foi colocada em garrafas de cultivo, visualizada com o auxílio de um microscópio de contraste de fase e incubada em estufa úmida a 37°C com 5% de CO₂.

O cultivo celular foi monitorado sob microscopia de luz óptica e o meio trocado uma a duas vezes a cada sete dias, de acordo com a necessidade da cultura. As células foram tripsinizadas toda vez que estas atingiam uma confluência de 90%.

Após sucessivas replicações, observou-se uma cultura celular homogênea. Desta maneira, a caracterização das CTMs da medula óssea foi realizada entre a 3ª e 5ª replicações (Figura 2), embora possa-se obter replicações até a 19ª passagem.

⁸0,05% Tripsina, 0,53 mM EDTA, Gibco™ Carlsbad, CA, EUA.

4.1.4.5. Caracterização das CTMs de ovinos

A. Caracterização Imunofenotípica das CTMs

As CTMs da medula óssea foram marcadas com anticorpos específicos para a análise da expressão dos seus marcadores de superfície, por meio de citometria de fluxo.

Inicialmente as CTMs foram coletadas por tripsinização e lavadas duas vezes com tampão PBS por centrifugação a 1200rpm/10 min. Para cada marcação 2×10^5 células foram incubadas com 1 μ g do anticorpo específico por 20 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes em tampão PBS por centrifugação (1800rpm/3min.) e analisadas no FACScan (BD). Para os anticorpos CD44 e CD45 (não-conjugados) foi realizada uma segunda etapa, em que as células foram incubadas com 1 μ g do anticorpo secundário anti-rato IgG2a-FITC, seguindo as mesmas condições citadas anteriormente, e em seguida, realizada a análise no citômetro de fluxo (Figura 3).

4.1.4.6. Ensaios de Diferenciação Celular

Para a diferenciação celular em adipócitos e osteócitos, as células indiferenciadas foram colocadas em placas de 24 poços (3,6 cm²) contendo lamínulas previamente esterilizadas, por incubação durante 1 hora a 180°C, na concentração de 8×10^3 células/poço após adição de 1ml de α -MEM 15% SFB. Após 24 horas quando a cultura atingiu uma confluência de 30-40%, esse meio foi removido e iniciado a diferenciação celular em meio indutor específico. Os controles negativos, ou seja, CTM indiferenciadas foram mantidas em meio convencional (α -MEM) sem a presença de indutores de diferenciação.

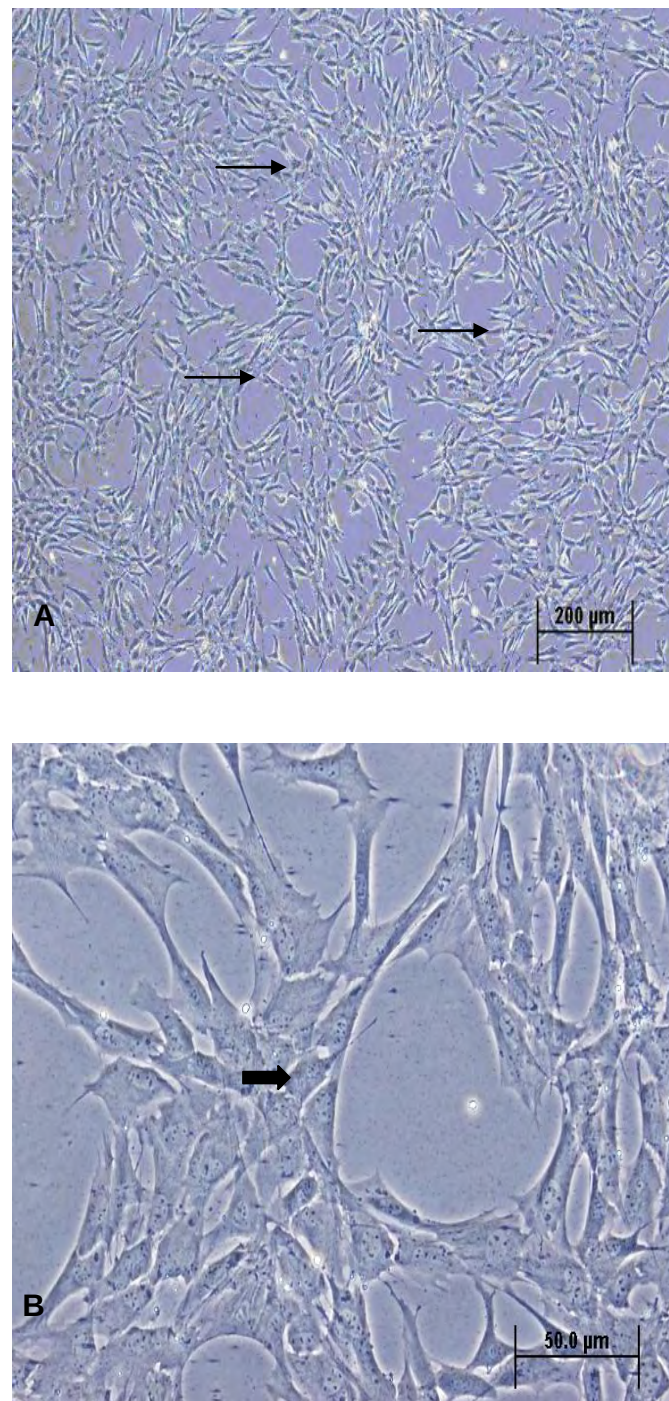


Figura 2. Fotomicrografias de cultivo celular ilustrando a morfologia das células-tronco indiferenciadas de ovino em cultura. (A) Intensa confluência celular (→). (B) Células com prolongamentos citoplasmáticos e formatos fusiformes com núcleos grandes e centrais (➡)

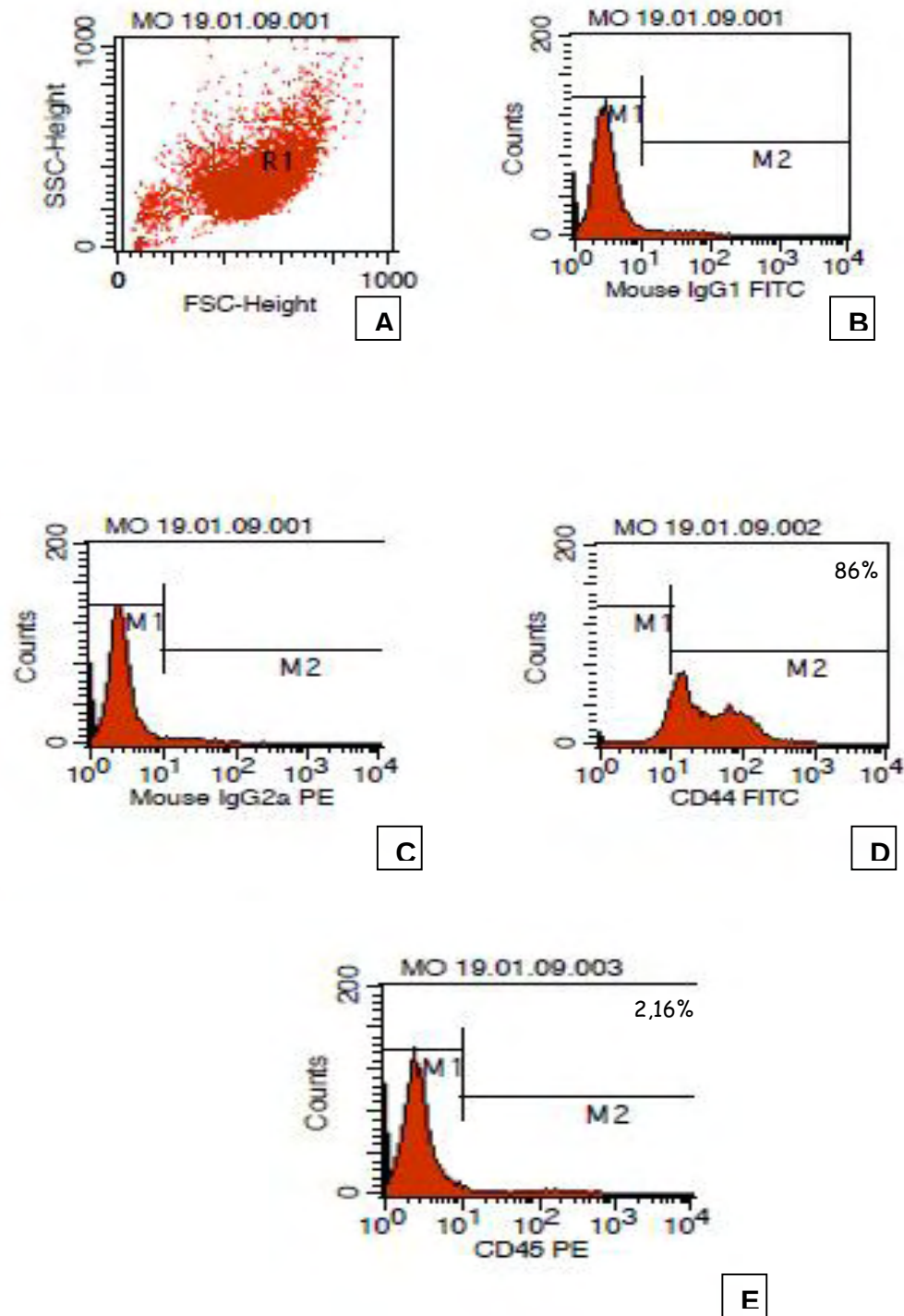


Figura 3. Representação gráfica da caracterização das CTMs de ovinos por citometria de fluxo. Utilizando-se o anticorpo CD44 e o anticorpo CD 45. As CTMs de ovino apresentaram porcentagens de 86,66 para marcadores CD44 (células mesenquimais) e 2,16 para marcadores CD45 (células hematopoiéticas)

A. Diferenciação das CTMs em Adipócitos

No primeiro dia de diferenciação, todo o meio de cultivo foi retirado e foi adicionado 1ml de meio para diferenciação em adipócitos. O meio utilizado para a diferenciação das CTMs em células tipo adipócitos foi o α -MEM, suplementado com 15% SBF, 1 mM de dexametasona (Decadron injetável, Prodome, Campinas, SP, Brasil), 2,5 mg/ml de insulina e 100 mM de indometacina (SIGMA-Aldrich, EUA).

As CTMs de medula óssea foram cultivadas nesse meio até a completa diferenciação, cerca de 7-10 dias, com a troca de metade de meio, sendo feita essa troca a cada dois dias. Para as amostras do controle negativo o meio administrado consistia em α -MEM suplementado somente com 7,5% SBF.

As amostras foram cultivadas e monitorizadas por microscopia de contraste de fase (Olympus, IX71) até o surgimento de indícios da diferenciação celular ($\pm$ 15 dias).

Para a identificação de adipócitos pela coloração com Sudan II-Escarlate, adotou-se o seguinte procedimento: inicialmente as lamínulas contendo as células diferenciadas em adipócitos foram lavadas uma vez em PBS, fixadas com 1ml de paraformaldeído 4% por 30 minutos. Em seguida, foram incubadas em 1ml de álcool 70% por 3 minutos, e retirado todo o álcool 70% e incubadas com 500 μ l de Sudan II-Escarlate durante 5 minutos, para corar os depósitos de gordura presentes no citoplasma. As células foram lavadas novamente em 1ml de álcool 70% e, em seguida, incubadas com 1ml de Hematoxilina de Harris por 2 minutos, para evidenciar os núcleos.

Após a coloração, as lâminas foram montadas utilizando-se uma gota de glicerol 70% para fixar as lamínulas na lâmina. Imediatamente foi retirado todo o excesso de glicerol e selado as lamínulas com resina (Figura 4A).

B. Diferenciação das CTMs em Osteócitos

Ao iniciar a diferenciação, todo o meio basal foi removido e adicionou-se 1ml de meio para diferenciação em osteócitos, e foram mantidas por 25-30 dias, com a troca de metade do meio a cada três dias.

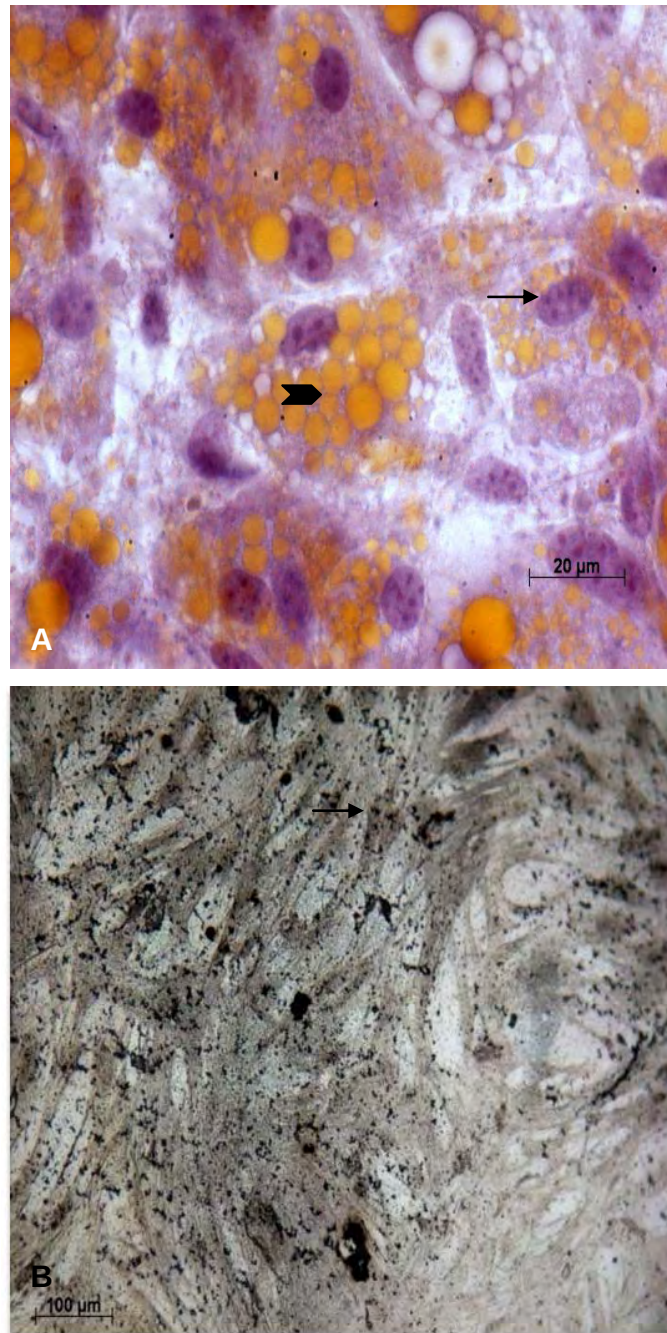


Figura 4. (A) Fotomicrografias da diferenciação celular das CTMs em adipócitos, destacando-se os vacúolos de gordura (➤) e os núcleos dos adipócitos (→) e (B) osteócitos. Coloração sudan II escarlata e Von kossa respectivamente.

Para a diferenciação em células osteoblásticas foi usado o meio α -MEM, suplementado com 7,5% SBF, 0,1 mM de dexametasona, 20 mM de ácido ascórbico (SIGMA-Aldrich, EUA) e 1M de β -glicerolfosfato (Reagem, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). As lamínulas contendo as células diferenciadas em osteócitos foram lavadas em PBS, fixadas com 1ml de paraformaldeído 4% por 30 minutos, lavadas duas vezes com água Mili-Q e incubadas com 1ml de solução de nitrato de prata 5% durante 30 minutos ao abrigo da luz. Em seguida, essas lamínulas foram expostas à luz branca (lâmpada de 100W) por 1h, sobre uma superfície branca. Então, as células foram lavadas rapidamente com 1ml de tiosulfato de sódio 5% e incubadas com 1ml de Hematoxilina de Harris para evidenciar os núcleos.

Após a coloração, as lamínulas foram submetidas a uma bateria de desidratação, composta por álcool etílico (Etanol) e xilol, para a preparação de lâminas permanentes para microscopia de luz. Em seguida, as lamínulas foram fixadas nas lâminas adicionando uma gota de permount (FISHER) (Figura 4B).

4.1.4.7. Produção lentiviral

Células 293T são frequentemente utilizadas para a produção de partículas lentivirais. Para a produção viral é importante que a linhagem celular (293T) expresse estavelmente o gene para o grande antígeno T do SV40. Neste método é necessário o uso de um vetor contendo o transgene e dois vetores auxiliares, que possuam a origem de replicação do SV40, para que após a transfecção os plasmídeos dentro das células possam se replicar, o que aumenta a transcrição do transgene e a produção de proteínas virais.

Para a produção de partículas virais o protocolo de transfecção utilizado foi o da lipofectamina 2000 (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Os três plasmídeos foram transfectados na proporção abaixo:

10 μ g vetor 1054-GFP;

6,5 μ g pCMV Δ R8.91 (contendo gag, pol, ver e tat do HIV-1);

3,5 μ g pMD2 VSVG (codifica o envoltório do VSV-G)

Após a transfecção (15-20 horas) as células foram incubadas em meio fresco e 24 horas após, o sobrenadante foi coletado, centrifugado a 450rpm, por cinco minutos a 4°C, e filtrado (filtro 0,22 µm) para a retirada de restos celulares. O sobrenadante das células 293T transfectadas com os vetores lentivirais foi congelado em alíquotas no freezer -80°C.

4.1.4.8. Modificação Gênica das CTMs de ovinos

O vetor lentiviral 1054-GFP foi utilizado para modificar geneticamente as células mesenquimais, com o objetivo de verificar a presença deste vetor no tendão do músculo flexor superficial dos dedos dos ovinos, após o implante das células-tronco mesenquimais por microscopia de fluorescência.

Adicionando os vírus, o polibreno na concentração de 5µg/mL e 20ng/mL de FGF-b às células mesenquimais em placas de 100 mm., verificou-se a transdução das 2×10^5 CTMs. Após três ciclos consecutivos, a cada 24h, de transdução, o meio celular foi substituído por α-MEM 15%. As células que receberam o vetor lentiviral expressaram a proteína verde fluorescente (GFP) (Figura 5).

Após a esterilização da membrana de colágeno realizada no Oximed tecnologia em esterilização em Ribeirão Preto (SP), a mesma recebeu nas suas extremidades dois fios de sutura e posteriormente a membrana foi imersa no meio de cultivo (α-MEM + CTMs) por um período de 24 horas, período que permite a aderência das CTMs na membrana (Figura 6).

Após este período a membrana foi fotografada em microscópio⁹ de fluorescência com o objetivo de verificar a aderência das CTMs expressando a proteína GFP (Figura 7).

⁹Microscópio de Luz fluorescente Olympus IX 71

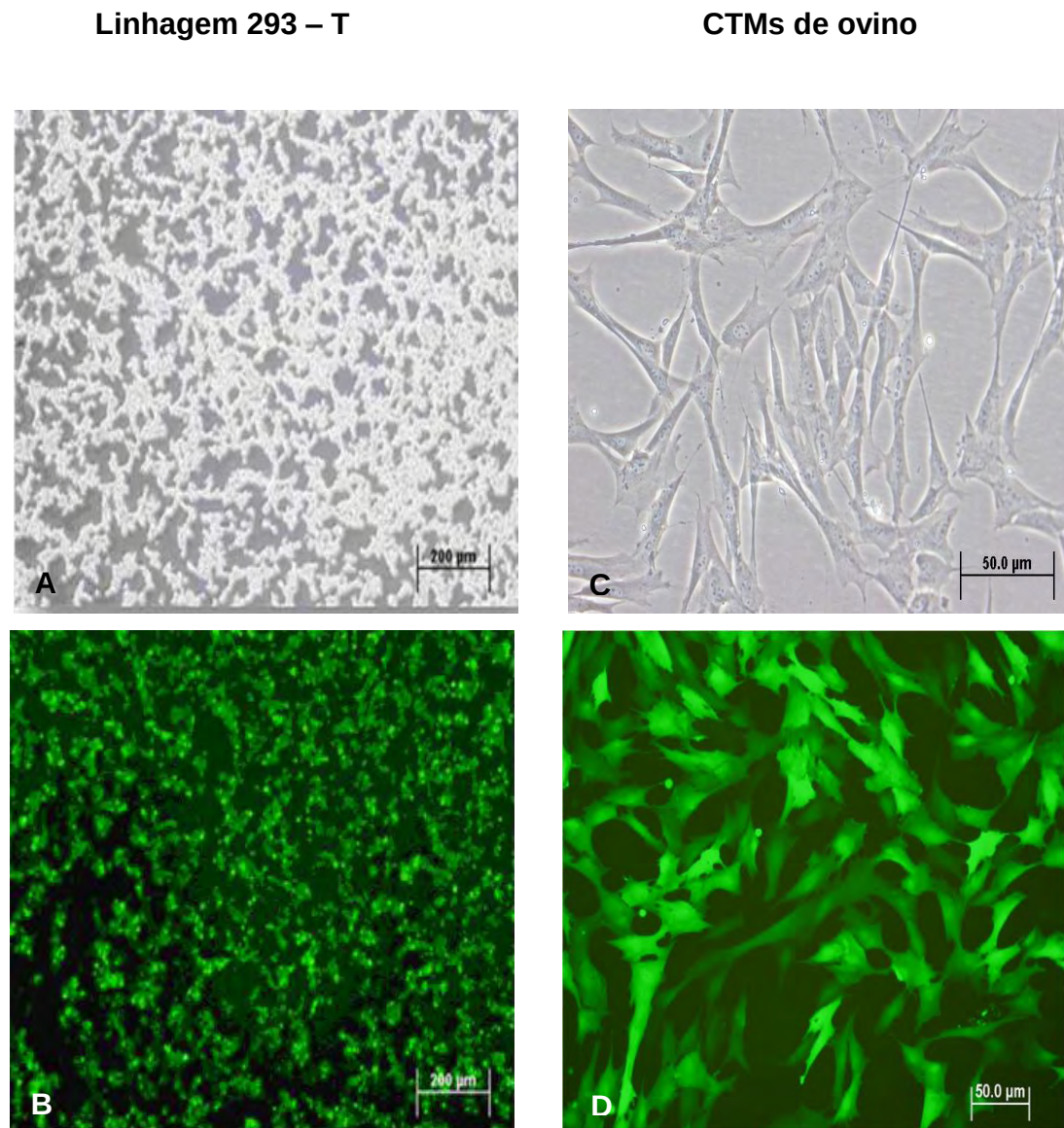


Figura 5. Fotomicrografias da marcação das CTMs de ovino. Células Hek 293T de rim usadas para a produção do lentivirus (A). Células 293T do rim transduzidas com os três plasmídios lentivirais (B). Cultivo de CTMs de ovinos (C). CTMs de ovinos transduzidas com o lentivirus 1054 GFP (D). Aumento de 200μm e 50μm. Microscópio de fluorescência.

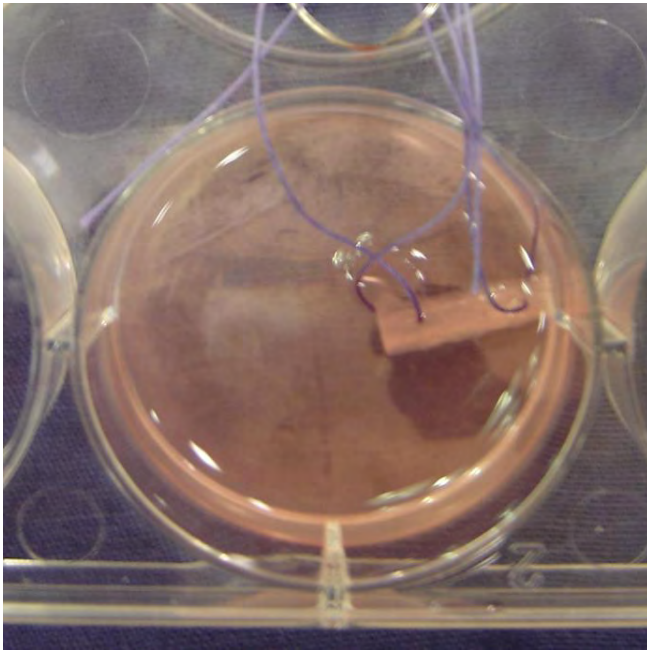


Figura 6. Matriz de colágeno no meio de cultivo das CTM de ovinos.

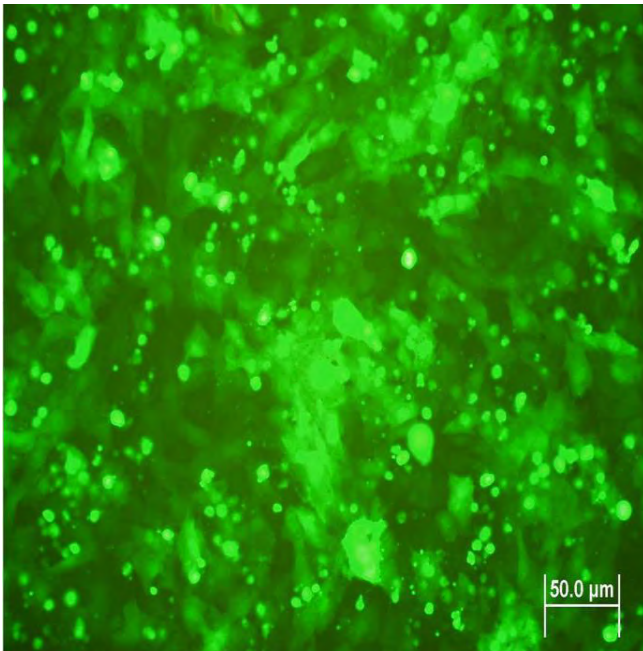


Figura 7. Matriz de colágeno com CTMs de ovinos transduzidas com o lentivirus 1054 GFP

4.1.4.9 Protocolo da imunofluorescência (IMF)

No dia do sacrifício dos animais os tendões do músculo flexor superficial dos dedos dos ovinos operados foram retirados e colocados em sacarose 30%, esperando os fragmentos decantar e posteriormente congelados em isopentano.

Após esse procedimento, foram feitos cortes seriados de 10µm de espessura com o auxílio de um criostato do laboratório de Odontologia da USP. Posteriormente as lâminas foram descongeladas à temperatura ambiente, e lavadas duas vezes em PBS e adicionada solução de glicina 0,1M em PBS por 30 minutos, para retirada completa de grupos aldeídos, e posteriormente incubadas com solução de BSA2% e Triton x100 a 0,2% diluídos em PBS por uma hora (bloqueio das ligações inespecíficas).

Em seguida os cortes foram incubados com os anticorpos primários, diluídos em PBS contendo BSA 1% e Triton 0,1% por duas horas em temperatura ambiente e após esse período foram lavadas as lâminas cinco vezes com PBS por cinco minutos para cada lavagem.

Imediatamente os anticorpos secundários foram centrifugados a 10.000rpm por 10 min, 4°C para evitar a formação de grumos, e diluído à 1:200 em PBS 1% de BSA. Posteriormente o anticorpo diluído foi adicionado aos cortes e incubados por 1 hora em temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram lavadas cinco vezes com PBS durante cinco min para remover o excesso do anticorpo. As lâminas foram montadas com solução de fluormount diluído em PBS (1:2).

4.2. FASE EXPERIMENTAL

4.2.1. Procedimentos cirúrgicos

4.2.1.1. Grupo controle (G1)

Nos animais do grupo G1 foi realizada a incisão na pele e tecido subcutâneo, na face palmar do metacarpiano III, isolando-se o tendão do músculo flexor superficial dos dedos (TMFSD) do membro torácico esquerdo de ovinos. O TMFSD foi exposto e uma

falha produzida por meio de tenectomia parcial (1,5cm de comprimento por 0,3cm de largura) foi feita, com o auxílio de uma lâmina de bisturi nº 11. Esta falha tendínea não foi submetida a qualquer tipo de tenorrafia ou tratamento, para que se simulasse a cicatrização espontânea. Logo após foi realizada a síntese do tecido subcutâneo e da pele com ponto simples separados utilizando náilon preto monofilamentar (ethicon®)(figura 8).

4.2.1.2. Grupo submetido ao implante de membranas de colágeno (G2)

Nos animais do grupo G2 foi conduzido o mesmo procedimento cirúrgico, porém a área tenectomizada foi preenchida com o implante da matriz de colágeno (1,5cm de comprimento e 0,3cm de largura) e fixada nas extremidades proximal e distal, por meio de sutura em pontos simples separados com fio de poliglactina nº 910 (vicryl®) (figura 9).

4.2.1.3. Grupo com implante de CTMs associadas à membrana de colágeno (G3)

A membrana de colágeno foi colocada no meio de cultivo contendo as células-tronco 24 horas antes do procedimento cirúrgico para garantir a adesão das células ao tecido, para sua posterior implantação. Neste grupo G3 o procedimento cirúrgico foi realizado de modo semelhante ao do G2, preenchendo-se a área tenectomizada com o implante da matriz de colágeno associado às células-tronco (Figura 10).

4.2.2. Critérios usados na avaliação clínica dos grupos experimentais

Após os procedimentos cirúrgicos todos os animais foram examinados duas vezes ao dia durante uma semana, levando-se em consideração os seguintes parâmetros: frequência cardíaca (n/min), frequência respiratória (n/min), tempo de preenchimento capilar (min), temperatura corporal (°C), avaliação de mucosas, condições de cicatrização da ferida cirúrgica, claudicação e sensibilidade local. No pós-operatório foi utilizado antiinflamatório não esteróide e analgésico, durante três dias.

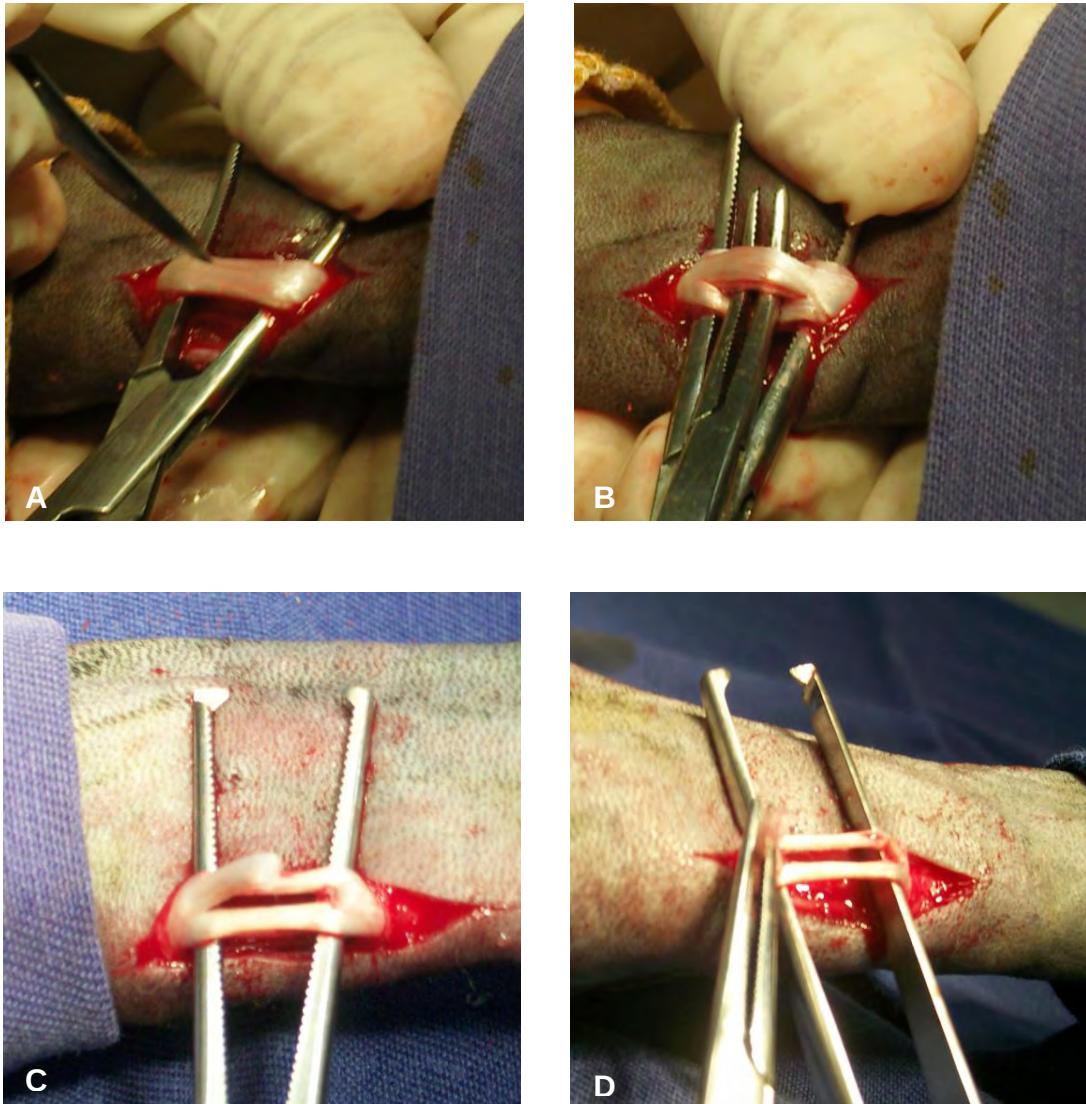


Figura 8. Vista palmar do membro torácico de ovino onde foram realizadas as diferentes fases da tenectomia parcial no tendão do músculo flexor superficial dos dedos do membro torácico esquerdo do grupo (G1). (A), (B), (C), e (D).

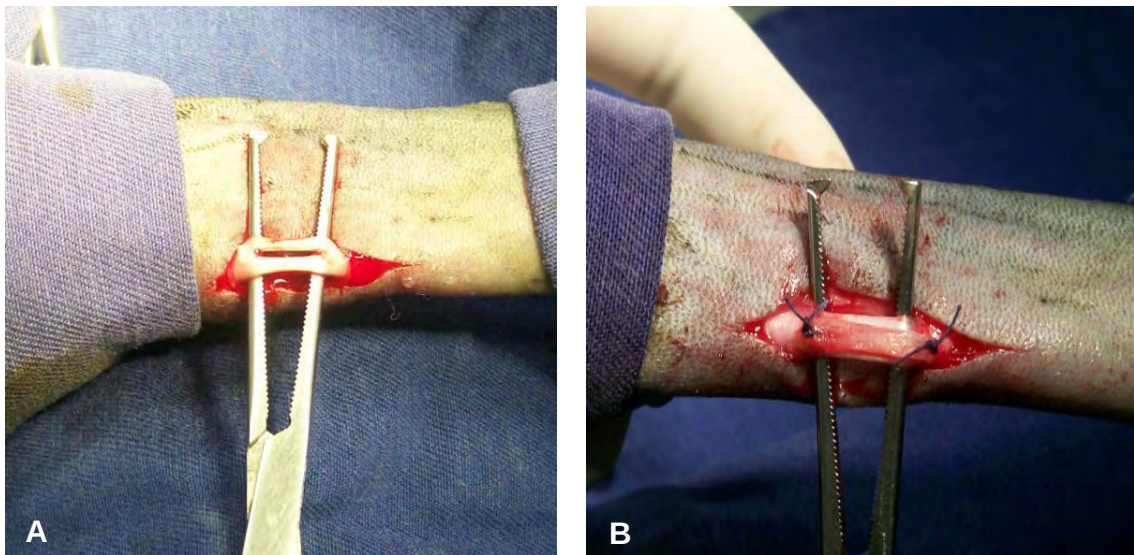


Figura 9. Vista palmar antes (A) e após a implantação da membrana de colágeno (B) no tendão do músculo flexor superficial dos dedos do membro torácico esquerdo de ovinos do grupo G2.

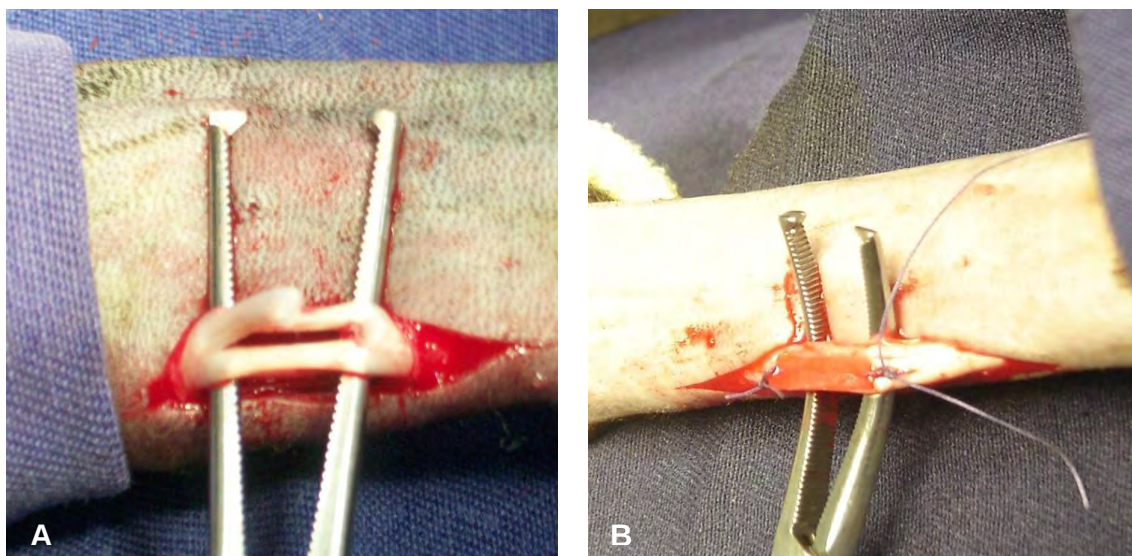


Figura 10. Vista palmar antes (A) e após (B) a implantação da membrana de colágeno associada às células-tronco no tendão do músculo flexor superficial dos dedos do membro torácico esquerdo de ovinos do grupo G3.

O manejo sanitário consistiu na limpeza das instalações e controle de endoparasitas por meio da quantificação do número de ovos por grama de fezes (OPG) e da aplicação de anti-helmíntico dependendo da necessidade (Cloridrato de Levamisol¹⁰).

Todos os exames clinicopatológicos (hemograma e bioquímica sérica) foram realizados junto ao Laboratório de patologia clínica do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, da FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal.

4.2.3. Exames ultrassonográficos

O exame ultrassonográfico foi realizado utilizando um aparelho de ultrassonografia de marca Pie Medical Scanner 200, com transdutor linear de 5,0 e 7,5 MHz. As imagens obtidas foram registradas em impressora específica para ultrassonografia acoplada ao aparelho. No dia do sacrifício dos animais e após prévia tricotomia da região palmar do terceiro metacarpiano foi realizado o exame ultrassonográfico com o animal em posição quadrupedal, utilizando-se um gel apropriado (YEAGER & CONCANNON, 1995; LORIOT et al., 1997). Todos os exames ultrassonográficos foram realizados junto ao Setor de Radiologia do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, da FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal.

4.2.4. Avaliação macroscópica dos implantes após o sacrifício

Nos períodos previstos para o sacrifício (30, 60 e 90 dias após o ato cirúrgico), os tendões dos ovinos submetidos à cirurgia foram avaliados quanto aos graus de fibrose. Para isso foi empregada a classificação utilizada por SUZIGAN et al., (2001), que considera os seguintes critérios:

- a. DISCRETA: retirado com dissecação romba suave;
- b. MODERADA: retirado com dissecação romba agressiva;
- c. SEVERA: dificuldade na retirada com dissecação romba agressiva

¹⁰Ripercol, Ford dodge. São Paulo

4.2.5. Avaliação Histopatológica

No dia do sacrifício dos animais os tendões do músculo flexor superficial do dedo dos ovinos operados foram retirados e fixados em solução de Bouin por 24 horas. Após esse período, encaminhou-se o material à rotina histológica. Foram feitos cortes seriados de sete μm de espessura e corados com picrossirius red (JUNQUEIRA et al., 1979), Von-Kossa e hematoxilina-eosina (HE) conforme Behmer et al. (2003). A seguir mediante microscópio de luz óptico adaptado a um sistema computadorizado de análise de imagens, foram fotografados 50 campos por amostra, aleatoriamente, para quantificar o número de fibroblastos e fibrócitos presentes nos cortes dos respectivos tratamentos. Os cortes corados pelo picrossirius red foram observados em microscópio de luz com sistema de campo escuro e de luz polarizada, para determinação de distribuição das fibras colágenas. O processamento das lâminas foi realizado no Laboratório de Patologia do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV/UNESP.

4.2.6. Microscopia Eletrônica de Varredura

Para os estudos tridimensionais em microscopia eletrônica de varredura, foi realizado o sacrifício dos ovinos dos respectivos tratamentos e, em seguida, foi retirada parte do tendão do músculo flexor superficial dos dedos e os fragmentos foram fixados por imersão em solução de glutaraldeído 3% em tampão fosfato, pH 7,4 durante 48 horas e, posteriormente, lavadas em solução tampão de fosfato de sódio, por três vezes, e pós-fixadas em solução tamponada de tetróxido de ósmio a 1%, durante 3 horas. A desidratação foi feita em série crescente de álcoois 30%, 50%, 70%, 80%, 90% e 100% (absoluto), sendo que neste último foram realizadas três imersões com intervalos de 20 minutos. A secagem do material foi realizada obtendo-se o ponto crítico com dióxido de carbono (CO_2) líquido, em aparelho SEM Critical Point modelo 850, ajustado a 1500 psi e 40°C. Para a metalização com ouro coloidal, utilizou-se um equipamento Denton Vacuum modelo Desk II e as amostras foram observadas e submetidas à documentação fotográfica em microscópio eletrônico de varredura Jeol, regulado para 15 ou 20 KV, no Laboratório de Microscopia Eletrônica da FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal.

4.2.7. Análise Morfométrica

Após a identificação dos fibroblastos e fibrócitos nos cortes histológicos dos tendões do músculo flexor superficial dos dedos, dos respectivos tratamentos e aos 30, 60 e 90 dias pós-cirurgia, estes foram quantificados em uma área de $589\mu\text{m}^2$, do programa “Pró-Plus” do analisador de imagens, e analisados posteriormente.

4.2.8. Análise estatística

Após uma adequação dos valores obtidos utilizando-se a raiz quadrada dos dados, os números de fibroblastos e fibrócitos obtidos na histomorfometria foram submetidos a um delineamento inteiramente casualizado num esquema fatorial 3x2. Para isso empregou-se a análise de variância e, em seguida, o teste de Levene para comparação das médias, segundo procedimentos do General Linear Models (Proc GLM) do SAS/STAT (2002).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As CTMs foram capazes de se diferenciar eficientemente “in vitro”, além de apresentarem um alto potencial proliferativo (valores médios de $80,22\pm 15$ duplicações da população celular (PDs) em $109,2\pm 23$ dias de cultivo observados tabela 1 e gráfico 1). As análises fenotípicas destas células foram realizadas inicialmente usando anticorpos específicos para ovinos, sendo que as células apresentaram-se negativas para marcadores hematopoiéticos (CD45) e positivas para marcadores característicos de CTMs (CD44) como descrito por DJOUAD et al (2005) e MUGRALA et al (2007).

Tabela 1. Valores absolutos, médios e desvios padrão das diferentes passagens de duplicações (PDs) no decorrer do tempo das CTMs das seis medulas de ovinos.

Medula óssea	PDs	Tempo
MO-4	72,62	109
MO-7	87,27	113
MO-8	89,71	120
MO-6	94,15	133
MO-3	57,32	71
MO-5	80,21	109
MÉDIA	80,21	109,2
DESVIO PADRÃO	15,13	23,22

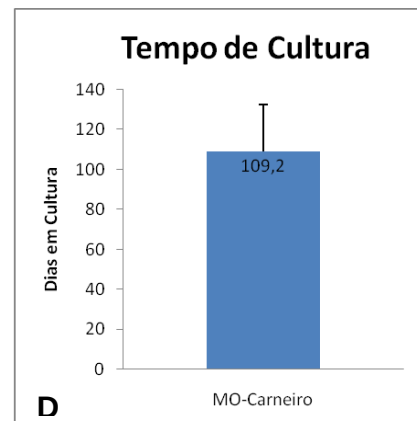
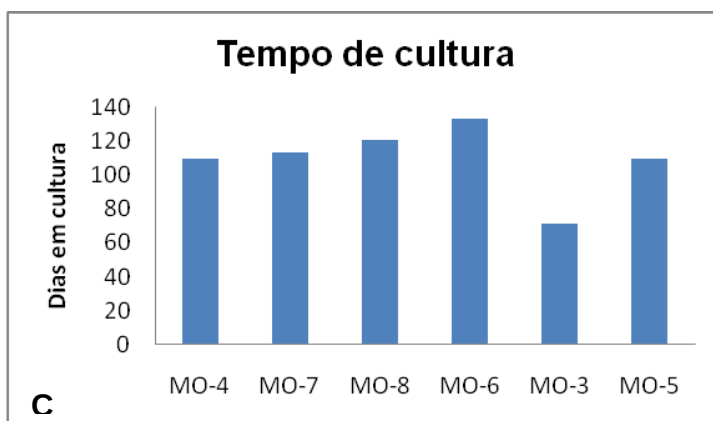
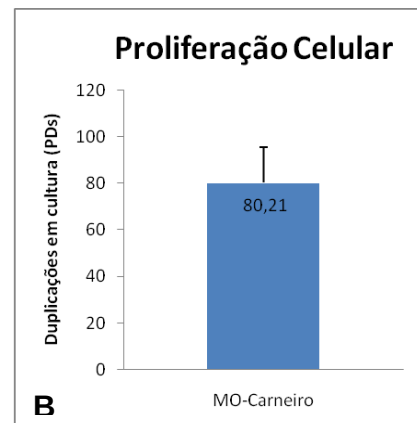
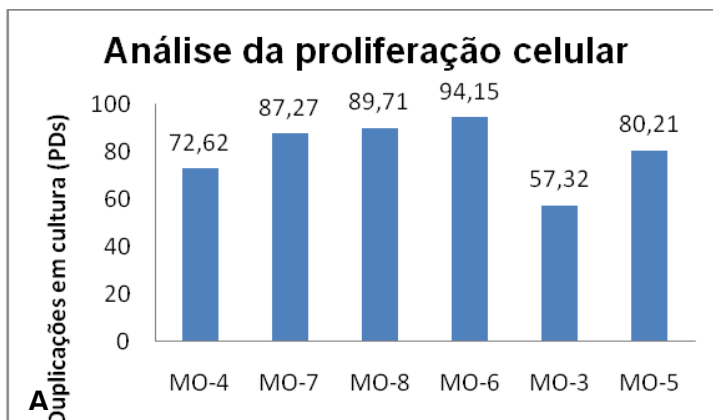


Gráfico 1. Médias e desvios padrão da proliferação celular e do tempo das CTMs de ovinos, na cultura (A e C) e dos valores médios de todos os ovinos (B e D).

As CTMs expressaram o marcador CD44 ($87,25 \pm 2,7\%$), e as culturas demonstraram pouca presença de contaminantes hematopoiéticos, visto a baixa expressão da molécula CD45 ($2,35 \pm 1,5\%$) nas células cultivadas (Figura 3). Após a marcação a transdução lentiviral foi altamente eficiente ($83,94 \pm 12,35\%$), levando a geração de CTMs expressar o GFP (Tabela 2 e figura 11, por citometro de fluxo e 12, por imunofluorescência), dos animais do grupo G3.

Tabela 2. Porcentagens de CTMs positivas para GFP das diferentes medulas identificadas por citometria de fluxo.

Medula óssea	% GFP
MO-4	85,58
MO-7	61,77
MO-8	79,84
MO-6	91,21
MO-3	97,57
MO-5	87,67
MÉDIA	83,94
DESVIO PADRÃO	12,35

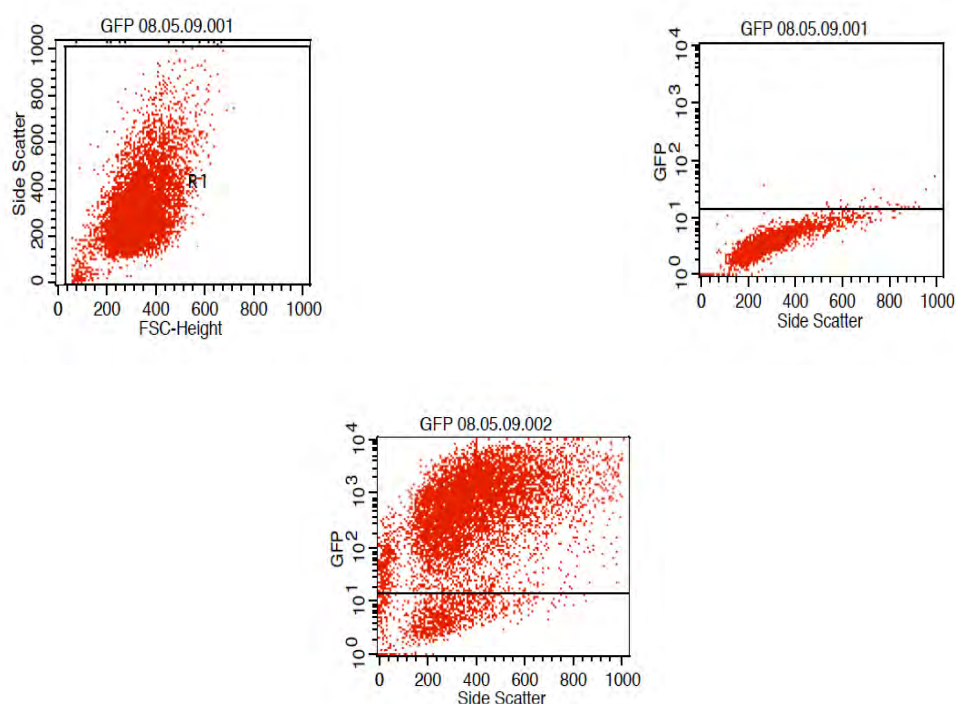


Figura 11. Representação gráfica da porcentagem de CTMs de ovino positivas para o GFP identificadas por citometria de fluxo.

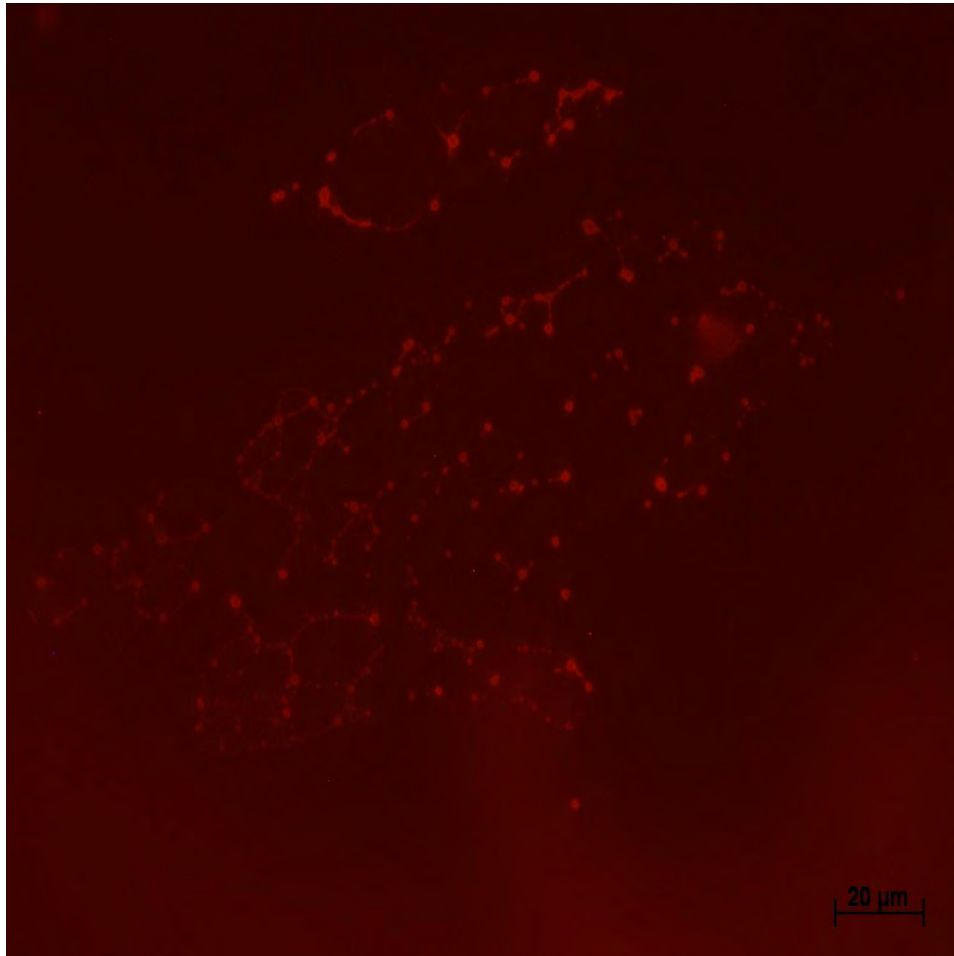


Figura 12. Fotomicrografias das CTMs do tendão flexor superficial dos dedos de ovino do grupo G3, expressando a proteína GFP, em microscópio de fluorescência (40x).

Ao avaliar a quantidade das células tronco em meio de cultivo verificou-se que os ovinos apresentam uma maior densidade das células em relação às CTMs de humanos (DEANS et al., 2000; BIANCO et al., 2001; MUGRALA et al., 2007) (Tabela 3 e gráfico 2), em um determinado período de tempo.

Tabela 3. Valores densimétricos das CTMs da medula óssea dos seis ovinos durante as 19 passagens no decorrer de 109,2 dias.

Passagens	MO-4	MO-7	MO-8	MO-6	MO-3	MO-5
1p	5,04	11,63	5,91	6,78	4,91	6,85
2p	4,86	4,43	4,25	5,64	4,32	4,70
3p	4,76	3,81	5,06	4,32	4,21	4,43
4p	5,95	4,64	4,59	5,91	3,48	4,91
5p	5,91	4,06	3,91	5,06	3,17	4,42
6p	4,54	3,81	4,86	4,37	5,44	4,60
7p	4,94	3,74	4,64	4,37	4,64	4,47
8p	4,37	5,06	5,20	3,42	3,64	4,34
9p	5,06	5,74	4,22	3,12	3,64	4,36
10p	3,62	5,06	5,44	5,32	4,32	4,75
11p	3,54	1,09	5,20	4,91	3,25	3,60
12p	3,32	4,44	4,92	5,32	3,06	4,21
13p	4,09	5,44	4,69	5,06	2,54	4,36
14p	4,20	5,32	4,59	8,31	2,81	5,04
15p	2,50	4,06	5,06	3,54	2,46	3,53
16p	3,59	4,39	4,39	2,87	1,42	3,33
17p	2,32	4,27	3,12	3,46		3,29
18p		4,54	3,62	4,64		4,27
19p		1,74	3,74	4,66		3,38

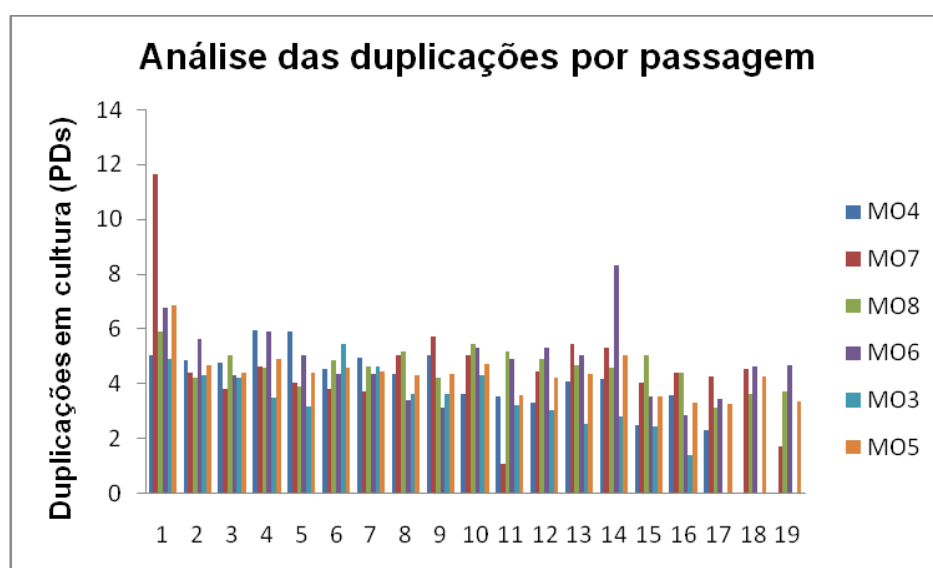


Gráfico 2. Representação gráfica da densidade das CTMs de ovinos obtidas nas 19 passagens no decorrer médio de 109,2 dias.

5.1. Resultados clínicos dos ovinos

Na avaliação clínica realizada diariamente durante uma semana subsequente ao procedimento cirúrgico, observou-se que 100% dos animais pertencentes aos grupos G1, G2 e G3 apresentaram evolução clínica satisfatória, sem alteração das funções vitais. Não foram observadas deiscências das feridas ou outra manifestação indicativa de reações locais como fístulas ou secreções patológicas.

No primeiro dia pós-operatório e, durante as primeiras 48 horas, verificou-se nos sete animais do grupo G1, claudicação discreta do membro torácico esquerdo sendo que no grupo G2 apresentou-se moderada em seis animais e severa em um deles, atribuídos à movimentação do animal. Já nos seis ovinos do grupo G3 foi notada claudicação intensa na 24^a hora após o procedimento cirúrgico e a inflamação foi mais severa quando comparada com a dos outros grupos.

As alterações locais observadas como aumento de volume da região metacarpiana, resultado do processo inflamatório após lesão tecidual, sensibilidade intensa à palpação em todos os animais pela irritação química nas terminações nervosas, bem como claudicações nos membros torácicos operados pela compressão mecânica, confirmam a presença do processo de reparação tendíneo referido por GOODSHIP *et al.*, (1994), sendo estas alterações características da tendinite aguda (STASHAK, 1994).

Os exames laboratoriais realizados nos diferentes grupos (G1, G2 e G3), antes da intervenção cirúrgica, indicaram os valores de hemograma, fibrinogênio e proteínas plasmáticas totais (PPT) dentro dos valores fisiológicos da espécie de referência, citada por vários autores (ESMAY, 1978; MILLER e MONGE 1946). (Apêndice – tabelas 6-14).

5.2. Resultados ultrassonográficos

Na figura 13 aos 30 dias, após o procedimento cirúrgico no grupo G1(A), o tendão operado apresentou-se hipoeecóico em relação aos tecidos adjacentes, heterogêneo, medindo 0,83 cm de espessura e disposição irregular das fibras,

evidenciando-se a presença de líquido em torno do mesmo. Já no grupo G2 (B), o tendão operado apresentou-se aos 30 dias, ecogenicidade heterogênea, hipo (Figura13; B1) e hiperecótica (Figura13; B2) em relação aos tecidos adjacentes, com espessura máxima de 1,16 cm.

Aos 60º dia após o ato cirúrgico, no grupo G1 (Figura13, D) o tendão operado apresentava diminuição das áreas hipoecogênicas, sendo heterogêneo, medindo 0,68 cm de espessura, com organização das fibras colágenas em disposição irregular. No entanto no grupo G2 (E) o tendão apresentava ecogenicidade heterogênea, com áreas hiper e hipoecóticas em relação aos tecidos adjacentes e irregularidade, com espessura máxima de 1,23 cm.

Aos 90 dias após a intervenção cirúrgica no grupo G1 (Figura13G) observa-se que houve aumento de ecogenicidade tendínea em relação aos tecidos adjacentes, apresentando-se heterogêneo, medindo 0,83 cm de espessura. Sendo que no grupo G2 (Figura 13H) o tendão apresentava ecogenicidade heterogênea, com áreas hiper e hipoecóticas em relação aos tecidos adjacentes, aumento de espessura e alinhamento irregular das fibras colágenas.

No grupo G3 evidenciou-se nos diferentes períodos, diminuição nas áreas de hipoecogenicidade quando comparado com os grupos G1 e G2, além de disposição com melhor arranjo de fibras no sentido longitudinal. A espessura dos tendões foi de 0,75cm aos 30 (Figura 13C), 0,52cm aos 60 (Figura 13F) e 0,58cm aos 90 (Figura13; I) dias, após o procedimento cirúrgico.

A ultrassonografia é uma ferramenta para avaliação da estrutura do tendão após a indução experimental da lesão e durante o processo cicatricial. A aparência ultrassonográfica em tendões normais é fornecida pela densidade do colágeno e a reflexão nas interfases das fibras (VAN SCHIE et al., 2000).

A interrupção das fibras e os processos inflamatórios agudos, a fibroplasia e o desalinhamento das fibras determinam a perda da ecogenicidade (hipoecogenicidade), o que foi observado nas diferentes avaliações realizadas nos grupos experimentais. A progressiva reorientação das fibras colágenas pode levar a recuperação gradual da ecogenicidade (DENOIX, 1994), o que foi observado neste estudo e em estudos anteriores (CREVIER et al., 2005; FERRARI et al., 2006).

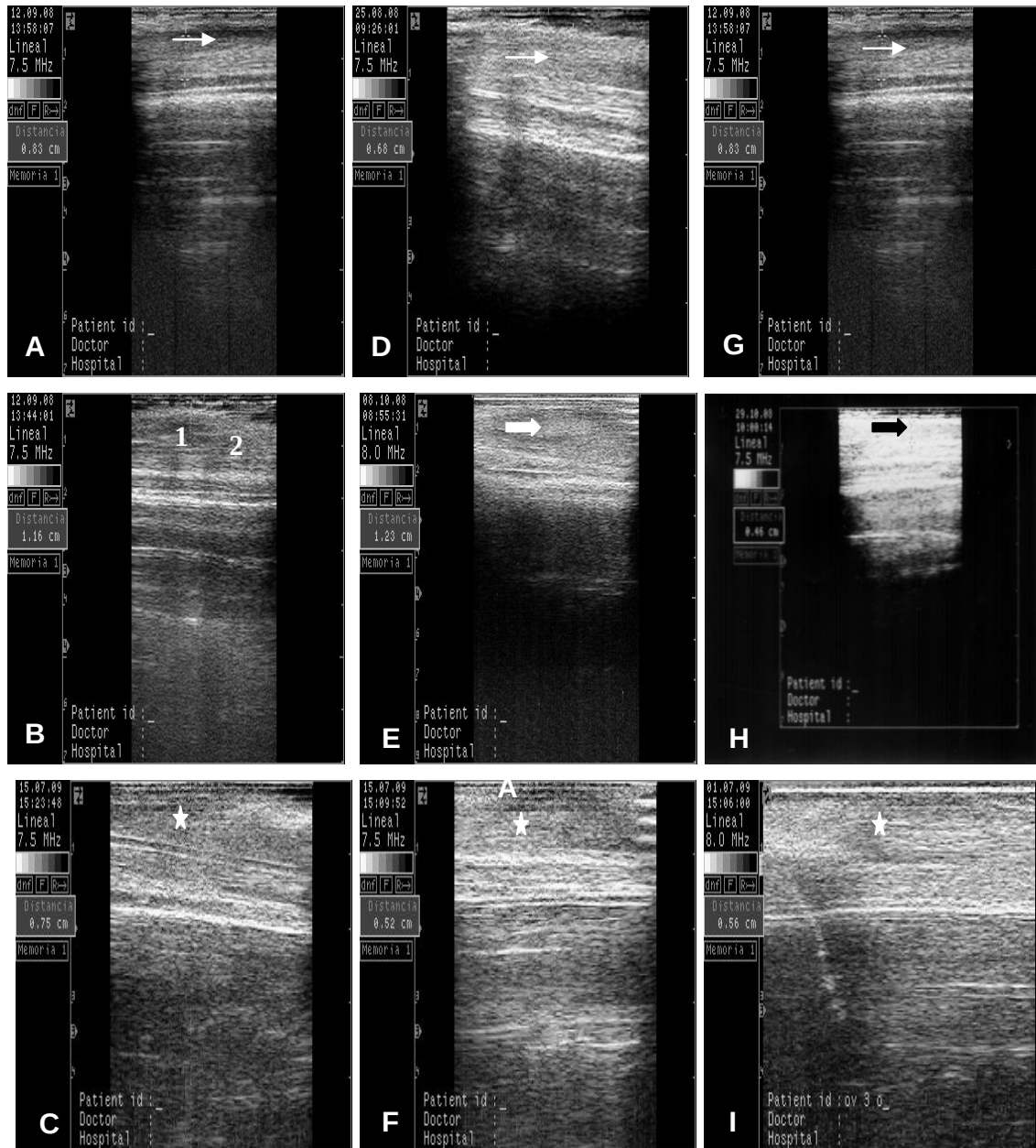


Figura 13. Avaliação ultrassonográfica de tendão do músculo flexor superficial dos dedos de ovinos. No grupo controle aos 30 dias observa-se hipoeecóico, heterogêneo (A), aos 60 (D) e 90 dias diminuição da hipoeecogenicidade (G), no grupo com implante da matriz de colágeno aos 30 (B) apresenta ecogenicidade heterogênea, hipo (1) e hiperecótica (2) aos 60 (E) e 90 dias (H) evidencia-se ecogenicidade heterogênea (➡) e no grupo com implante da matriz de colágeno associada às células-tronco aos 30 (C), 60 (F) e 90 (I) dias do ato cirúrgico se observa ecogenicidade heterogênea (★).

5.3. Resultados macroscópicos relativos à fibrose tendínea

Na figura 14 evidencia-se a presença de aderências nos diferentes grupos experimentais, aos 30 dias, após o procedimento cirúrgico, sendo que 100% (dois animais) dos animais do grupo G1, ao retirar o tendão, apresentaram fibrose discreta (Figura 14B), já em 100% (dois animais) dos ovinos do grupo G2 foi moderada (Figura 14C), e 100% (dois animais) dos animais no grupo G3 a fibrose foi severa (Figura 14D). O espessamento do tendão após 30 dias foi evidente nos diferentes grupos quando comparado com o tendão normal (Figura 14A), sendo que nos ovinos do grupo G2 a espessura foi maior do que nos grupos G1 e G3.

Aos 60 dias após o ato cirúrgico os tendões dos animais quanto à fibrose observada, no grupo controle foi discreta em 100% dos ovinos (dois animais), já no grupo com implante de membrana de colágeno foi moderada em 100% dos animais, sendo que no grupo G3, foi entre moderada (75%) e discreta (25%). Os diferentes grupos apresentaram um espessamento maior quando comparado com os animais aos 30 dias, sendo em 100% (2 animais) considerado como severo no grupo G2 (figura 15C) e 100% considerado moderado nos grupos G1 (Figura 15B) e G3 (Figura 15D).

Observou-se nos tendões dos animais aos 90 dias após o procedimento cirúrgico um espessamento moderado em 100% dos animais dos diferentes grupos, sendo a fibrose discreta em todos os ovinos dos grupos G1 (Figura 16B), G2 (Figura 16C) e G3 (Figura 16D).

A restauração da função após lesão tendínea está submetida às mudanças contínuas. Pesquisas realizadas estudaram o movimento durante o período pós-operatório, reportando diminuição na formação de aderências e melhor função na reparação do tendão (STRICKLAND e GLOGOVAC, 1980), fato que não foi analisado nos diferentes grupos experimentais.



Figura 14. Espessura do tendão do músculo flexor superficial dos dedos de ovinos. Tendão normal (A), grupo G1 (B), grupo G2 (C) e grupo G3 (D) aos 30 dias após a cirurgia.



Figura 15. Espessura do tendão flexor superficial dos dedos de ovinos. Tendão normal (A), grupo G1 (B), grupo G2 (C) e grupo G3 (D) aos 60 dias após a cirurgia.

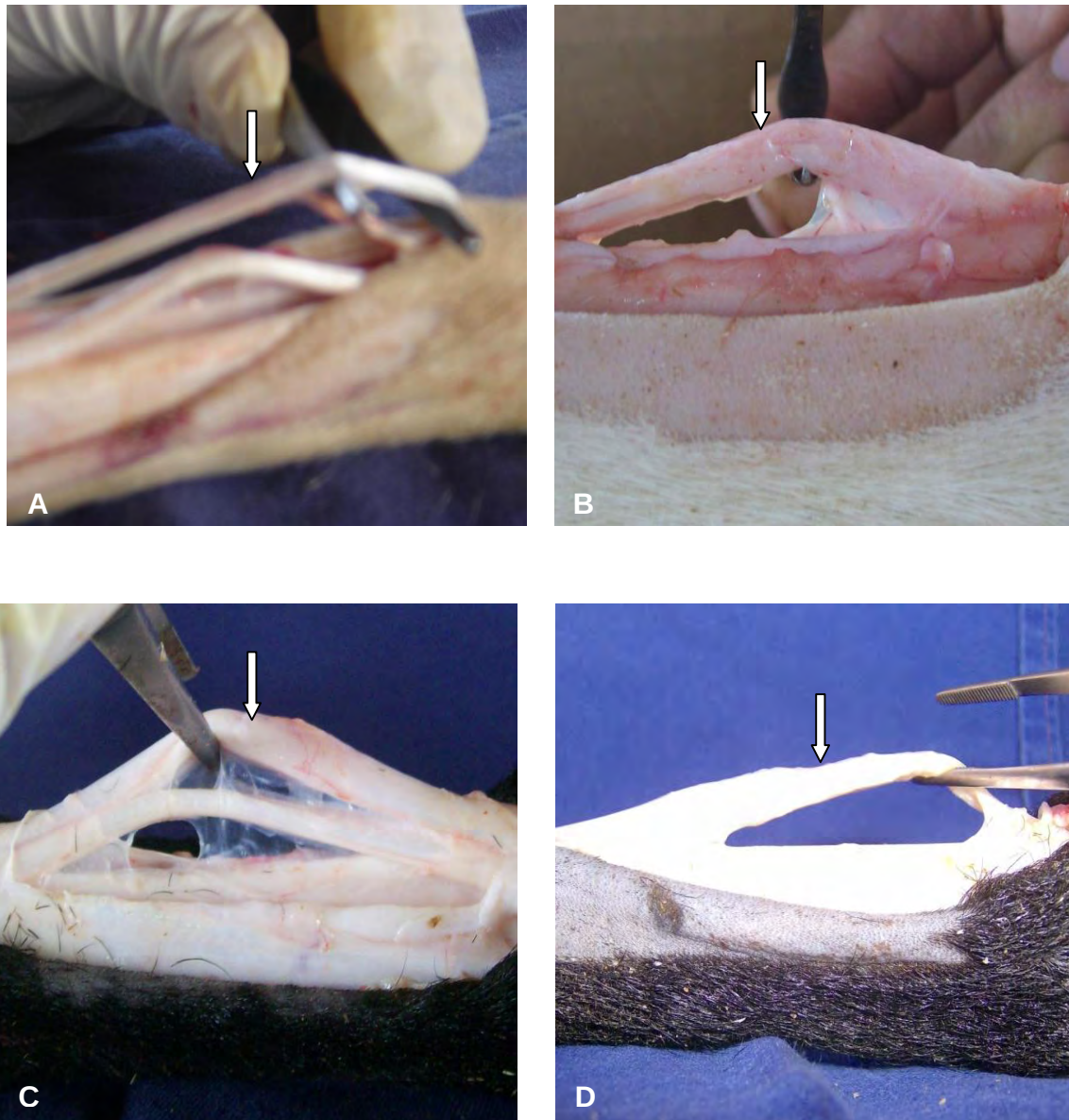


Figura 16. Espessura do tendão flexor superficial dos dedos de ovinos. Tendão normal (A), grupo G1 (B), grupo G2 (C) e grupo G3 (D) aos 90 dias após a cirurgia.

A quantidade de pontos de suturas realizados, o excesso de manipulação do tendão nos atos cirúrgicos e o tipo de material utilizado são fatores que favorecem o aumento da formação de aderências (STRICKLAND, 2000), evidenciadas nos grupos G2 e G3 aos 30 e 60 dias, devido ao tratamento utilizado.

5.4. Resultados Histopatológicos

Observações no tendão normal do músculo flexor superficial dos dedos de um ovino (figura 17A), corado com HE, mostraram fibras colágenas orientadas na mesma direção, com poucos fibroblastos fusiformes dispersos entre essas fibras. Já nas observações histopatológicas realizadas nos diferentes grupos experimentais evidenciaram-se fibroblastos de diferentes tamanhos incluindo formatos arredondados e ovais nos diferentes grupos experimentais quando comparados às células fusiformes, presentes no tendão normal. Nos tendões do grupo G1 (Figura 17B), do grupo G2 (Figura 17C) e do grupo G3 (Figura 17D) aos 30 dias após o procedimento cirúrgico, observou-se hiper celularidade e desorganização da matriz colágena, sendo que aos 60 dias (Figura 18 B,C,D) e aos 90 dias (Figura 19 B,C,D) no G1, G2 e G3 observou-se melhor arranjo das fibras colágenas quando comparado aos cortes dos grupos aos 30 dias. A celularidade gradualmente diminuiu e a interface entre a matriz recém formada e o tendão original tornou-se menos distinta, indicando a recuperação do tecido lesionado.

As células-tronco derivadas da medula óssea são células multipotentes com capacidade de se diferenciar em vários tipos celulares incluindo os fibroblastos e tenócitos (LIECHTY et al., 2000; PROCOCK et al., 2001; FU et al., 2003).

Recentes estudos demonstraram que as células-tronco podem incrementar a regeneração do tendão em modelos de lesões tendíneas in vivo (CROVACE et al., 2008; FORTIER et al., 2008) o que foi demonstrado neste estudo por meio das análises histológicas que evidenciaram aumento na celularidade, além da alteração na morfologia das células, observando-se células grandes com formatos arredondados e ovais.

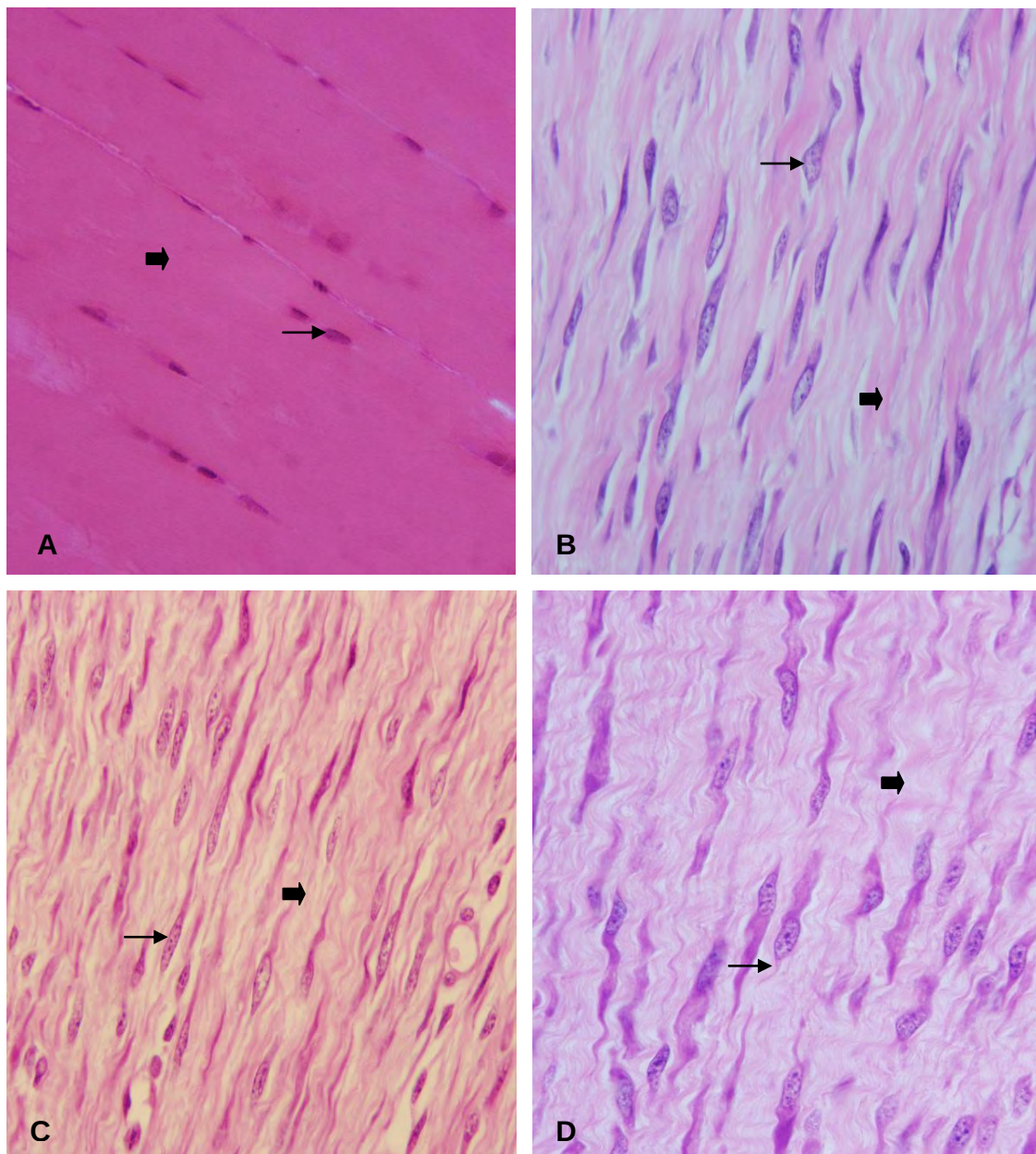


Figura 17. Fotomicrografia de tendão flexor superficial dos dedos do membro torácico de ovinos. Tendão normal (A). Tendão do grupo controle (G1) (B), tendão do grupo com implante da matriz de colágeno (C) e tendão do grupo com implante da matriz associada às CTMs aos 30 dias após a intervenção cirúrgica, evidenciando a presença de abundantes fibroblastos (→) e a organização das fibras colágenas (➡). Coloração HE. Aumento 100x.

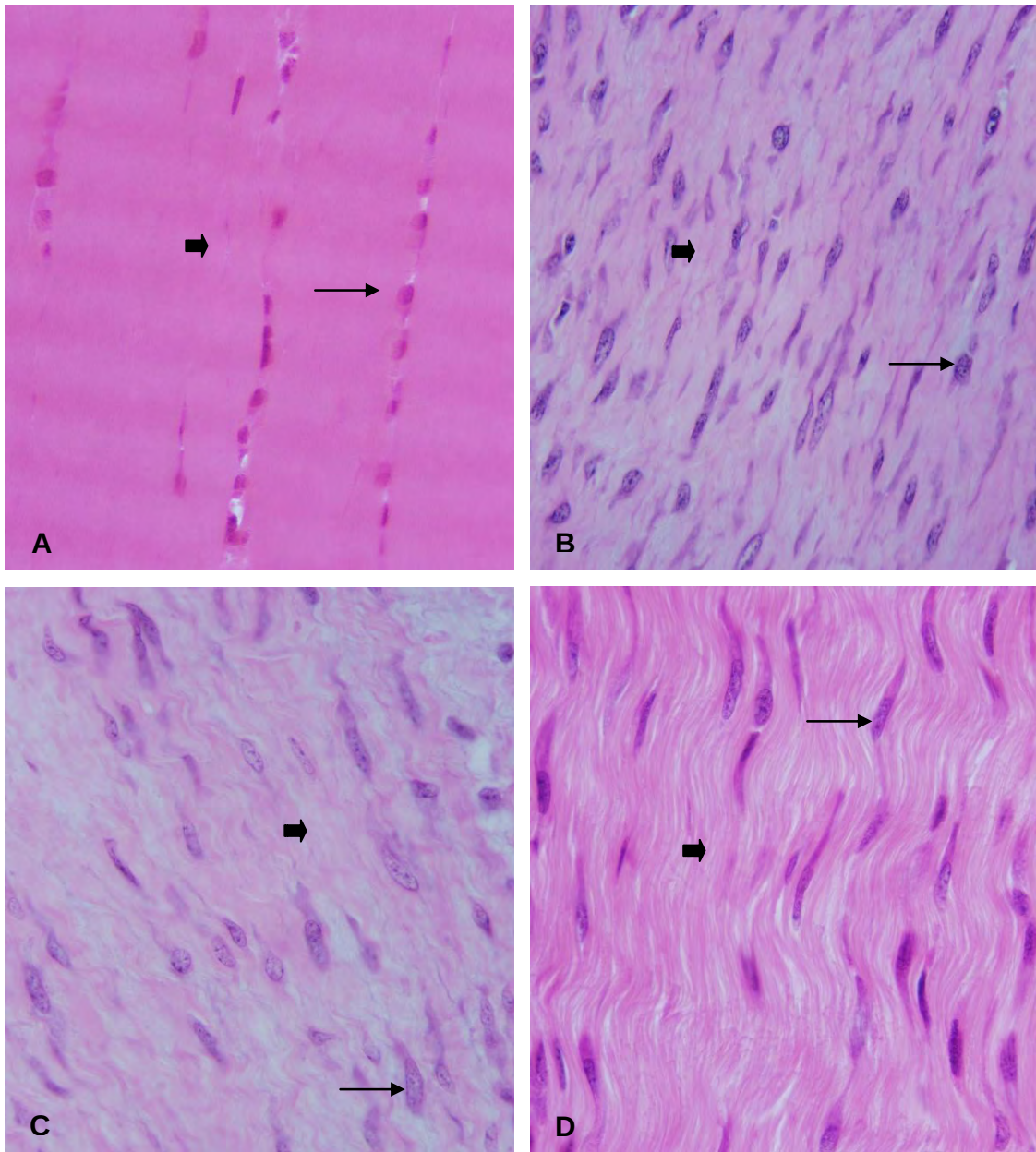


Figura 18. Fotomicrografia do tendão flexor superficial dos dedos do membro torácico de ovinos. Tendão normal (A). Tendão do grupo G1 (B), tendão do grupo G2 (C) e tendão do grupo G3 (D) aos 60 dias após o procedimento cirúrgico, mostrando fibroblastos (→) e a organização das fibras colágenas (▶). Coloração HE. Aumento de 100x

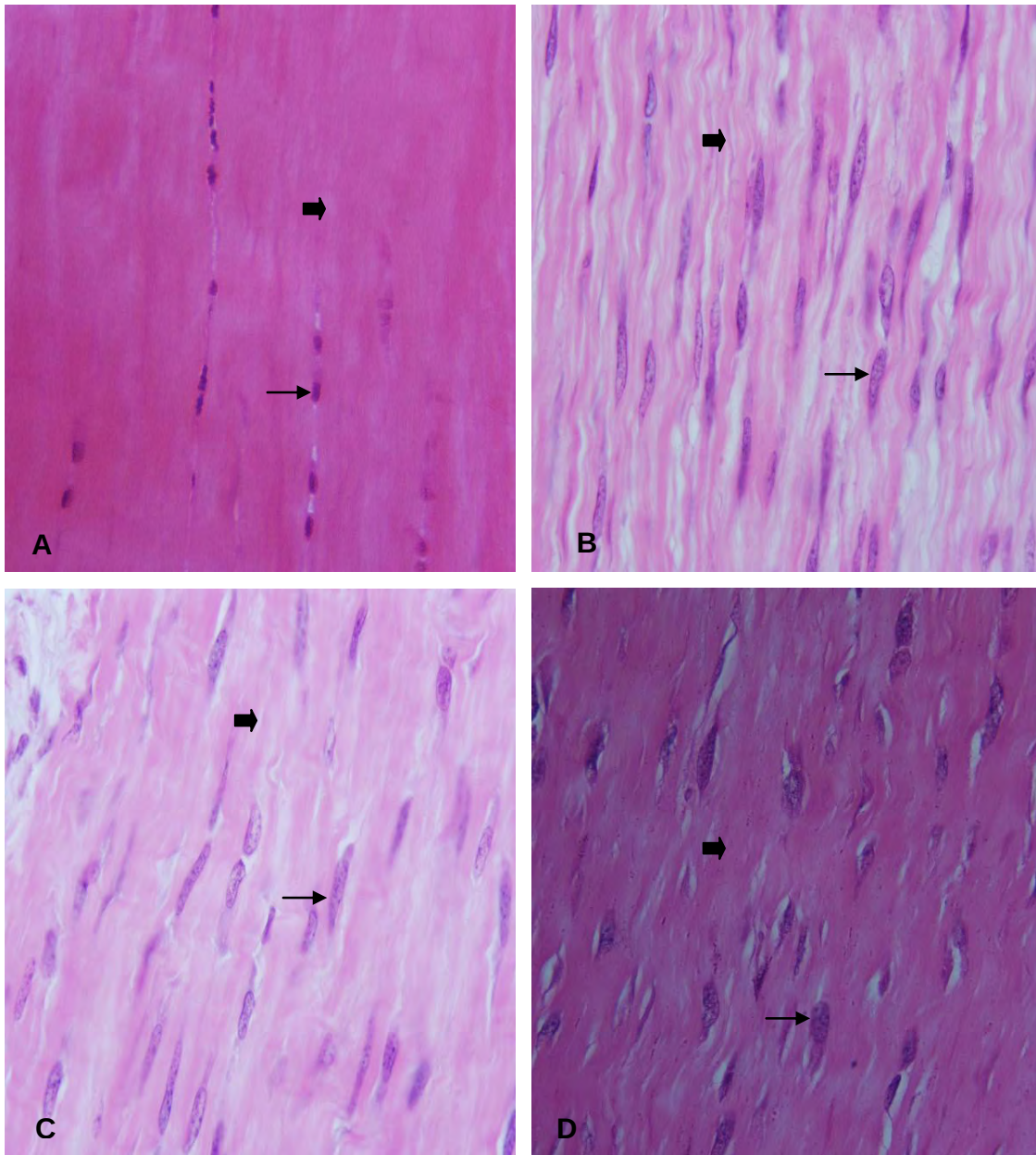


Figura 19. Fotomicrografia do tendão flexor superficial dos dedos do membro torácico de ovinos. Tendão normal (A). Tendões do grupo G1 (B), do grupo G2 (C) e do grupo (G3) aos 90 dias após o procedimento cirúrgico, mostrando quantidade de fibroblastos (→) e a organização das fibras colágenas (➡). Coloração HE. Aumento de 100x

Estas alterações ocorrem devido à alta regulação do metabolismo celular na preparação de grandes quantidades de matriz extracelular, comprovando-se um progressivo alinhamento e organização das fibras colágenas, similares às presentes no tecido autólogo.

COVACE et al. (2008), criaram um modelo de tendinite no tendão de Aquiles de ovino por meio de injeção de collagenase, evidenciando restauração da fibra de colágeno e aumento da expressão de colágeno tipo I e da proteína da matriz oligomérica, quando comparado com o animal controle, dados (tipo de colágeno) que não foram avaliados no presente estudo. SMITH e SMITH (2008) trataram equinos de corrida com lesões no tendão flexor digital superficial com implantação de células-tronco, demonstrando que o tratamento melhora os seus resultados e diminui a taxa de recidivas, corroboram os resultados do presente experimento considerando-se que o tendão apresentou-se com uma melhor reparação devido o comportamento das fibras colágenas e alinhamento dos fibroblastos.

A função primária das CTMs na reparação parece depender do local ou do tipo de lesão. As células-tronco podem fornecer células filhas que são diferenciadas e participar diretamente na reparação estrutural da cicatrização ou pode prover fatores que suportam a reparação e modulam o sistema imune (GONZALEZ et al. 2009; WU et al. 2007; TOMA et al. 2002).

Os fibroblastos do tecido adjacente ao tecido lesado proliferam logo após e migram para a lesão (MARTIN, 1997). O que foi verificado neste estudo nos diferentes períodos obtendo-se melhores resultados no grupo com implante da matriz de colágeno associada às células-tronco tanto na arquitetura da fibra colágena quanto na densidade celular.

Nos cortes corados com Picrossirius Red evidenciou-se a pobre organização das fibras colágenas e da matriz aos 30, 60 e 90 dias após o procedimento cirúrgico nos grupos G1 e G2 (Figuras 20, e 21; aos 30, 60 e 90 dias, nos grupos G1 e G2, respectivamente).

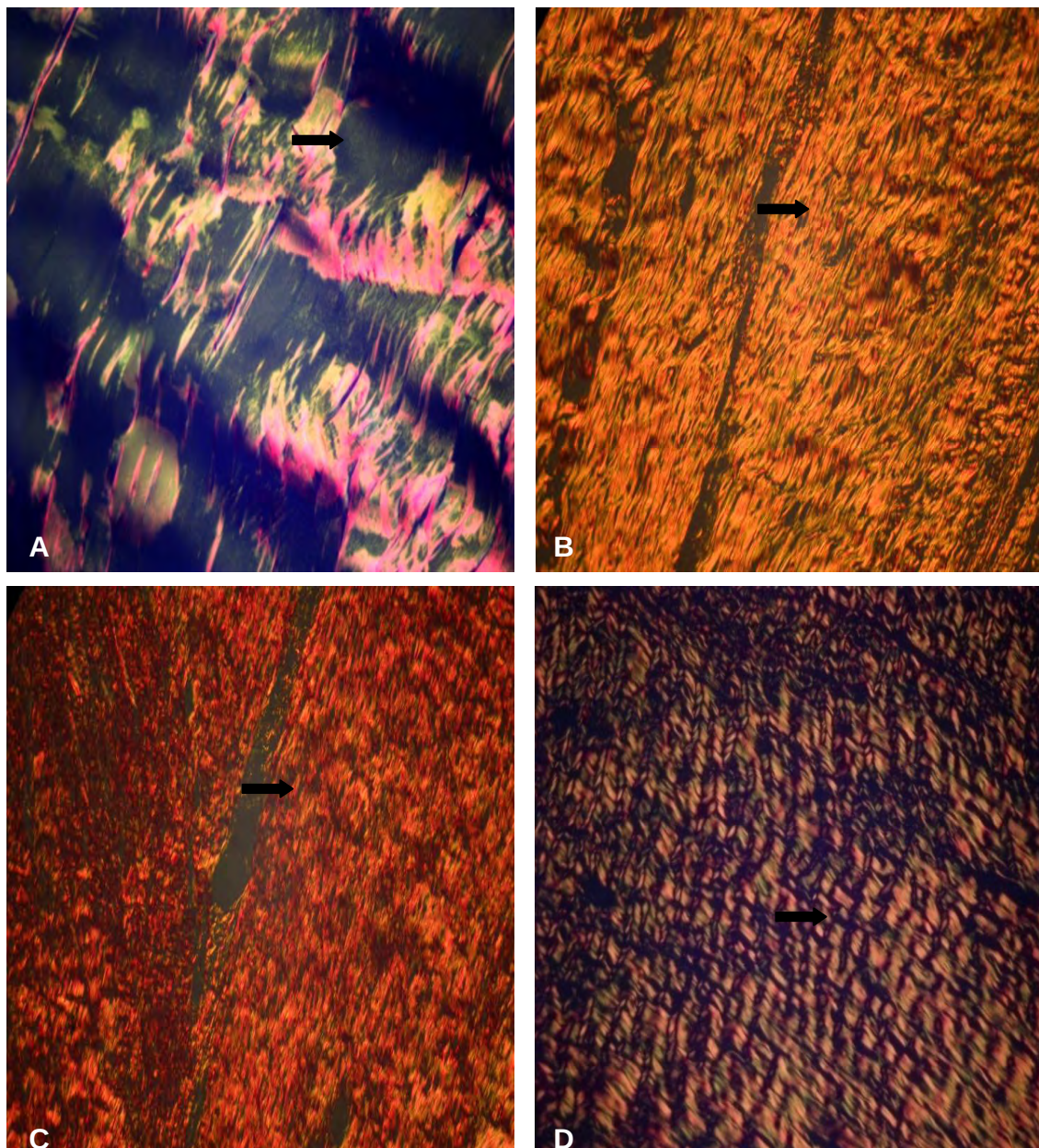


Figura 20. Fotomicrografias do tendão do músculo flexor superficial dos dedos de ovinos, evidenciando a organização das fibras colágenas (➡) dos tendões do grupo G1 (A), tendões do grupo G2 (B) e tendões do grupo G3 (D) aos 30 dias após a cirurgia. Coloração Picrosirius Red. Aumento 20x.

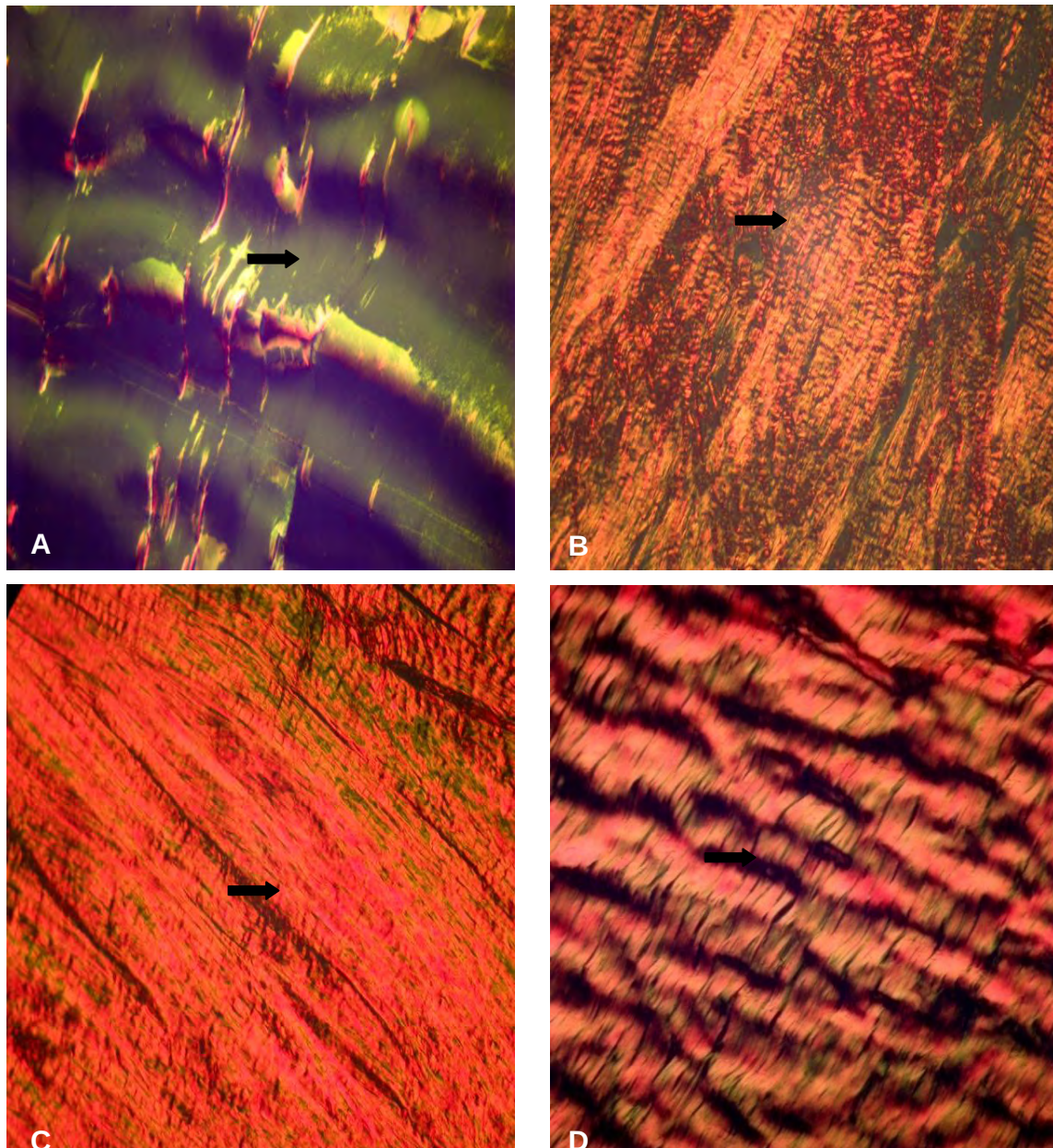


Figura 21. Fotomicrografia do tendão flexor superficial dos dedos do membro torácico de ovinos, apresentando a organização das fibras colágenas (➡) dos tendões do grupo G1 (A), tendões do grupo G2 (B) e tendões do grupo G3 (D) aos 60 dias após a cirurgia. Coloração Picrosirius Red. Aumento 20x.

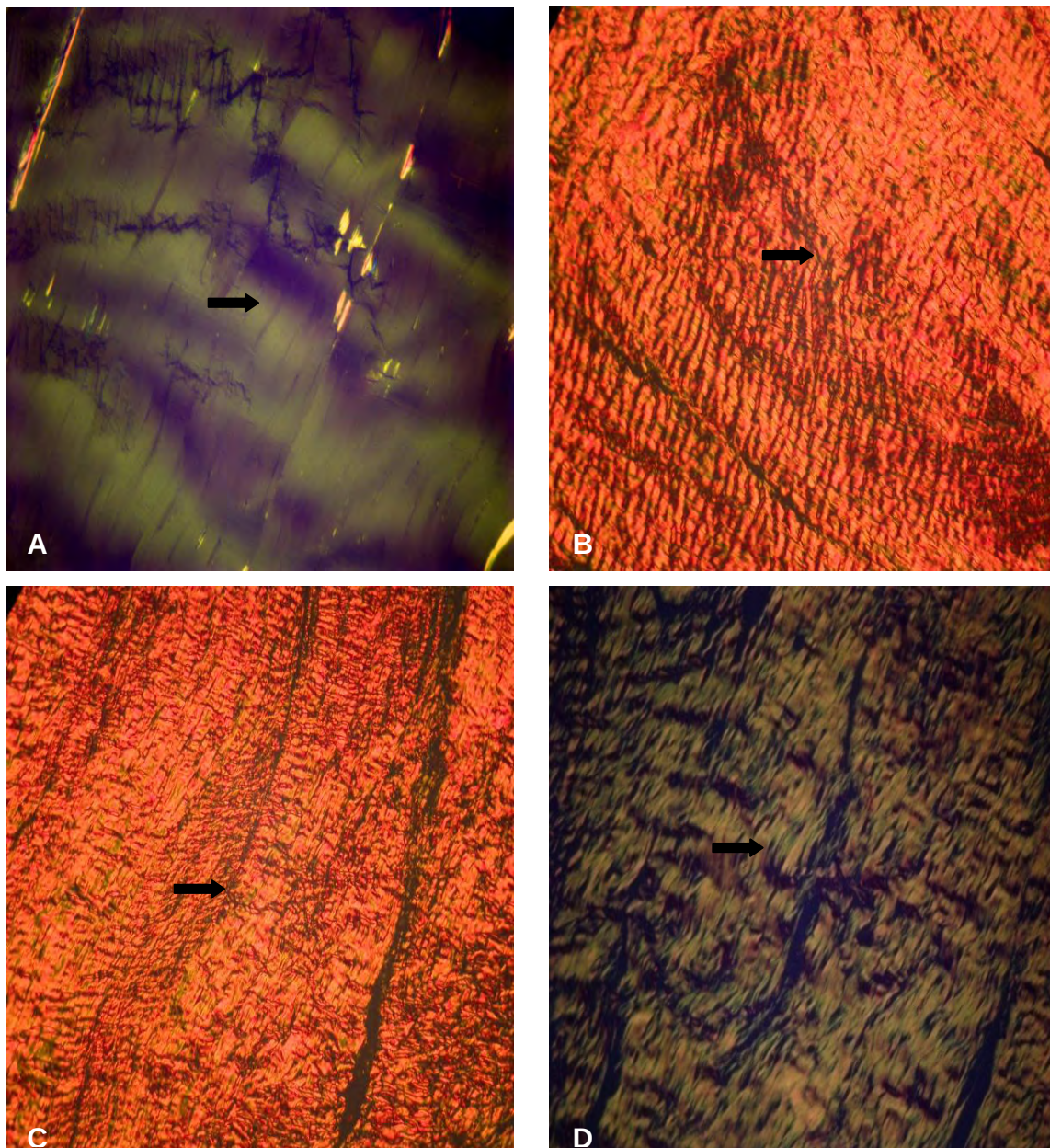


Figura 22. Fotomicrografia do tendão flexor superficial dos dedos do membro torácico de ovinos evidenciando organização das fibras colágenas (➡) dos tendões do grupo G1 (B), do grupo G2 (C) e do grupo G3 (D) aos 90 dias após a cirurgia. Coloração Picrosirius Red. Aumento 20x.

No grupo G3 pode-se verificar que a disposição das fibras colágenas observadas pelo picrossirius red se apresentou de forma similar às fibras colágenas do animal controle evidenciando uma atuação das células-tronco, potencializando o poder de reparação da lesão ocasionada (Figura 22).

A coloração do Picrosirius red varia de verde a amarelo, passando pelo laranja e vermelho, refletindo a formação de redes de colágeno, o diâmetro das fibras, a densidade dos feixes e o alinhamento das moléculas de colágeno (ACKERMAN et al., 2002; DAYAN et al., 1989).

Estudos realizados por HOU et al. (2009) demonstraram que a coloração verde nos estágios agudos da cicatrização do tendão esta associada à força tensora baixa, sendo que após substituição destas fibras finas a coloração apresenta-se vermelho-laranja se relacionando com força tensora alta. O que não se evidenciou no presente estudo observando-se coloração verde no tendão normal e vermelho-laranja nos estágios agudos do processo cicatricial.

5.5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

No tendão normal (figura 23A) observou-se distribuição regular e arranjo uniforme das fibras colágenas na mesma direção, sendo estas homogêneas e espessas. Nos tendões do grupo G1 e G2 aos 30 (Figura 23 B,C), 60 (Figura 24 B,C) e 90 (Figura 25 B,C) dias após o procedimento cirúrgico evidenciaram-se fibras colágenas finas, ramificadas com perda do arranjo, quando comparadas com as fibras colágenas do tendão normal. O grupo G2 apresentou melhor organização das fibras, porém evidenciaram-se similares as observadas no G1 aos 30, 60 e 90 dias após o ato cirúrgico. Já no grupo G3 aos 30 (figura 23D), 60 (figura 24D) e aos 90 (figura 25D) dias os tendões apresentaram-se com arranjo das fibras colágenas similares aos observados nas fibras normais, no entanto, evidenciaram-se finas quando comparadas ao tendão normal.

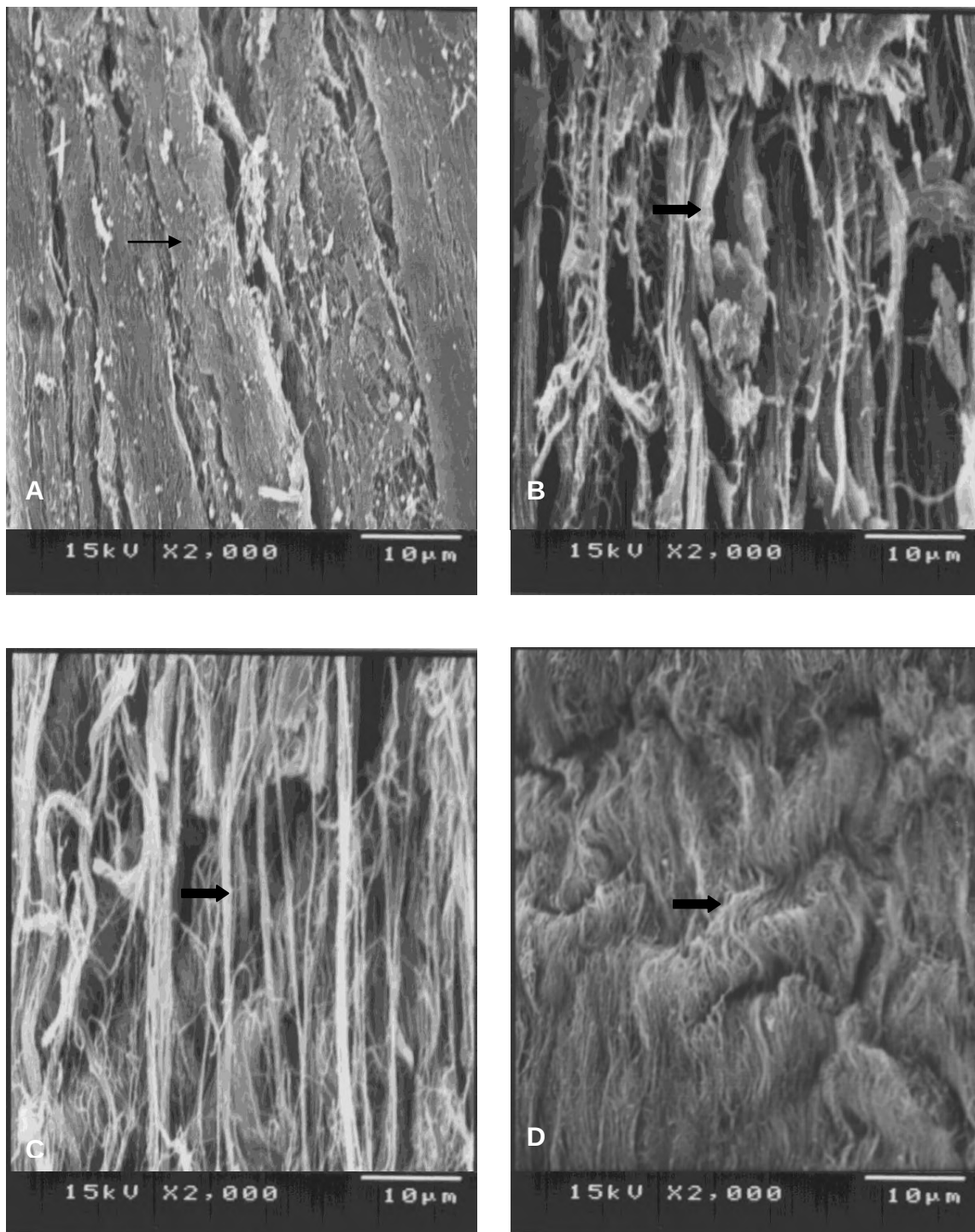


Figura 23. Eletronmicrografias do tendão flexor superficial dos dedos do membro torácico de ovinos ilustrando a disposição das fibras colágenas regulares (—→) do tendão normal (A), e arranjo irregular (—→) dos tendões do grupo controle (B), com a matriz de colágeno (C) e com a matriz associada as células-tronco (D) aos 30 dias após a cirurgia. Aumento 2000x.

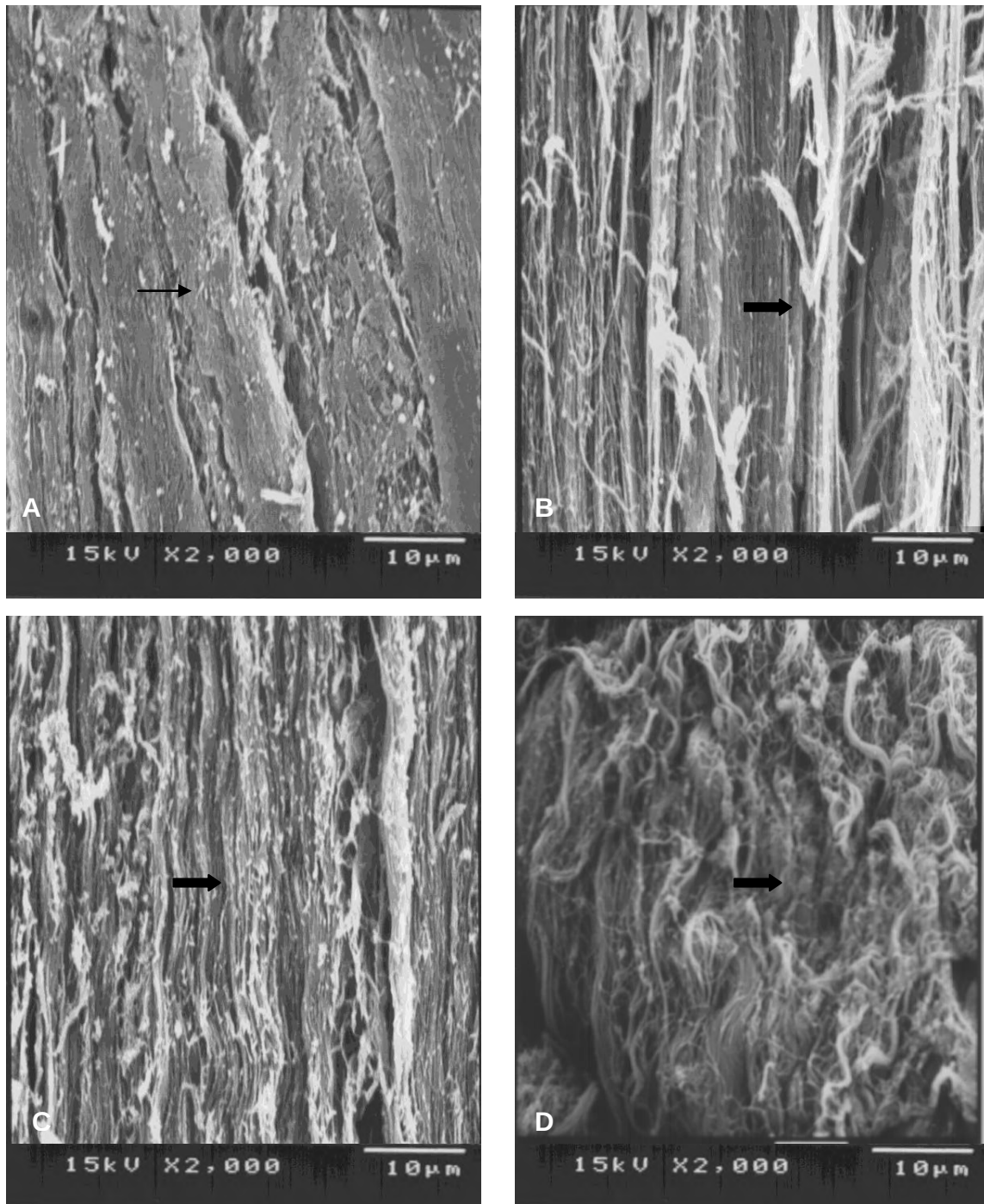


Figura 24. Eletronmicrografias do tendão flexor superficial dos dedos do membro torácico de ovinos ilustrando a disposição das fibras colágenas regulares (—→) do tendão normal (A), e dos arranjos irregulares (—→) dos tendões do grupo controle (B), com a matriz de colágeno (C) e com a matriz de colágeno associada as células tronco (D) aos 60 dias após a cirurgia. Aumento 2000x.

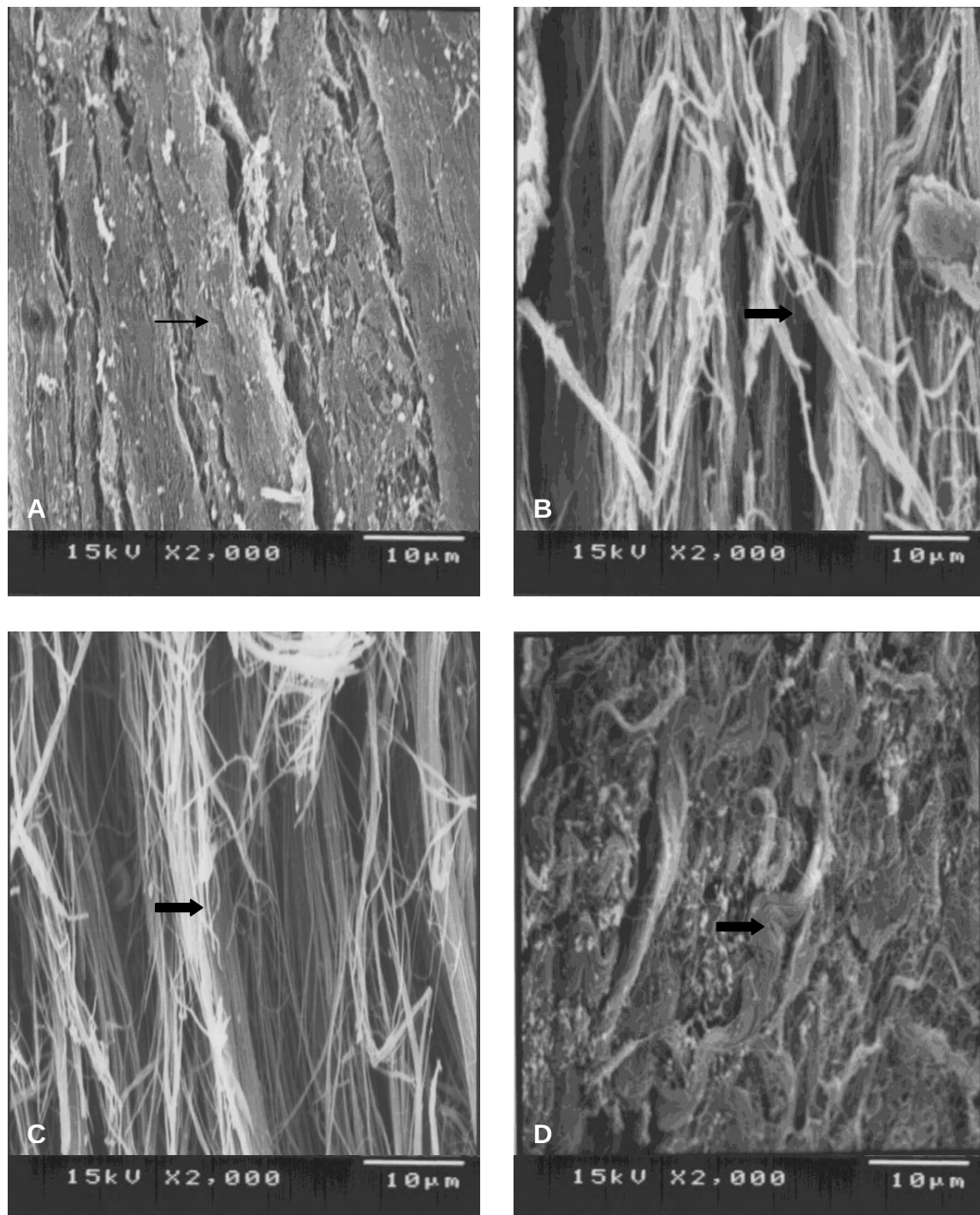


Figura 25. Eletronmicrografias do tendão flexor superficial dos dedos do membro torácico de ovinos ilustrando a disposição das fibras colágenas regulares (—→) do tendão normal (A), e dos arranjos irregulares (—→) dos tendões do grupo controle (B), com a matriz de colágeno (C) e com a matriz de colágeno associada as células-tronco (D) aos 90 dias após a cirurgia. Aumento 2000x.

PROCKOP et al., (1997) trabalhando com microscopia eletrônica de varredura em tendão de músculo de coelhos observaram durante o processo cicatricial aumento do número das fibras colágenas com diâmetro menor, fato este evidenciado pela possível formação de colágeno tipo III, o que não foi tipificado no presente estudo. O gene de expressão para o colágeno tipo I é inicialmente baixa, mas gradualmente retorna ao normal, já para o colágeno tipo III é persistentemente elevada no tendão em processo cicatricial (OSHIRO et al., 2003; TANG et al., 2004; BERGLUND et al., 2006)

5.7. Análise morfométrica

Analisando os valores de fibroblastos pode-se verificar que os maiores valores ($p \leq 0,05$) foram observados no grupo G2 aos 60 dias e os menores ($p \leq 0,05$) ocorreram no grupo G1 aos 90 e G3 aos 60 dias. Pode-se verificar que a redução do número de fibroblastos evidencia uma resposta ativa de cicatrização demonstrando ser mais intensa no grupo G3 considerando a melhor disposição e organização das fibras colágenas apresentadas nas figuras (17, 18, 19, 20, 21, 22).

No decorrer do período experimental os valores de fibroblastos foram maiores aos 60 dias nos grupos G1 e G2 em relação aos 30 e 90 dias, sendo que os menores valores dos grupos G1 e G2 ocorreram aos 90 dias, respectivamente. Em relação ao grupo G3 o maior valor de fibroblastos apresentou-se aos 30 dias, diminuindo significativamente aos 60 e elevando-se aos 90 dias ($p \leq 0,05$).

Na tabela 5 observou-se diferença ($p \leq 0,05$) nos números de fibrócitos nos grupos experimentais G1 e G2 a partir do 60º dia pós-cirurgia, sendo que no grupo controle o número de fibrócitos foi maior ($p < 0,05$) aos 60º dia em relação aos grupos G2 e G3. Os menores valores de fibrócitos ocorreram no grupo G2. No decorrer do período experimental, pode-se verificar no grupo G1 que o número de fibrócitos aumentou ($P < 0,05$) aos 30 e 60 dias em relação aos 90 dias. No grupo G2 o maior número de fibrócitos ocorreu aos 30 dias e o menor aos 60 dias enquanto que no grupo G3 o maior valor de fibrócitos apresentou-se aos 30 dias diminuindo ($p < 0,05$) aos 60 e 90 dias.

Tabela 4. Avaliação do número de fibroblastos e desvio padrão do grupo controle (G1), do grupo tratado com implante da matriz de colágeno (G2) e grupo com implante da matriz associada às células-tronco (G3) no tendão do músculo flexor superficial dos dedos de ovinos, durante o período experimental.

Tempo pós-cirurgia (dias)	Tratamentos		
	Grupo controle (G1)	Grupo matriz de colágeno (G2)	Grupo matriz de colágeno + CTMs (G3)
30	10,12 ^{abC} ±1,45	10,64 ^{abA} ±1,38	12,33 ^{aB} ±1,61
60	11,20 ^{aB} ±2,67	12,45 ^{aA} ±1,30	9,65 ^{bC} ±1,31
90	9,03 ^{bC} ±1,72	10,91 ^{bA} ±2,19	10,38 ^{cB} ±1,98

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na coluna, não diferem entre si. (P>0,05). Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na linha, não diferem entre si. (P>0,05).

Tabela 5. Avaliação do número de fibrócitos e desvio padrão do grupo controle (G1), do grupo tratado com implante da matriz de colágeno (G2) e grupo com implante da matriz associada às células-tronco (G3) no tendão do músculo flexor superficial dos dedos de ovinos durante a fase experimental.

Tempo pós-cirurgia (dias)	Tratamento		
	Grupo controle (G1)	Grupo matriz de colágeno (G2)	Grupo matriz de colágeno + CTMs (G3)
30	4,22 ^{aA} ±1,04	3,14 ^{bC} ±1,03	4,09 ^{bB} ±1,15
60	4,26 ^{aA} ±1,35	3,00 ^{bC} ±0,80	3,77 ^{aB} ±0,78
90	3,57 ^{bC} ±1,23	3,21 ^{aB} ±1,04	3,95 ^{aA} ±1,30

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na coluna, não diferem entre si (P<0,05). Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na linha, não diferem entre si (P<0,05).

Pode-se deduzir que o grupo G3 apresentou melhor resposta de cicatrização do tendão do músculo, baseado no comportamento numérico dos fibroblastos e fibrócitos no decorrer do período experimental, considerando-se que a maior população celular ocorreu aos 30 dias após a tenectomia sugerindo que estas podem ser células que tem migrado para a área lesada em resposta a fatores quimiotáticos liberados em resposta às injúrias produzidas nos tecidos, sendo que um dos fatores que favorece este comportamento é a vascularização.

Woo et al., (1999), verificaram em tendões de músculos que a cicatrização destes envolvem quatro fases, hemorrágica, inflamatória, de proliferação e remodelação e maturação. Sendo assim, pudemos constatar em nossos resultados estas fases, principalmente aos 30 dias após o procedimento cirúrgico, supondo identificar a fase de proliferação, e no decorrer dos 60 e 90 dias, provavelmente está se estabelecendo a fase de remodelação e maturação, uma vez que esta fase é marcada pela gradual diminuição na celularidade dos tecidos.

Embora a reparação tendínea possa ocorrer de forma intrínseca, tal processo é mais lento quando comparado à participação extrínseca de células produtoras de colágeno e adequado suprimento sangüíneo (GOODSHIP e BIRCH, 1996). Dessa maneira, esses resultados permitem inferir que a engenharia de tecidos utilizando CTMs associadas a enxertos biológicos apresentam tratamento clínico promissor para a reparação de tendões, contudo estudos complementares posteriores devem ser realizados para a determinação dos diferentes genes de expressão dos fatores de crescimento, visando uma melhor compreensão da reparação tendínea “in vivo”. Assim como para determinar se a inclusão destes fatores estimula a reparação do tendão obtendo-se tecido autólogo funcional.

CONCLUSÕES

- A modificação das CTMs para expressar a molécula GFP foi bem sucedida, o que permitirá o rastreamento e a obtenção de respostas acuradas sobre o papel destas células em modelos experimentais envolvendo terapia celular.
- Verificou-se melhor resposta no uso do tratamento com implante da matriz de colágeno associada às CTMs quando comparado com os outros grupos, podendo-se considerar promissor o seu uso na reparação cirúrgica de lesões tendíneas.

REFERÊNCIAS

ACKERMANN, P.W.; AHMED, M.; KREICBERG. Early nerve regeneration after achilles tendon rupture-a prerequisite for healing? A study in the rat. **J. Orthop Res.**, n. 20, p. 849-856, 2002.

ALVES, A. L. G.; MIKAIL, S. Afecções tendíneas e ligamentares. In: MIKAIL, S.; PEDRO, C. R. **Fisioterapia Veterinária**. São Paulo: Manole, 2006, p. 199-208.

AWAD H. A. et al. Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon. **Tissue Eng.** v. 5, n. 1, p. 267-77, 1999.

AWAD H. A. et al. Repair of patellar tendon injuries using a cell-collagen composite. **J. Orthop. Res.** v. 21, n. 3, p. 420-431, 2003.

BEHMER, A. O.; TOLOSA. C. M. E.; NETO, F. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo: Editora EDART, 1975.

BENJAMIN, M.; RALPH J. R. Fibrocartilage in tendons and ligaments – na adaptation to compressive load. **J. Anat.** v. 193, p. 481-494, 1998.

BERGLUND, M. et al. Patterns of mRNA expression for matrix molecules and growth factors in flexor tendon injury: differences in the regulation between tendon and tendon sheath. **J. Hand Surg. [Am]**, v. 31, p. 1279-1287, 2006.

BIANCO, P. et al. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology and potential applications. **Stem Cells**, v 19, p. 180-192, 2001.

BOYUM, A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.**, v. 21, p. 77-89, 1968.

BUTLER DL, GOLDSTEIN SA, GUILAK F. Functional tissue engineering: the role of biomechanics. **J. Biomech. Eng.**; v 122, p. 570-575, 2000.

CORONADO Jr., G. S.; MARTINEZ, S. A.; SWENSON, C. L. Virucidal and osteogenic effects of 98% glycerol and ethylene oxide preservation of bone allograft in the cat. In: ANNUAL CONFERENCE OF VETERINARY ORTHOPEDIC SOCIETY, 25. 1998, Snoumas, Colorado, USA. **Proceeding.....**, p. 31.

CRAWFORD, D. H.; INGLE, J. E. Repair of the deep tendon deficit in a horse using polipropylene implant. **Can. Vet. J.** v. 38, n. 5, p. 294-296, 1997.

CREVIER-DENOIX, N. et al. Correlations between mean echogenicity and material properties of normal and diseased equine superficial digital flexor tendons: an in vitro segmental approach. **J. Biomech.**, v. 38, p. 2212-2220, 2005.

CROVACE, A. et al. Histology and immunohistochemistry study of ovino tendon grafted with cBMSCs and BMMNs after collagenase-induced tendinitis. **Vet. Orthop. Traumatol.** v. 24, n. 1, p. 191-201, 2008.

DAYAN, D. et al. Are the polarization color of picosirius red-stained collagen determined only by the diameter of the fibers? **Histochemistry**, v. 93, p. 27-29, 1989.

DEANS, R. J. e MOSELEY A. B. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. **Exper. Hematol.** v. 28, p. 875-884, 2000.

DENIS, J. E. et al. A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse. **J. Bone Miner. Res.** v 14, p. 700-709, 1999.

DENOIX, JM. Diagnostic techniques for identification of tendon and ligament injuries. **Vet. Clin. North Am: equi. pract.** v. 10, n. 2, p. 356-407, 1994.

DJOUAD, F. Et al. Phenotypic, genotypic and functional characterization of mesenchymal stem cells from synovial membrane compared with bone marrow. **Arthritis Res. & theraphy.**, v. 7, n. 1, p. 73, 2005.

ESMAY, M. L. Principles of animal environment. **Textbook edition.** Wesport, Conn: Av Pub. Co. 1978

ENWEMEKA, C.S. Inflammation cellularity and fibroblastogenesis in regeneration tendon implications of tendon rehabilitation. **Physical Ther.** v. 69, n. 10, p. 816-825, 1989.

ENWEMEKA, C.S. Attenuation and penetration of visible 632.8 nm and invisible infra-red 904 nm light in soft tissues. **Laser Ther.** v. 13, p. 95-101, 2001.

FARELLY, A. Et al. Extracellular matrix regulates apoptosis in mammary epithelium through a control on insulin signaling. **J. Cell. Biol.**, v. 144, p. 1337-1348, 1999.

FERRARI, M. Et al. A comparison of three-dimensional ultrasound, two dimensional ultrasound and dissections for determination of lesion volume in tendons. **Ultrasound in Med. A Biol.**, v. 32, n. 6, p. 797-804, 2006.

FOLKMAN, J. How the field of controlled-release technology began, and its central role in the development of angiogenesis. **Res. Biom.**, v. 11, n. 9, p. 615-618, 1990.

FORTIER, L. A. et al. Regenerative medicine for tendinous and ligamentous injuries of sport horses. **Vet. Clin. North Am: equi. Pract.** v. 24, n. 1, p. 191-201, 2008.

FRIEDENSTEIN, A. J.; GORSKAJA, J. F.; KULAGINA, N. N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. **Exp. Hematol.** v. 4, n. 5, p. 267-274, 1976.

FU, S. C. et al. The roles of bone morphogenetic protein (BMP) 12 in stimulating the proliferation and matrix production of human patellar tendon fibroblasts. **Life Sci.**, v. 72, p. 2965-2974, 2003.

GONZALEZ, M. A. et al. **Gastroenterology**, v. 136, p. 978, 2002.

GOODSHIP, A. E.; BIRCH, H. L.; WILSON, A. M. The pathobiology and repair of tendon and ligament injuries. In: TURNER, A.S.; DYSON, S. **Vet. Clin. North Am. equi. pract.**, Philadelphia, , v. 10, n. 2, 1994.

GOODSHIP, A. E., BIRCH, H. L. The pathophysiology of the flexor tendons in the equine athlete. In: DUBAI INTERNATIONAL EQUINE SIMPOSIUM, 1996, Dubai. **Proceedings....** Dubai: Neyenesck printers, 1996. P.83-107.

GRINNELL, F. et al. Differences in the regulation of fibroblast contraction of floating versus stressed collagen matrices. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 918-923, 1999.

GRONTHOS, S. et al. Integrin-mediated interactions between human bone marrow stromal precursor cells and the extracellular matrix. **Bone**, v. 28, p. 174-181, 2001.

HOU, Y. et al. The roles of TGF- β 1 gene transfer on collagen formation during achilles tendon healing. **Bioch. And Bioph. Res. Comm.**, v. 383, p. 235-239, 2009.

INATOMI, L.S. et al. Implante de dura-máter heteróloga em cães. Ver. Centro de Cien. Rur., santa Maria, v. 10, n. 3, p. 291-297, 1980.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Tecido conjuntivo. In: **Histologia básica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995.

KASAL, S. Enhanced effect of chemically modified collagen substratum on attachment and growth of fibroblasts in serum-free medium. **Biomed. Res.**, v. 2, p. 147-157. 1983.

KATO, T. **Collagen fibers for use in medical treatments**. US 4.420339. December 13, 1983.

KOOB, T. J.; SUMMERS, A. P. Tendon-bridging the gap. Com Biochem physiol, part A **Mol. Integr. Physiol.** v. 133, p. 905-909, 2002.

LIECHTY, K. W. et al. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in útero transplantation in sheep. **Nat. Med.** v. 6, p. 1282-1286, 2000.

MACHADO, M. V. M. et al. Efeito da laserterapia em tendinite experimental no tendão flexor digital superficial em eqüinos; estudo histológico e ultra-sonográfico. **Arch. Vet. Sci.**, Botucatu/SP, v. 5, p. 111-115, 2000.

MADDEN, J. W. Current concepts of wound healing as applied to hand surgery. **Orthop. Clin. North Am.**, v. 1, n. 2, p. 325-334, 1970.

MAFFULI, N.; MOLLER, H. D.; EVANS, C. H. Tendon healing: can it be optimized. **Br. J. Sports Med.**, v. 36, p. 315-316, 2002.

MARTIN, P. **Science** 276, 75. 1997.

McLLWRAITH, C. W. Doenças das articulações, tendões, ligamentos e estruturas relacionadas. In: ADAMS, O. R.; STASHAK, T. S. **Claudicação em eqüinos**. 4. ed. São Paulo: Roca, 1994, p. 462-478.

MERRILLES, M. J., FLINT, M. H. Ultrastructural study of tension and pressure zones in a rabbit flexor tendon. *Am. J. Anat.*, v. 157, p. 87-106, 1980.

MILLER, J. C.; MONGE, L. Body temperature and respiration rate, and they relation to adaptability in sheep. **J. Anim. Sci.**, v. 5, p. 147-153, 1946.

MRUÉ, F. Substituição do esôfago cervical por prótese biosintética de látex. Estudo experimental em cães. 86f. **Dissertação** (Mestrado em Medicina) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 1996.

MUGRALA, D. C. et al. Phenotypicand fuctional characterization of ovine mesenchymal stem cells: application to a cartilage defect model. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 67, p. 288-295, 2008.

OIKAWA, M.; KASASHIMA, Y. The Japanese experience with tendonitis in racehorses. **J. Equine Sci.**, v. 13, n. 2, p. 41-56, 2002.

OSHIRO, W. et al. Flexor tendon healing in the rat: a histologic and gene expression study. **J Hand Surg [Am]**, v. 28, p. 814-23, 2003.

OWEN, M. Marrow stromal stem cells: marrow derived osteogenic precursors. **Ciba Found Symp.** v. 136, p. 42-60, 1988.

PEREIRA, R. F. et al. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage and lung in irradiated mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, p. 4857-4861, 1995.

PITTENGER, M. F. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284, p. 143-147, 1999.

PROCKOP, D. J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. **Science**, v. 276, n. 5309, p. 71-74, 1997.

PROCKOP, D. J. ; SERIYA, I. ; COLTER, D. C. Isolation and characterization of rapidly self-renewing stem cells from cultures of human marrow stromal cells. **Cytotherapy**, v. 3, n. 5, p. 393-396, 2001.

RICHARDS, M. et al. Marrow-derived progenitor cell injections enhance new bone formation during distraction. **J. Orthop. Res.** v. 17, p. 900, 1999.

ROONEY, J. R., GENOVESE, R. L. A survey and analysis of bowed tendon in thoroughbred racehorses. **J Equine Vet Sci.**, v. 1, p. 48-53, 1981.

SAINI, N. S. et al. Homologous plasma-stored tendon grafting in equids – Gross and histophormological observations. **Res. Vet. Sci.**, v. 64, p. 85-90, 1998.

SAS INSTITUTE. User's guide: stat. **version 9.00**. 4 ed. v. 1, Cary, 2002.

SIMMION, M.; FONTANA, F. Autogenous and xengeneic boné graft for the bone regeneration. A literatura Review. **Minerva Stomatol**, v. 53, n. 5, p. 191-206, 2004.

SINGH, M. P. et al. The effect of electrostatic charge interactions on release rates of gentamicin from collagen matrices. **Pharm. Res.**, v. 12, p. 1205-1210, 1995.

SISSON, S. In: GETTY, R. **Anatomia dos animais domésticos**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v. 2, 1996.

STASHAK, TS. Manejo de las heridas que afectan a tendones, paratendones y vainas tendinosas. In: **Manejo de las heridas em equinos**. Buenos Aires: Inter-médica, 1994. cap 10, p. 201-215.

STRICKLAND, J. W., GLOGOVAC, S. V. Digital function following flexor tendon repair in zone II: a comparison of immobilization and controlled passive motion techniques. **J. Hand Surg.**, v. 5, n. 6, p. 537-543, 1980.

STRICKLAND, J. W. Developmente of flexor tendon surgery. **J. Hand surg.**, v. 25A, p. 214-235, 2000.

SUZIGAN, S. et al. Anomalous metaplastic ossification of anionic collagen coated polypropylene mesh after implantation in the abdominal wall. In: CONGRESO VIRTUAL HISPANO AMERICANO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA. Disponível em: <http://conganat.uniovi.es/posters/120/texto.htm>. Acesso em: 01 set. 2001.

TANG et al. Expression of genes for collagen production and NF- κ B gene activation of "in vivo" healing flexor tendons. **J. Hand Surg.**, v. 29A, p. 564-570, 2004.

TAVASSOLI, M.; FRIEDENSTEIN, A. Hemopoietic stromal micro-environment. **Am. J. Hematol.** v. 15, n. 2, p. 195-203, 1983.

THOMAS, J.; KOOB, T. J. Biomimetic approaches to tendon repair. **Comp. Biochem. Physiol. Part A.**, Tampa, n. 133, p. 1171-1192, 2002.

THOMASSIAN, A. Afecções do aparelho locomotor. In: **Enfermidades dos cavalos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 1999, p. 157-164.

TILL, J. E.; MCCOULLOCH, E. A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. **Radiat. Res.**, v. 14, p. 213-22, 1961.

TROJANOWSKA, M. et al. Pathogenesis of fibrosis: type 1 collagen and the skin. **J. Mol. Med.**, v. 76, p. 266-274, 1998.

TULI, R.; TULI, S. et al. Characterization of multipotential mesenchymal progenitor cells derived from human trabecular bone. **Stem Cells**, v. 21, p. 681-693, 2003.

VALDÉS-VÁSQUEZ, M. A. et al. Evaluation of an autologous tendon graft repair method for gap healing of the deep digital flexor tendon in horses. *Vet. Surg.*, v. 25, p. 342-350, 1996.

VAN DER REST, M., GARRONE, R. Collagen family of protein. **Faseb J.**, v. 5, p. 2814-2823, 1991.

VAN SCHIE, H. T. M.; BAKKER, E. M. Structure related echoes in ultrasonographic images of equine superficial digital flexor tendons. **Am. J. Vet. Res.** v. 61, p. 202-209, 2000.

VATS, A. et al. Scaffoldes and biomaterials for tissue engeneering: a review of clinical applications, **Clin. Otolaryngol.**, v. 28, p.165-172, 2003.

VOGEL, K. G.; KOOB, T. J. Structural specialization in tendons under compression. **Int. Rev. Cytol.**, v. 115, p. 267-293, 1989.

WAKITANI, S. et al. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. **J. Bone Joint Surg. Am.**, v. 76, p. 579-92, 1994.

WOO S. L-Y et al., Tissue engineering of ligament and tendon healing. **Clin. Orthopaedics and rel. Res.**, n. 367S, p. 312-323, 1999.

WU, Y. L. et al. Sensitive and specific real-time polymerase chain reaction assay to accurately determine copy number variations (CNVs) of human complement C4A, C4B, C4-long, C4-short, and RCCX modules: Elucidation of C4 CNVs in 50 consanguineous subjects with defined HLA genotypes. **J. of Imm.**, v. 179, p. 3012-3025, 2007.

YOUNG, R. G. et al. Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. **J. Orthop. Res.**, v. 16, n. 4, p. 406-413, 1998.

YUNG, K. L.; DENG, C. L. Comparison of physical-chemical properties of type I collagen from different species. **Food chemistry**. Taiwan. 2005.

APENDICES

Tabela 6. Temperatura retal (°C) observada no pré-jejum e às 24 horas após a intervenção cirúrgica do grupo dos ovinos controle (G1), grupo com implante de membrana de colágeno (G2) e grupo com implante de membrana associada às células-tronco (G3).

Grupos	Nº do animal	Valores (°C)	
		Pré-jejum	24h
G1	Branco	38,9	39,0
	02	37,8	37,9
	10	39,0	38,9
	11	38,5	38,8
	12	38,7	38,9
	13	37,9	38,0
	19	38,5	38,5
G2	15	38,2	38,6
	18	37,9	38,1
	20	38,8	39,0
	21	37,9	38,2
	22	39,0	39,0
	23	38,5	38,8
	24	39,2	39,2
G3	03	39,3	39,0
	04	37,5	38,0
	05	38,4	38,7
	06	38,2	37,9
	08	39,3	38,5
	09	37,9	37,5

Tabela 7. Frequência cardíaca (nº de batimentos /minuto) observada no pré-jejum e às 24 horas após a intervenção cirúrgica dos ovinos do grupo controle (G1), do grupo com implante de membrana de colágeno (G2) e grupo com implante de membrana associada às células-tronco (G3).

Grupos	Nº do animal	Valores (nº de batimentos/min)	
		Pré-jejum	24h
G1	Branco	72,0	80,0
	02	75,0	82,0
	10	89,0	95,0
	11	70,0	80,0
	12	100,0	110
	13	60,0	75,0
	19	84,0	89,0
G2	15	60,0	78,0
	18	80,0	87,0
	20	80,0	82,0
	21	60,0	70,0
	22	90,0	89,0
	23	70,0	78,0
	24	100,0	97,0
G3	03	88,0	83,0
	04	75,0	74,0
	05	100,0	90,0
	06	78,0	80,0
	08	80,0	85,0
	09	85,0	82,0

Tabela 8. Frequência respiratória (nº de movimentos /minuto) observada no pré-jejum e às 24 horas após a intervenção cirúrgica dos ovinos do grupo controle (G1), do grupo com implante de membrana de colágeno (G2) e grupo com implante de membrana associada às células-tronco (G3).

Grupos	Nº do animal	Valores (nº de movimentos/min)	
		Pré-jejum	24h
G1	Branco	36,0	32,0
	02	38,0	30,0
	10	27,0	25,0
	11	50,0	38,0
	12	36,0	36,0
	13	28,0	29,0
	19	40,0	35,0
G2	15	38,0	38,0
	18	40,0	35,0
	20	25,0	25,0
	21	35,0	30,0
	22	29,0	28,0
	23	30,0	30,0
	24	50,0	39,0
G3	03	30,0	35,0
	04	20,0	28,0
	05	39,0	35,0
	06	28,0	30,0
	08	39,0	33,0
	09	40,0	38,0

Tabela 9. Contagens de hemácias (n° de células $\times 10^6/\mu\text{L}$) observadas no pré-jejum dos ovinos do grupo controle (G1), com implante de membrana de colágeno (G2) e grupo com implante de membrana associada às células-tronco (G3).

Grupos	Nº do animal	Valores (n° células $\times 10^6/\mu\text{L}$)
		Pré-jejum
G1	Branco	8,74
	02	8,21
	10	8,73
	11	8,99
	12	8,82
	13	8,84
	19	10,6
G2	15	9,22
	18	10,0
	20	9,74
	21	8,05
	22	7,16
	23	9,81
	24	8,60
G3	03	11,5
	04	9,62
	05	10,7
	06	10,0
	08	12,0
	09	12,0

Tabela 10. Hematócrito (%) observado no pré-jejum dos ovinos do grupo controle (G1), com implante de membrana de colágeno (G2) e grupo com implante de membrana associada às células-tronco (G3).

Grupos	Nº do animal	Valores (%)
		Pré-jejum
G1	Branco	27,6
	02	25,3
	10	27,0
	11	29,8
	12	29,6
	13	29,4
	19	34,2
G2	15	31,0
	18	30,8
	20	31,0
	21	25,5
	22	21,3
	23	30,8
	24	26,3
G3	03	37,5
	04	37,0
	05	35,9
	06	38,5
	08	42,4
	09	43,4

Tabela 11. Concentrações de hemoglobina (g/dL) observadas no pré-jejum dos ovinos do grupo controle (G1) e com implante de membrana de colágeno (G2) e grupo com implante de membrana associada às células-tronco (G3).

Grupos	Nº do animal	Valores (g/dL)
		Pré-jejum
G1	Branco	9,6
	02	9,4
	10	9,8
	11	10,4
	12	9,8
	13	10,5
	19	12,0
G2	15	8,9
	18	11,6
	20	11,6
	21	9,8
	22	8,8
	23	10,8
	24	10,9
G3	03	11,6
	04	10,1
	05	10,8
	06	12,5
	08	13,3
	09	13,0

Tabela 12. Contagens de leucócitos (n° células $\times 10^3/\mu\text{L}$) observadas no pré-jejum dos ovinos do grupo controle (G1), com implante de membrana (G2) e grupo com implante de membrana associada às células-tronco (G3).

Grupos	Nº do animal	Valores (n° células $\times 10^3/\mu\text{L}$)
		Pré-jejum
G1	Branco	6,2
	02	5,1
	10	9,6
	11	8,1
	12	8,9
	13	6,7
	19	9,5
G2	15	4,8
	18	7,9
	20	7,4
	21	5,0
	22	8,8
	23	7,1
	24	10,1
G3	03	4,8
	04	6,4
	05	7,1
	06	7,8
	08	10,0
	09	18,0

Tabela 13. Valores absolutos de basófilos (BAS), eosinófilos (EOS), neutrófilos bastonetes (NB), neutrófilos segmentados (NS), linfócitos (LINF) e monócitos (MON) observados no pré-jejum dos ovinos do grupo controle (G1), com implante de membrana (G2) e grupo com implante de membrana associada às células-tronco (G3).

Grupos	Nº do animal	BAS	EOS	NB	NS	LINF	MON
		($\times 10^3/\mu\text{L}$)	($\times 10^3/\mu\text{L}$)	($\times 10^3/\mu\text{L}$)	($\times 10^3/\mu\text{L}$)	($\times 10^3/\mu\text{L}$)	($\times 10^3/\mu\text{L}$)
G1	Branco	0,00	0,31	0,62	3,16	2,04	0,31
	02	0,00	0,10	0,00	2,55	2,34	0,10
	10	0,00	0,96	0,00	3,74	5,56	0,19
	11	0,00	0,48	0,00	3,07	4,53	0,00
	12	0,89	0,17	0,00	3,20	5,34	0,89
	13	0,00	0,00	0,00	2,34	4,35	0,00
	19	0,00	0,28	0,00	3,04	5,89	0,28
G2	15	0,00	0,14	0,48	3,12	1,34	0,14
	18	0,00	0,47	0,00	3,87	3,23	0,31
	20	0,00	0,74	0,00	2,73	4,29	0,29
	21	0,00	0,25	0,50	2,15	2,40	0,15
	22	0,88	0,70	0,88	3,69	4,04	0,17
	23	0,00	0,00	0,00	4,26	2,76	0,71
	24	0,10	0,30	0,00	5,95	3,43	0,30
G3	03	0,00	0,19	0,00	2,35	2,16	0,96
	04	0,00	0,64	0,00	3,07	3,07	0,19
	05	0,00	0,63	0,00	1,91	4,40	0,14
	06	0,00	0,15	0,00	1,63	5,69	0,31
	08	0,10	0,10	0,10	4,03	2,70	0,20
	09	0,00	0,18	0,18	6,05	4,50	0,18

Tabela 14. Valores plasmáticos de proteínas totais (g/dL) e fibrinogênio (mg/dL) observados no pré-jejum dos ovinos do grupo controle (G1), do grupo com implante de membrana de colágeno (G2) e grupo com implante de membrana associada às células-tronco (G3).

Grupos	Nº do animal	Proteínas totais	Fibrinogênio
		(g/dL)	(mg/dL)
		Pré-jejum	Pré-jejum
G1	Branco	6,2	200,0
	02	6,1	100,0
	10	6,6	100,0
	11	6,5	100,0
	12	7,4	300,0
	13	6,1	100,0
	19	6,6	400,0
G2	15	5,8	100,0
	18	6,4	100,0
	20	7,8	600,0
	21	6,1	100,0
	22	6,2	100,0
	23	6,2	100,0
	24	6,8	100,0
G3	03	7,2	100,0
	04	7,8	100,0
	05	6,0	100,0
	06	6,9	100,0
	08	6,8	200,0
	09	6,6	200,0