

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

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

EMANUEL VITOR PEREIRA APOLONIO

Botucatu, São Paulo

2021

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

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

EMANUEL VITOR PEREIRA APOLONIO

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

**Orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Liz Garcia Alves

Botucatu, São Paulo

2021

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

Apolonio, Emanuel Vitor Pereira.

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

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

Orientador: Ana Liz Garcia Alves

Capes: 50501003

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

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

**Autor:** Emanuel Vitor Pereira Apolonio

**Data:** 10 de dezembro de 2021

### **Comissão Examinadora**

Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Liz Garcia Alves

Presidente da mesa e orientadora

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal

FMVZ, UNESP – Botucatu, SP

Prof. Dr. Carlos Eduardo Fonseca Alves

Membro

Professor Assistente Universidade Paulista – UNIP

UNIP – Bauru, SP

Prof. Dr. Armando de Mattos Carvalho

Membro

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária

Escola de Veterinária UFMG – Belo Horizonte, MG

## **AGRADECIMENTOS**

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

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

## SUMÁRIO

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

## RELAÇÃO DE TABELAS – CAPÍTULO 2

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

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

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

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

## LISTA DE FIGURAS – CAPÍTULO 1

**FIGURA 1.** Estrutura hierárquica tendínea .....17

## LISTA DE FIGURAS – CAPÍTULO 2

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

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

**FIGURA 3.** Confeção do modo de cultivo tridimensional (A) Aspecto macroscópico do hidrogel de MEC tendínea equina (HgMECTdEq). (B) Pellet de HgMECTdEq após 7 dias de cultivo (C) Interação 3D CTM (setas) e HgMECTdEq, objetiva de 10x .....47

**FIGURA 4.** Morfologia das diferentes origens celulares em cultivo 2D. CTMad (A,E), CTMmo (B,F), CTMtd ISO (C,G) e CTMtd EXPL (D,H). Objetiva de 5x (A,B,C,D) e Objetiva de 10x (E,F,G,H). Barras de 100  $\mu$ m .....50

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

**FIGURA 6.** Avaliação da diferenciação osteogênica e adipogênica. CTMad (A,B,C), CTMmo (D,E,F), CTMtd ISO (G,H,I) e CTMtd EXPL (J,K,L). Controle (A,D,G,J) objetiva de 5x, osteogênico coloração de Alizarin Red (B,E,H,K) objetiva de 5x e adipogênico coloração Oil Red O (C,F,I,L) objetiva de 10x e 20x .....52

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

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

**FIGURA 9.** Ilustração dos valores médios de TDPC em horas das CTMad, CTMmo, CTMtd ISO e CTMtd EXPL .....57

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

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

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

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

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

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

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

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

## ABREVIATURAS

- MEC:** Matriz extracelular
- TFDS:** Tendão flexor digital superficial
- CTM:** Células-tronco mesenquimais
- CTMad:** Células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo
- CTMmo:** Células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea
- CTMtd:** Células-tronco mesenquimais derivadas do tendão
- CTMtd ISO:** Células-tronco do tendão obtidas por isolamento
- CTMtd EXPL:** Células-tronco do tendão obtidas por explante
- CTMms:** Células-tronco mesenquimais derivadas do membrana sinovial
- HgMECTdEq:** Hidrogel de matriz extracelular de tendão equino
- 3D:** Tridimensional
- 2D:** Bidimensional
- BMP-12:** Proteína Óssea Morfogenética-12
- AA:** Ácido ascórbico
- ITS:** Insulina, transferrina humana e ácido selenoso
- TGF- $\beta$ :** Fator de crescimento transformação beta
- FGF-2:** Fator de crescimento fibroblástico 2
- IGF-1:** Fator de crescimento derivado de insulina
- GDF-7:** Fator de crescimento e diferenciação 7
- MHC-II:** Complexo principal de histocompatibilidade 2
- qRT-PCR:** Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
- SCX:** Scleraxis
- MHK:** Mohawk
- DCN:** Decorin
- BGN:** Biglicana
- TN C:** Tenascina C
- COL1A1:** Colágeno do tipo I
- COL1A3:** Colágeno do tipo III
- RUNX2:** Fator de transcrição relacionado ao runt 2
- TDPC:** Tempo de Duplicação da População Celular
- DMEM:** Meio Eagle Dulbecco Modificado
- SFB:** Soro Fetal Bovino

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

## **RESUMO**

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

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

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

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

## **ABSTRACT**

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

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

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

# Capítulo 1

## 1.1 Introdução

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## **1.2 Objetivo**

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

### **1.2.1 Objetivos específicos**

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

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

### 1.3 Hipótese

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

## 1.4 Revisão Bibliográfica

### 1.4.1 Lesões tendíneas

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

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

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

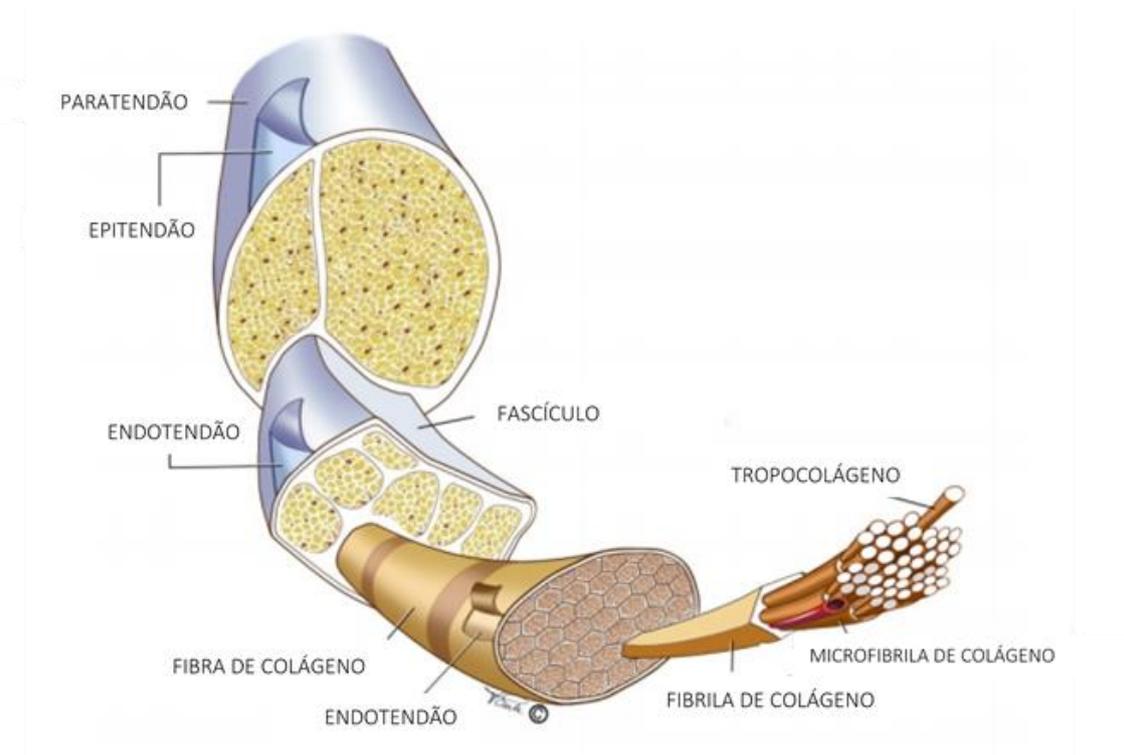
As lesões tendíneas acontecem de forma intrínseca, por sobrecargas durante o exercício, ou extrínseca, quando associadas a traumas externos. Acredita-se que microlesões repetitivas decorrentes da atividade física predisponham a degeneração da matriz tendínea e precedam o momento da lesão (RIBITSCH; OREFF;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

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

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

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

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



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

#### 1.4.2 Células-tronco mesenquimais no tratamento da tendinite

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

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

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

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

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

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

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

### 1.4.3 Cultivo tridimensional e hidrogel

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

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

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

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

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

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

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

#### 1.4.4 Células-tronco mesenquimais derivadas do tendão

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

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

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

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

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

#### 1.4.5 Diferenciação tenogênica

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

O RUNX2 é um fator de transcrição gênica essencial para diferenciação

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

### 1.5 Referências

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

GUERCIO, A.; DI MARCO, P.; CASELLA, S.; RUSSOTTO, L.; PUGLISI, F.; MAJOLINO, C.; GIUDICE, E.; DI BELLA, S.; PURPARI, G.; CANNELLA, V.; PICCIONE, G. Mesenchymal stem cells derived from subcutaneous fat and platelet-rich plasma used in athletic horses with lameness of the superficial digital flexor tendon. **Journal of Equine Veterinary Science**, [s. l.], v. 35, n. 1, p. 19–26, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2014.10.006>>

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

TAN, Q.; LUI, P. P. Y.; RUI, Y. F.; WONG, Y. M. Comparison of potentials of stem cells isolated from tendon and bone marrow for musculoskeletal tissue engineering. **Tissue Engineering - Part A**, [s. l.], v. 18, n. 7–8, p. 840–851, 2012.

THORPE, C. T.; CLEGG, P. D.; BIRCH, H. L. A review of tendon injury: Why is the equine superficial digital flexor tendon most at risk? **Equine Veterinary Journal**, [s. l.], v. 42, n. 2, p. 174–180, 2010.

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

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

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

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

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

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

## Capítulo 2

Este trabalho, será submetido ao periódico *Differentiation* (fator de impacto 2020 - JCR 3.88), indexado pela editora Elsevier.

### 2.1 Artigo Científico

#### **Capacidade de diferenciação tenogênica de células-tronco mesenquimais de diferentes fontes teciduais**

#### **Comparison of tenogenic differentiation of mesenchymal stem cells from different sources**

Emanuel Vitor Pereira Apolonio<sup>a</sup>, João Pedro Hübbe Pfeifer<sup>a</sup>, Gustavo dos Santos Rosa<sup>a</sup>, Fernanda de Castro Stievani<sup>a</sup>, Mariana Correa Rossi<sup>a</sup>, Vittoria Guerra Altheman<sup>a</sup>, Carlos Eduardo Fonseca-Alves<sup>a</sup>, Willian Fernando Zambuzzi<sup>b</sup>, Ana Liz Garcia Alves<sup>a</sup>.

<sup>a</sup>Laboratório de Medicina Regenerativa, Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil.

<sup>b</sup>Laboratório de Bioensaios e Dinâmica Celular, Departamento de Ciências Químicas e Biológicas, Instituto de Biologia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil.

#### **Resumo**

As lesões tendíneas são causas importantes de claudicação e afastamento do esporte em equinos e no homem. A incidência de lesões é variada de acordo com a modalidade e intensidade atlética, compreendendo cerca de 30% das lesões musculoesqueléticas de ambas as espécies. Os tratamentos convencionais são pouco eficazes em reparar com qualidade a matriz extracelular (MEC), o que contribui para o elevado índice de recidivas. As células-tronco mesenquimais (CTM) ganharam destaque no tratamento das tendinopatias e demonstram resultados favoráveis nas características

histológicas e mecânicas teciduais, bem como redução do tempo de reparação tendínea. Estas características terapêuticas das CTM são atribuídas à sua habilidade de imunomodulação, característica anti-inflamatória, promotora da reorganização tecidual e capacidade de diferenciação em linhagens mesodermiais. Já é conhecida a possibilidade de diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica *in vitro* das CTM, no entanto a diferenciação tenogênica ainda não possui uma metodologia padronizada e eficaz. A modalidade de cultivo tridimensional (3D) de CTM em materiais sintéticos ou biológicos é capaz de estimular a diferenciação celular de acordo com a composição do arcabouço, além de oferecer proteção e potencializar o desempenho terapêutico.

**Objetivo:** Determinar a melhor fonte de CTM equinas dentre tecido adiposo (CTMad), medula óssea (CTMmo) e tendão obtidos por isolamento (CTMtd ISO) ou explante tendíneo (CTMtd EXPL), para a proliferação *in vitro* e diferenciação tenogênica em duas diferentes condições: Cultivo 3D em hidrogel de MEC tendínea equina (HgMECTdEq); e cultivo 2D em membrana revestida por colágeno tipos I e III. Objetivamos também avaliar a eficácia de uma nova formulação de meio indutor da diferenciação tenogênica.

**Métodos:** As quatro diferentes fontes de CTM foram obtidas de um mesmo equino com 10 meses de idade. As amostras foram processadas e as CTM, isoladas e cultivadas. As células foram caracterizadas através de sua morfologia fibroblástóide, aderência ao plástico, expansão clonal, expressão de receptores de superfície CD13<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD106<sup>-</sup>, MHC-II<sup>-</sup> e diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica. A capacidade de proliferação *in vitro* de cada origem foi avaliada pelos testes de Taxa de Proliferação Celular (TPC) e Tempo de Duplicação da População Celular (TDPC), cultivadas por 72 horas em três diferentes concentrações iniciais ( $1 \times 10^4$ ,  $3 \times 10^4$  e  $1 \times 10^5$ ). Foi avaliada a habilidade de diferenciação tenogênica de cada origem celular através da produção de colágeno pela coloração de Picrosirius Red quando cultivadas em membrana *Transwell*<sup>®</sup> revestida com COL1:COL3 e meio de diferenciação tenogênica (50 ng/ml de Proteína Óssea Morfogenética-12 (BMP-12), 50 µg/ml de Ácido Ascórbico e 5 µg/ml de ITS). O HgMECTdEq foi produzido de acordo com protocolo desenvolvido pelo Laboratório de Terapias Regenerativas da FMVZ Unesp, Botucatu-SP. Posteriormente  $2 \times 10^5$  CTM de

cada origem foram adicionadas em cultivo 3D imersas em 0,5 mL de hidrogel e cultivadas por 7 dias em meio de cultivo padrão e de diferenciação tenogênica. Foi determinada a concentração de metaloproteinases de matriz 2 e 9 (MMP-2 e MMP-9) pelo ensaio de zimografia e em análise quantitativa por PCR a expressão gênica dos marcadores de tenogênese Scleraxis, Mohawk, Biglicana, Decorin, Tenascina C, Colágeno I e Colágeno III, além do fator osteogênico RunX2 do cultivo 3D em HgMECTdEq e em cultivo 2D em membrana COL1:COL3, com meio de cultivo padrão e de diferenciação tenogênica.

**Resultados:** Todas as células apresentaram características similares quanto à morfologia fibroblastoide, aderência ao plástico e expansão clonal. Houve baixa expressão dos receptores de superfície CD105 para CTMtd ISO e CD44 para as CTMad e positiva expressão de MHC-II para as CTMtd EXPL. Superior habilidade de proliferação *in vitro* foi identificada para a CTMad e inferior capacidade de diferenciação adipogênica e condrigênica foi observada para as CTMtd EXPL. A nova metodologia de diferenciação tenogênica demonstrou eficácia nas quatro origens de CTM, com inferior produção de colágeno para as CTMmo. O meio de diferenciação tenogênico foi capaz de aumentar a concentração de MMP-2 e MMP-9 e também aumentar a expressão dos marcadores tenogênicos Sclerax, Mohawk, Biglicana, Decorin, COL1, COL3, Tenascina C e o fator esteogênico Runx2.

**Conclusão:** De acordo com nossos resultados, determinados que a melhor fonte em capacidade de proliferação e diferenciação tenogênica *in vitro* são as CTMad. As CTMtd ISO apresentaram evidente capacidade de tenogênese *in vitro*, sendo uma fonte de CTM promissora. A nova metodologia de diferenciação tenogênica proposta pelo estudo foi eficaz em induzir a tenogênese de todas as fontes de CTM avaliadas.

**Palavras-chave:** Biomaterial; Engenharia tecidual; Terapia regenerativa; Tenogênese

## Introdução

Os tendões são estruturas essenciais para locomoção e responsáveis pela transferência de força dos músculos para os ossos. São compostos por células especializadas, conhecidas como tenócitos dispostos paralelamente e envolvidos em uma matriz extracelular (MEC) composta de colágeno, elastina, proteoglicanos e minerais.<sup>1</sup>

As enfermidades tendíneas são responsáveis por elevada morbidade, redução de desempenho e aposentadoria do esporte no homem<sup>2</sup> e nos equinos<sup>3</sup>, atletas e não atletas<sup>2,3</sup>. O tendão flexor digital superficial (TFDS) dos equinos e tendão de Aquiles no homem possuem a maior capacidade de armazenamento de energia. Por esta propriedade e similaridade, estes tendões são os mais frequentemente envolvidos em lesões.<sup>1-3</sup>

Atualmente, os tratamentos conservativos e a utilização de fármacos anti-inflamatórios não esteroidais são eficazes em reduzir a dor. No entanto, não recuperam a homeostase e organização tecidual necessária, gerando em alguns casos a necessidade de tratamentos cirúrgicos, longos períodos de reabilitação, recidivas das lesões e dor.<sup>2</sup>

A partir da primeira descrição do emprego terapêutico das células-tronco mesenquimais (CTM) no tratamento da tendinite em equinos no ano de 2003<sup>4</sup>, o tratamento com CTM se tornou uma importante opção com capacidade de melhorar a taxa de sucesso e reduzir recidivas.<sup>4,5</sup> As CTM rapidamente receberam interesse clínico devido à sua habilidade de diferenciação em outras linhagens celulares, a promoção de um microambiente propício ao restabelecimento da homeostase através da secreção de moléculas bioativas, ao perfil anti-inflamatório e por poucos efeitos adversos para o paciente.<sup>6-8</sup>

As CTM possuem capacidades terapêuticas e imunomoduladoras distintas de acordo com sua origem.<sup>8</sup> Além disso, a conhecida tecido-especificidade da fonte celular com o local da lesão é importante para determinar seu potencial regenerativo.<sup>9,10</sup> Desta forma, determinar qual melhor fonte de CTM de acordo com sua capacidade de diferenciação tenogênica é um importante aliado no estabelecimento da melhor estratégia a ser utilizada no tratamento das lesões tendíneas<sup>11</sup>.

As CTM derivadas do tendão (CTMtd) foram primeiramente identificadas e caracterizadas em humanos e ratos<sup>12</sup>. Foi demonstrada a habilidade destas células em se diferenciarem em linhagem osteogênica, condrogênica e adipogênica, expressão positiva para os receptores de superfície CD90, CD44, CD146 e negativas para CD34, CD17, e CD45, além de aderência ao plástico e expansão clonal.<sup>11,12</sup> A conhecida existência de populações heterogêneas de CTMtd de acordo com a região do tendão, permitiu identificar que as células com melhores características para o emprego terapêutico estão situadas no endotendão.<sup>13,14</sup> Em recente estudo, foi estabelecido que as CTMtd são a melhor fonte CTM para o tratamento de lesões tendíneas após identificar que as CTMtd de ratos possuem aptidão de diferenciação espontânea em tenócitos, produção de colágeno e aumentam a expressão de fatores tenogênicos, além da capacidade de se agruparem tridimensionalmente (3D) a partir do cultivo bidimensional (2D).<sup>10</sup> Entretanto, a morbidade associada ao local de coleta, a pouca quantidade de células obtidas durante o isolamento e a população heterogênea de CTMtd em cultivo, são fatores limitantes e que em determinados casos a utilização de fontes mais usuais como tecido adiposo (CTMad) e medula óssea (CTMmo) se tornam mais interessantes.<sup>13,15</sup>

Em estudos pré-clínicos, já foram utilizados tratamentos com CTMad<sup>5</sup>, CTMmo<sup>3</sup> e CTMtd<sup>16</sup> em tendinites equinas induzidas por cirurgia ou ação enzimática da colagenase e em estudos clínicos com tendinites de ocorrência natural<sup>17</sup>, demonstrando resultados satisfatórios em melhorar o aspecto histológico e biomecânico do tecido cicatricial tendíneo.<sup>3,5,16,17</sup> Apesar de pioneira e amplamente estudada, o tratamento das tendinites com CTMmo tem sido desencorajado devido à conhecida possibilidade de formação metaplásica de tecido ósseo após a aplicação.<sup>18</sup> A utilização de CTM pré-diferenciadas é uma alternativa para orientar a capacidade terapêutica e de diferenciação destas células.<sup>19</sup>

Ao contrário dos já padronizados métodos de diferenciação osteogênico, condrogênico e adipogênico, a diferenciação tenogênica de CTM *in vitro* ainda não foi estabelecida pela comunidade científica.<sup>20</sup> Uma ampla gama de substâncias já foi testada quanto à capacidade de induzir a diferenciação tenogênica das CTM, estando estabelecido que o TGFβ<sup>3</sup><sup>11</sup> e BMP-12<sup>11,14,21,22</sup> são os fatores de crescimento mais eficientes.

Embora a possibilidade de realizar a diferenciação tenogênica em cultivo bidimensional de CTMtd tenha sido descrita,<sup>10</sup> os melhores resultados de tenogênese estão associados ao cultivo 3D de CTM. Os principais arcabouços utilizados são compostos de colágeno I (COL1)<sup>14,21,22</sup>, gel de fibrina<sup>24</sup> e MEC tendínea bovina.<sup>25</sup> Entretanto, estudo recente conduzido por Li et al. (2021) determinou que a melhor maneira de mimetizar tanto a composição bioquímica quanto a característica biofísica do colágeno em tecidos nativos é a composição híbrida (1:1) de COL1 e colágeno III (COL3),<sup>26</sup> diferente de diversos estudos que utilizam isoladamente COL1.<sup>14,21,22</sup>

Com a finalidade de auxiliar na escolha do tratamento da tendinite e contribuir para a diferenciação tenogênica de CTM, este estudo objetiva determinar qual a fonte dentre CTMad, CTMmo e CTMtd que, ao ser cultivada em modelos 3D, em hidrogel de MEC de tendão equino (HgMECTdEq) e em membrana de COL1 e COL3 (1:1), possui as melhores características de proliferação e diferenciação tenogênica, comparando cada grupo isoladamente. De maneira adicional, este estudo se propôs a testar a eficácia de um novo protocolo de diferenciação tenogênico nas condições acima citadas.

## **Metodologia**

Este estudo foi conduzido seguindo os princípios da ética e do bem-estar na experimentação animal e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Brasil (Protocolo 0170/2019).

### **Coleta de material**

As amostras de tecido adiposo, medula óssea e tendões foram coletadas de forma asséptica de um potro com 10 meses de idade, imediatamente após ser submetido à eutanásia por possuir fratura oblíqua longa de tibia.

Os fragmentos tendíneos foram coletados do TFDS de ambos membros torácicos. A colheita da medula óssea foi realizada por punção do osso esterno, entre a 5° e 6° esternébra, utilizando agulha de Jamshidi® e o tecido adiposo foi obtido na região sobre o músculo glúteo superficial, próximo à base da cauda.

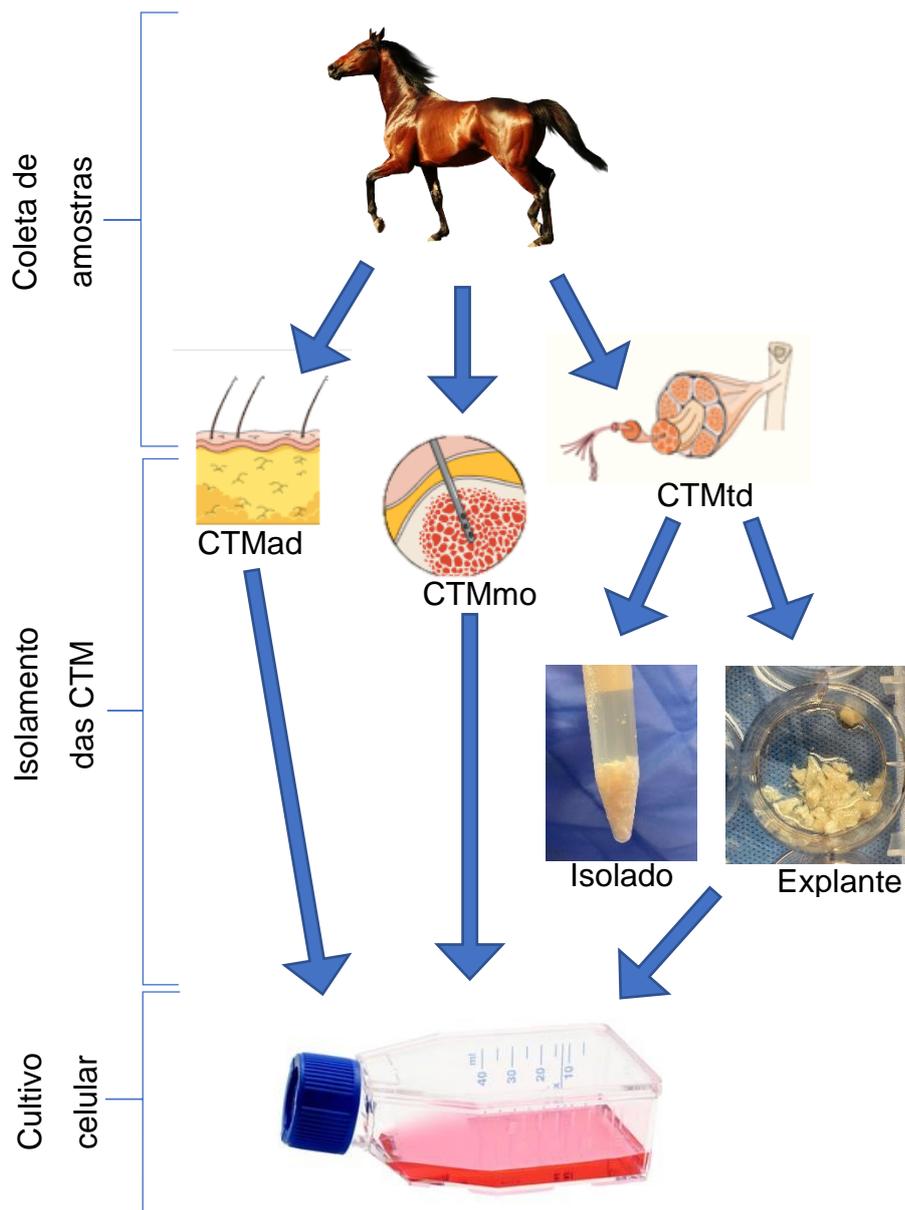
## **Processamento e Isolamento de CTM**

O fluxograma da metodologia experimental está ilustrado pela Figura 1. Foram coletados 7,2 g de tecido adiposo e acondicionados em frascos contendo solução tampão fosfato-salino (PBS; Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo.USA) e submetidas a sucessivas lavagens com meio Meio Eagle Dulbecco Modificado F12 Glutamax<sup>®</sup> (DMEM) (Thermo Fisher, MA – USA). A amostra sofreu fragmentação mecânica com lâmina bisturi e dissociação enzimática com 29.044 mg de colagenase tipo II (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo.USA) diluídos em 14,5 mL de DMEM F12 Glutamax<sup>®</sup> (Thermo Fisher, MA – USA). A solução foi homogeneizada e levada para estufa a 37° C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após 16 horas de incubação a amostra foi centrifugada a 460 x g por 10 minutos e as células decantadas foram coletadas e plaqueadas em garrafas de cultivo celular de 75 cm<sup>2</sup> acrescido de 12 mL de meio de cultivo padrão (DMEM F12 Glutamax (Thermo Fisher, MA – USA) + 10% de Soro Fetal Bovino (SFB - Thermo Fisher, MA – USA) e 1% de Antibiótico e antimicótico (10.000 UI de penicilina, 10 mg de estreptomicina e 25 µg de anfotericina B por mL. Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo.USA)).

As amostras de tendão foram dissecadas, sendo removidos os vasos sanguíneos, nervos e tecido subcutâneo. Em seguida foram fragmentadas em 2 cm<sup>2</sup> e todo o peritendão foi removido, sendo isolado apenas o endotendão (FIGURA 2). Três gramas do endotendão foram encaminhados para o processo de dissociação em 12 mg de colagenase tipo II (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo.USA) diluídos em 6 mL de DMEM F12 Glutamax<sup>®</sup> (Thermo Fisher, MA – USA) a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub> por 16 horas. Após sucessivas lavagens do fragmento digerido, a amostra foi centrifugada a 460 x g, por 10 minutos e o sedimento de células foi coletado e transferido para garrafas de 25 cm<sup>2</sup>. As células obtidas nesse processo de isolamento foram denominadas de CTMtd ISO. O fragmento tendíneo digerido (explante) foi acondicionado em placas de 6 poços, acrescido de 2mL de meio de cultivo padrão. As células derivadas do tendão obtidas por explante foram denominadas de CTMtd EXPL.

O aspirado de medula óssea foi coletado em duas seringas de 20 mL, cada uma contendo 25.000 UI de heparina sódica (Cristália, São Paulo – BR). As amostras foram filtradas primeiramente em microfiltro de transfusão sanguínea

adaptado (Embramed, Jurubatuba, SP – BR) e então centrifugadas a 460 x g por 10 minutos. O plasma sobrenadante e a gordura das amostras foram removidos e o *pellet* foi ressuscitado em meio de cultivo padrão. Após esta etapa, as amostras foram gentilmente depositadas em tubos cônicos contendo gradiente de densidade Ficoll-Paque® (densidade 1.077 g/mL-Amersham Biosciences, UK) na proporção de 1:1. Após nova centrifugação (460 x g durante 40 minutos à temperatura ambiente), a área de interface entre as hemácias e o plasma foi coletada, diluída em meio de cultivo, centrifugada (460 x g / 10 minutos) e o pellet de células remanescentes foi transferido para garrafas de 75 cm<sup>2</sup>.

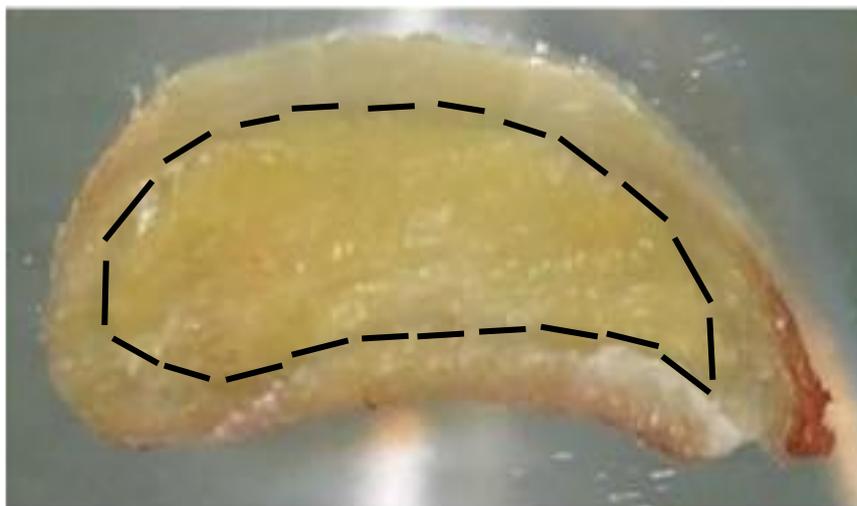


**FIGURA 1.** Fluxograma da metodologia de processamento e obtenção das diferentes origens de CTM.

### Cultivo celular

Após o isolamento, as células foram plaqueadas em garrafas de 25 ou 75 cm<sup>2</sup>, de acordo com o volume celular da amostra acrescidos de meio de cultivo padrão. As células foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Todo o procedimento celular foi realizado em cabine de biossegurança (Trox, São Paulo, São Paulo - Brasil) para manter a esterilidade da amostra. O meio de cultivo foi trocado a cada 48-72h, dependendo do número de células por garrafa e quando alcançaram confluência de 80% foi realizada a tripsinização, com Tripsina EDTA 0,25% (Thermo Fisher, MA – USA) para transferência a garrafas maiores.

Ao final do cultivo das CTM, a viabilidade celular foi avaliada pelo método de exclusão por coloração de Azul de Trypan (GIBCO® Invitrogen Corporation - USA) e contagem em Câmara de Neubauer.



**FIGURA 2.** Imagem de um corte transversal do TFDS, para representar o processo de isolamento do endotendão (área pontilhada).

### **Caracterização e diferenciação celular**

Enquanto em cultivo as células foram avaliadas através de sua morfologia, capacidade de aderência ao fundo da garrafa e expansão clonal, uma fração de CTM de cada origem em terceira passagem (P3) foi encaminhada para caracterização de imunofenotipagem e diferenciação em tri-linhagem (osteogênica, adipogênica e condrogênica).

A avaliação por citometria de fluxo para caracterização imunofenotípica foi realizada no equipamento FACS Calibur (BD, Franklin Lakes, NJ, USA). A expressão dos receptores de superfície *cluster of differentiation* (CD) foi identificada pela relação antígeno-anticorpo. A seleção dos anticorpos foi baseada em estudos prévios sobre o conhecimento das pesquisas em CTM de equinos.<sup>6,16</sup> A citometria de fluxo foi realizada utilizando o anticorpo monoclonal mouse anti-rat CD90-FITC (Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA), CD34-FITC (Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA) mouse anti-human CD105-FITC mAb (AbD Serotec, Kidlington, Oxford, UK) e mouse anti-human CD106-PE STA (BioLegend, San Diego, CA, USA). O anticorpos monoclonais

específicos mouse anti-horse CD44 (AbD Serotec, Kidlington, Oxford, UK), mouse anti-horse CD13 (AbD Serotec, Kidlington, Oxford, UK) e mouse anti-horse Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) classe II (AbD Serotec, Kidlington, Oxford, UK), foram marcados com o anticorpo monoclonal secundário goat anti-mouse IgG-FITC (Molecular Probes, Eugene, OR, USA).

As células em cultivo foram diferenciadas em tecido adiposo através do *Kit StemPro® Adipogenesis Differentiation Kit* (Gibco, Grand Island, NY, USA), para diferenciação condrogênica foi utilizado o *Kit StemPro® Chondrogenesis Differentiation Kit* (Gibco, Grand Island, NY, USA) e para diferenciação tenogênica o *Mesenchymal Stem Cell Osteogenesis Kit* (Gibco, Grand Island, NY, USA). Todas as diferenciações foram realizadas em triplicata para cada origem celular. Uma amostra adicional para cada origem celular foi mantida em meio de cultura basal como controle durante 10 dias (diferenciação adipogênica e osteogênica) e por 21 dias (diferenciação condrogênica).

Para a diferenciação adipogênica (*StemPro® Adipogenesis Differentiation Kit*, Gibco, Grand Island, NY, USA), as células provenientes de P3 foram incubadas a uma densidade de 20.000 cells/cm<sup>2</sup> em uma placa de cultura de 6 poços e cultivadas em meio de cultura adipogênico durante 10 dias. O meio de diferenciação foi trocado a cada três dias. Posteriormente as células foram fixadas com solução de formaldeído a 10% durante 10 minutos, seguido de lavagens com PBS, sendo coradas com Oil Red O (Gibco, Grand Island, NY, USA).

Para realizar a diferenciação osteogênica das CTM (*Mesenchymal Stem Cell Osteogenesis Kit* (Gibco, Grand Island, NY, USA), as células progenitoras da P3 foram incubadas a uma densidade de 20.000 cells/cm<sup>2</sup> em placa de cultura de 6 poços e mantidas em condições osteogênicas durante 10 dias, o meio de diferenciação foi trocado a cada três dias. As células foram fixadas em solução de formaldeído 10% durante 10 minutos, seguido de lavagens com água *Mili-Q* sendo corada com Alizarin Red (Gibco, Grand Island, NY, USA).

A condrogênese foi induzida em biomassa com 5x10<sup>6</sup> células alocadas em um tubo cônico de 15 mL de polipropileno utilizando-se o *Kit StemPro® Chondrogenesis Differentiation Kit* (Gibco, Grand Island, NY, USA). O *pellet* foi

cultivado a 37°C com 5% CO<sup>2</sup> em 2 mL de meio de cultivo de diferenciação condrogênica o meio foi trocado a cada três dias. Após o período de três semanas de incubação, o *pellet* foi fixado em solução de formaldeído 10% durante 48 horas a temperatura ambiente, este foi parafinado e posteriormente cortado em secções de 4 µm, sendo corado com hematoxilina para a avaliação histológica geral (Hematoxilina e Eosina) e com Azul de Toluidina para detectar os proteoglicanos sulfatados e glicosaminoglicanos.

### **Tempo de Duplicação da População Celular e Taxa de proliferação celular**

Para determinar o tempo de ciclo celular das distintas origens de CTM equinas avaliadas, foram plaqueadas amostras em triplicata nas concentrações de 1x10<sup>4</sup>, 3x10<sup>4</sup> e 1x10<sup>5</sup> em placa de cultura celular de 24 poços, totalizando 420.000 células por origem. A taxa de proliferação celular (PDT) de cada amostra foi determinada por contagem de células viáveis em intervalos de 24h, 48h e 72h após o plaqueamento inicial. Em seus respectivos momentos o sobrenadante de cada poço foi aspirado e adicionados 300 µl de tripsina (Gibco, USA), após 5 minutos e confirmação de destacamento das células do fundo da garrafa por microscopia de luz, foram adicionados 600 µl de meio de cultivo DMEM F12 Glutamax (Gibco, USA) suplementado com 10% SFB (Gibco, USA). Uma amostra de 20 µl de cada poço somado a 20 µl azul de tripano (Gibco, USA) foi adicionada em câmaras de Neubauer e estimado número de células. Os resultados de cada cultivo foram aplicados na fórmula:

$$\textit{Tempo de duplicação} = \frac{\textit{Duração} \times \log(2)}{\log(\textit{inicial}) - \log(\textit{final})}$$

Através da análise em software online: Roth V. 2006 Doubling Time Computing, disponível em: <http://www.doubling-time.com/compute.php> foi determinado o PDT de cada origem de CTM.

### **Diferenciação tenogênica**

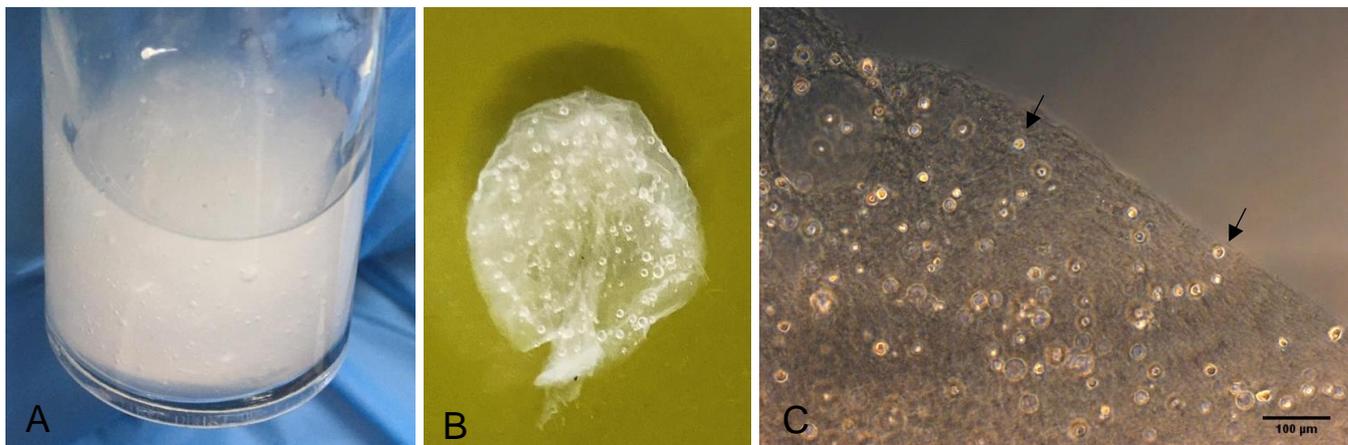
Para diferenciação tenogênica foram inseridas  $2 \times 10^5$  de cada origem celular (CTMad, CTMmo, CTMtd ISO e CTMtd EXPL) no *insert* de placas Corning® *Transwell*® com membrana revestida de colágeno I e III (1:1- Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo.USA). O meio de indução tenogênico foi estabelecido pelo Laboratório de Terapia Celular e Medicina Regenerativa UNESP, Botucatu, composto por meio de cultivo DMEM F12 Glutamax® (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo.USA) suplementado com 10% de SFB (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo.USA), 50 ng/ml de Proteína Óssea Morfogênica-12 (BMP-12, Biovision, CA - USA), 50 µg/ml de Ácido Ascórbico (AA; Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo.USA) e 5 µg/ml de ITS (insulina-transferrina-selênio) suplemento de cultura universal (BD Life Sciences, NJ - USA). Enquanto os grupos tratados receberam o meio indutor tenogênico, os grupos controles receberam meio de cultivo padrão. As células de cada grupo foram cultivadas por 7 dias e a avaliação de diferenciação tenogênica foi realizada por coloração de *Picro Sirius Red*, através da pigmentação de colágeno e expressão gênica de fatores tenogênicos por qPCR.

### **Cultivo 3D em hidrogel de MEC tendínea**

Para avaliação do cultivo tridimensional, foi utilizado o hidrogel obtido a partir da solubilização da MEC tendínea equina (FIGURA 3), desenvolvido pelo Laboratório de Terapia Celular e Medicina Regenerativa da FMVZ, UNESP – Botucatu, SP.

Uma fração de  $2 \times 10^5$  de CTM das quatro diferentes fontes foi imersa em 0,5 mL do HgMECTdEq (FIGURA 3), alocada em placas de 24 poços e encaminhada para estufas a 37° C e 5% CO<sub>2</sub> por 60 minutos até ocorrer a gelificação, sendo posteriormente adicionado 1 mL de meio de cultivo padrão no grupo NORMAL e meio de cultivo tenogênico para o grupo TRATADO. O meio foi coletado e trocado a cada 72 horas por 7 dias. Ao final do cultivo um *pellet* 3D

de hidrogel de cada origem celular foi acondicionado em formol 10% para avaliação histológica e outro lisado em 500  $\mu$ L de Qiazol (Qiagen).



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

### Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR)

Para análise quantitativa da expressão dos genes associados à tenogênese, foram selecionados Scleraxis (SCX), Mohawk (MHK), Tenascina C (TNC), Biglicana (BGN), Decorin (DCN), Colágeno 1 (COL1A1), Colágeno 3 (COL3A1) e, para osteogênese, *runt-related transcription factor 2* (RUNX2), todos avaliados nas amostras pelo ensaio de qPCR. Os primers utilizados foram sintetizados pela Exxtend Biotecnologia (Paulínia, SP, BRA) e estão descritos na TABELA 1. Para o ensaio de RT-PCR foi realizada a extração total de RNA da amostra utilizando Qiazol do *miRNeasy Mini kit* (#217004, Qiagen, Germantown, MD, USA). Para realizar o ensaio de RT-qPCR foi preparada a transcrição reversa cDNA com *High-Capacity cDNA reverse transcription kit* (#4368813 Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

O gene GAPDH foi utilizado como controle interno para normalização das diferenças entre cada amostra, e os dados obtidos foram analisados pelo método  $2^{\Delta\Delta CT}$  <sup>27</sup>. Todos os passos foram realizados utilizando o equipamento de RT-qPCR QuantStudio 3 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Foram analisadas as quatro fontes celulares de interesse, em 4 condições de cultivo. O cultivo 3D em hidrogel de HgMECTdEq em meio tenogênico e meio de cultivo padrão, cultivo 3D em membrana de COL1:COL3 com meio tenogênico e cultivo em 2D com meio padrão.

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

<b>Gene</b>	<b>Primer</b>	<b>Sequência 5'-3'</b>	<b>Condições da reação</b>
<b>DAPDH</b>	Forward	TCAGCCATCGCCAAGATTGT	95°C - 15s; 60°C - 30s; 72°C - 60s.
	Reverse	CCCGACGTCTTCTCAAACA	
<b>BIGLICANA (BGN)</b>	Forward	TGGACCTGCAGAACAATGAGAT	
	Reverse	AGAGATGCTGGAGGCCTTTG	
<b>DECORIN (DCN)</b>	Forward	AAGTTGATGCAGCTAGCCTG	
	Reverse	GGCCAGAGAGCCATTGTCA	
<b>COLÁGENO I (COL1A1)</b>	Forward	GCCAAGAAGAAGGCCAAGAA	
	Reverse	TGAGGCCGTCCTGTATGC	
<b>COLÁGENO III (COL3A1)</b>	Forward	TGCTCCCATCTTGGTCAGTC	
	Reverse	GGAATCTCTGGGTTGGGACA	
<b>SCLERAXIS (SCX)</b>	Forward	GCCCAAACAGATCTGCACCT	
	Reverse	CTAACTCCGAATCGCCGTCT	
<b>MOHAWK (MHK)</b>	Forward	CCCACCAAGACGGAGAAGATACT	
	Reverse	CACCTGCACTAGCGTCATCTG	
<b>TENASCINA - C (TN C)</b>	Forward	GTTGGACTCCTGTACCCATTCC	
	Reverse	GGCCCGAGGTCGTGTCT	
<b>RUNX2</b>	Forward	CAGACCAGCAGCACTCCATA	
	Reverse	GCAGCATTCTGGAAGGAGAC	

### Zimografia

As amostras de meio de cultivo foram coletadas das quatro origens de CTM do estudo, no sétimo e último dia de cultivo celular, em quatro diferentes condições de cultivo celular sendo, cultivo 3D em HgMECTdEq em meio tenogênico e meio de cultivo padrão, cultivo em membrana de COL1:COL3 com meio tenogênico e com meio padrão.

A atividade colagenolítica das metaloproteinases de matriz (MMP) presentes no meio de cultivo foi determinada pela capacidade da digestão da gelatina presente no gel de poliacrilamida. As amostras de meio foram adicionadas em cada poço do gel de poliacrilamida a 8% (Bio-Rad) e contendo 1 mg/mL de gelatina (de pele suína, tipo A, G2500 - Sigma-Aldrich). As proteínas

foram separadas sob voltagem constante de 100 V a 4°C, por 2 horas.

Após a corrida eletroforética, o gel foi lavado duas vezes por 30 minutos em 2,5% de Triton X - 100, e em seguida, lavado duas vezes por 10 minutos em 50 mM de Tris pH 8,4. O gel foi então incubado a 37°C por 18 horas em solução de ativação contendo 50 mM de Tris pH 8,4 e 5 mM de CaCl<sub>2</sub>. Terminada a incubação, o gel foi corado em solução de *Comassie Blue*, por 30 minutos, e em seguida descorado em solução de ácido acético, metanol e água (10: 30: 60) até permitir a visualização das bandas claras. Para análise densitométrica, os géis foram fotografados. A concentração enzimática das MMP-2 e MMP-9 foi determinada pelo programa ImageJ 1.46 (NIH, <http://imagej.nih.gov/ij/>).

### **Análise estatística**

Para análise dos ensaios de expressão gênica os dados passaram por um teste de normalidade (*Shapiro Wilk*). Em seguida foram realizadas múltiplas comparações através da análise de variância (*One-way*) ou *Kruskal-Wallis*.

Na descrição dos valores de P nas legendas das figuras, entende-se que:  $P \leq 0,05^*$ ,  $P \leq 0,01^{**}$ ,  $P \leq 0,001^{***}$  e  $P \leq 0,0001^{****}$ . Os valores absolutos estão descritos no corpo do texto.

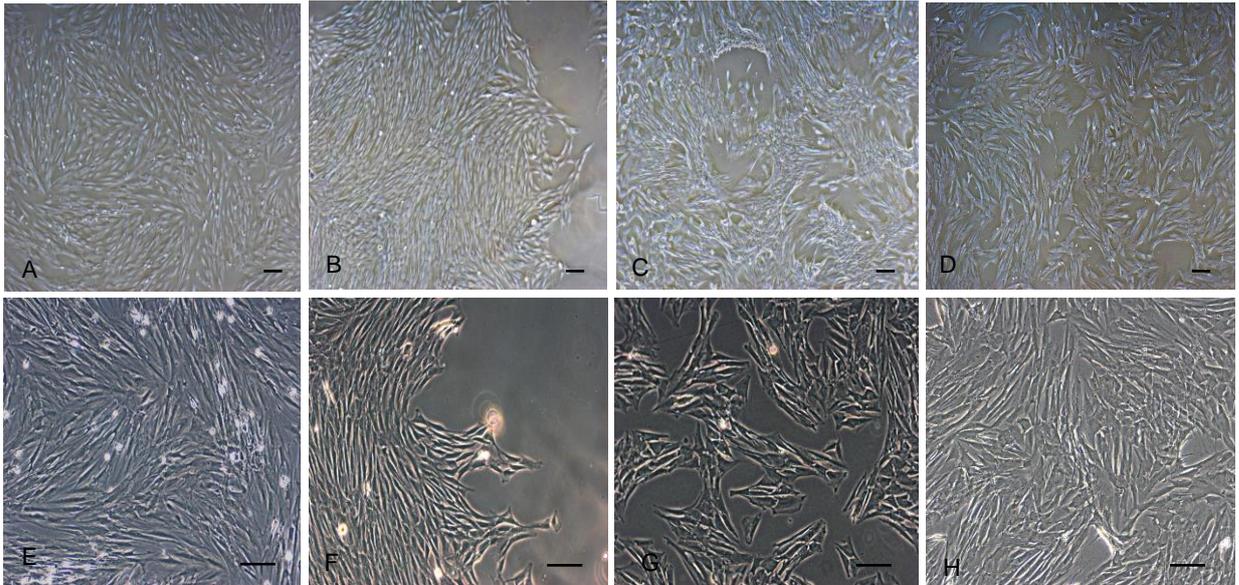
Para as análises de duplas comparações foi aplicado Teste-T ou *Mann-Whitney*. O nível de significância adotado para todas as análises foi de 5%. Os dados apresentados em tabelas e gráficos estão representados como a média  $\pm$  desvio padrão.

## **Resultados**

### **Caracterização de CTM isoladas de diferentes tecidos**

#### **Morfologia**

Todas as fontes celulares utilizadas para o experimento, como CTMad, CTMmo, CTMtd ISO e CTMtd EXPL foram relativamente homogêneas em relação à sua morfologia fibroblastoide quando aderidas ao fundo da garrafa de cultivo celular e apresentaram capacidade de expansão clonal (FIGURA 4).



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

Uma colônia de células aderentes ao plástico e com capacidade de expansão clonal, mas que exibiam morfologia não fibroblastoide foi identificada no cultivo das células CTMtd EXPL (FIGURA 5).



**FIGURA 5.** População celular identificada no cultivo CTMtd EXPL, apresentando morfologia não-fibroblastoide.

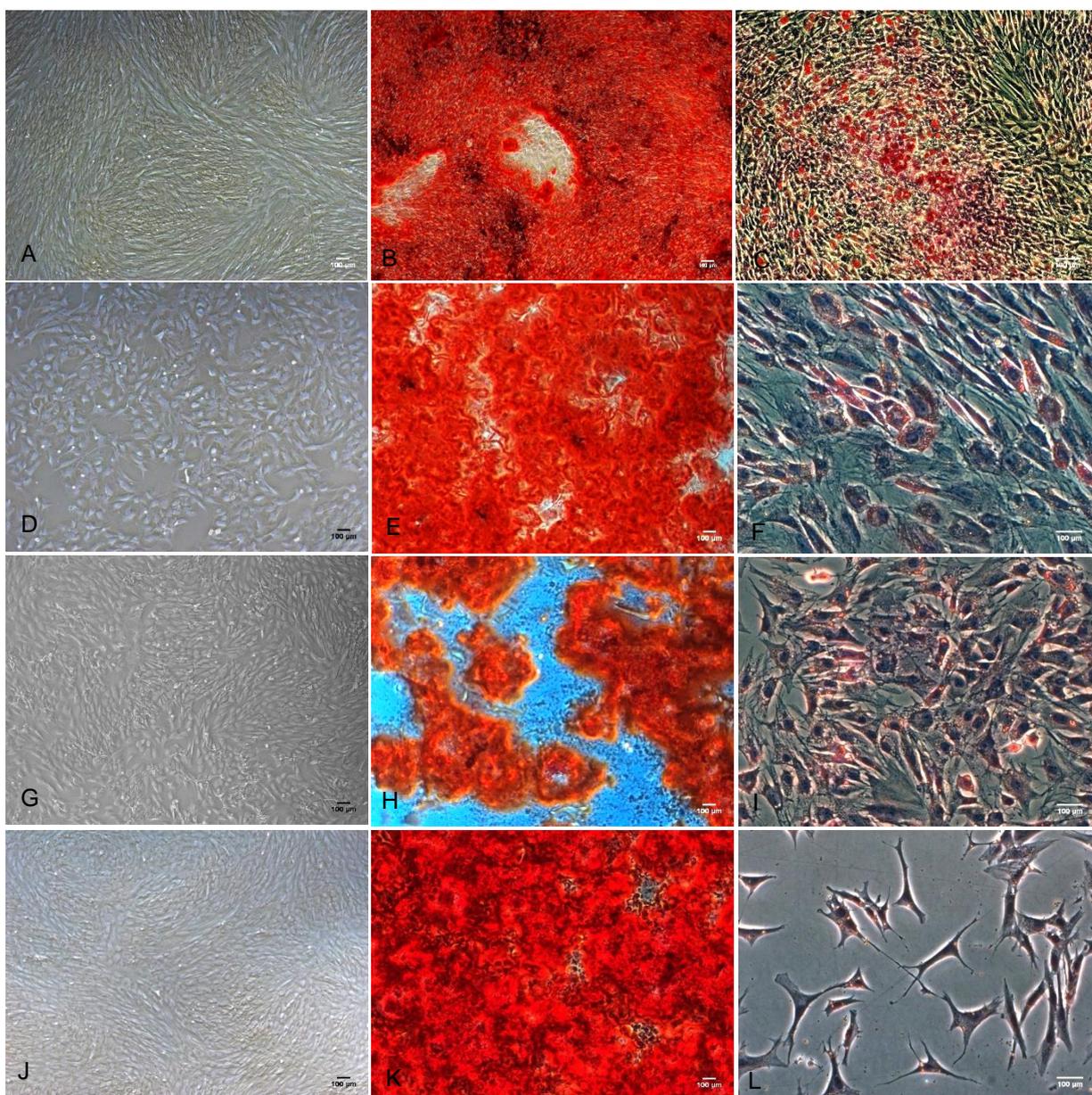
### **Diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica *in vitro***

Dentre as modalidades de caracterização das CTM, avaliar sua capacidade de diferenciação em tecidos mesodermis como osso, gordura e cartilagem é considerado fundamental para determinação da capacidade tronco destas células. As quatro origens celulares utilizadas no estudo foram submetidas às diferenciações osteogênica, adipogênica e condrogênica.

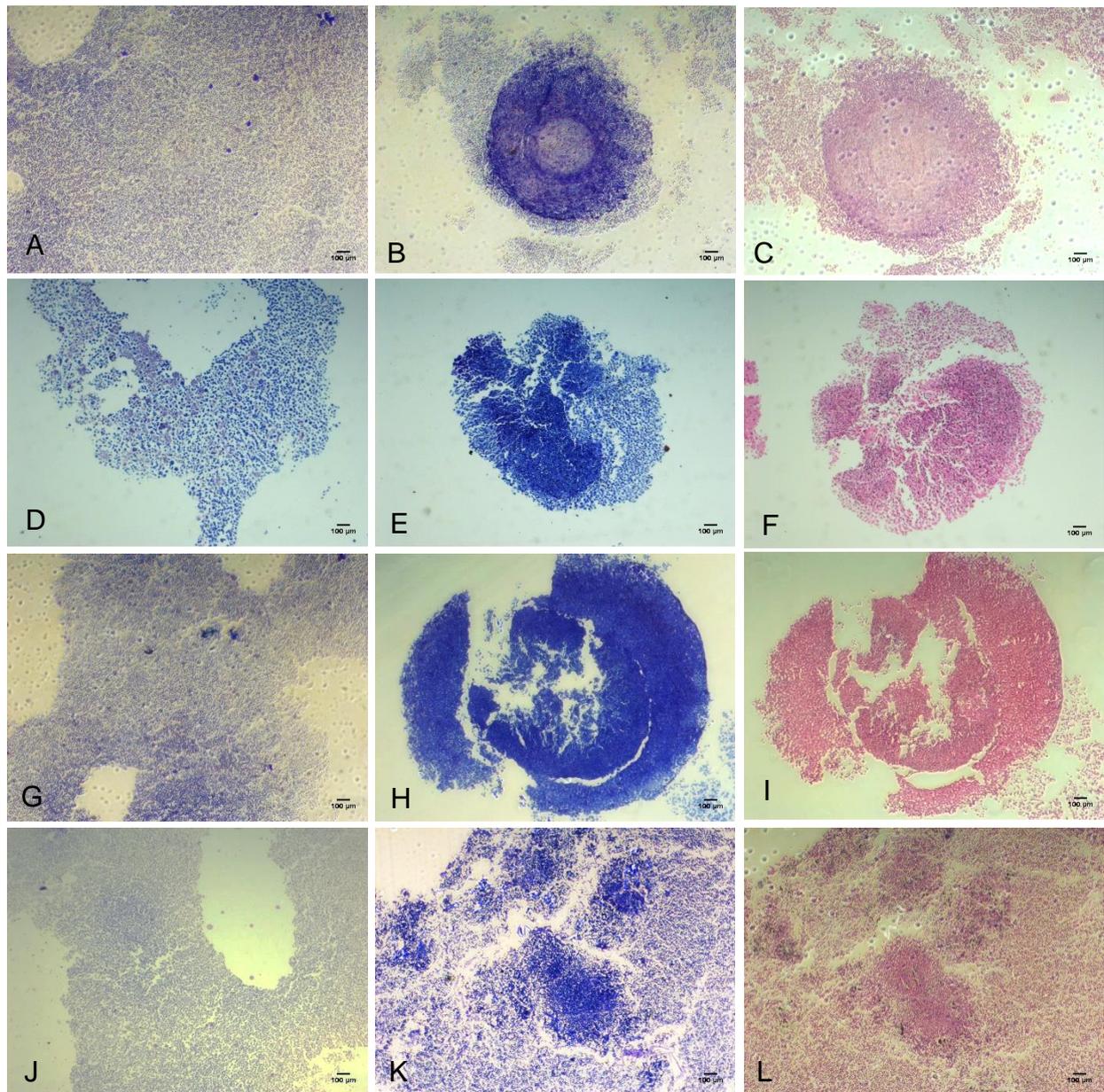
A capacidade de diferenciação osteogênica foi confirmada pela detecção de cristais de cálcio, corados por *Alizarin Red*. A capacidade de diferenciação adipogênica foi determinada pela coloração *Oil Red*, marcando de vermelho as gotículas lipídicas e triglicerídeos do citoplasma celular no décimo dia de cultivo (FIGURA 6). As quatro origens de CTM apresentaram similar habilidade de diferenciação osteogênica, enquanto a diferenciação adipogênica foi mais evidente nas CTMad em relação às demais.

A diferenciação condrogênica foi determinada pela coloração de Azul de Toluidina evidenciando marcação de proteoglicanos e glicosaminoglicanos presentes na cartilagem hialina e Hematoxilina e Eosina (H&E) após 21 dias de cultivo em *pellet* celular sedimentado em tubo cônico de 15 mL (FIGURA 7).

Todas origens celulares avaliadas foram capazes de diferenciarem em trilhaagem, com inferior capacidade de adipogênese e condrogênese das CTMtd EXPL.



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



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

### Imunofenotipagem

As diferentes origens de CTM equina em P3 foram submetidas a citometria de fluxo após a marcação com receptores de superfície específicos. Os resultados estão dispostos na TABELA 2. Todas as células foram negativas para o marcador hematopoiético CD34 e negativas para o marcador leucocitário

CD45. O marcador mielóide CD13 e o Complexo Principal de Histocompatibilidade tipo II (MHC-II) foram positivamente expresso na população celular de CTMtd EXPL com 60.63% e 74,58% respectivamente, enquanto foi pouco expresso nas demais origens celulares. O marcador de adesão celular CD90 foi fortemente expresso (> 95%) em todas as origens celulares avaliadas. O marcador de angiogênese CD105 obteve uma expressão variada em cada origem, com 87.18% para CTMad, 68.40% para CTMmo, 22.57% para TdCTM ISO e 82.90% para CTMtd EXPL. O CD44 é um receptor de adesão multifuncional identificado como um marcador de CTM. Apresentou baixa expressão (5,16%) na CTMad e alta expressão (> 75%) na demais origens celulares. O marcador endotelial CD106 foi positivo para origem CTMtd ISO e negativa para as demais origens celulares.

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

	CD 105	CD 90	CD 44	CD 45	CD 34	CD 106	CD 13	MHC-II
CTMad	87.18	97	5.16	1.07	1.11	1.76	2.20	2.75
CTMmo	68.40	98.97	79.36	5.96	4.93	7.74	6.60	8.82
CTMtd ISO	22.57	99.85	78.06	16.44	3.72	58.11	0.66	8.17
CTMtd EXPL	82.90	99.98	93.18	0.96	4.24	1.23	60.63	74.58

### Taxa de proliferação celular

Os valores da média e desvio padrão da taxa de proliferação celular estão discriminados na TABELA 3, com destaque para o número de células de CTMad (234.000 ± 7,3) ao final do cultivo ser superior ao CTMmo (155.000 ± 8,6), CTMtd ISO (141.000 ± 9,8), CTMtd EXPL (186.000 ± 9,5). É possível observar na FIGURA 8A, que a curva de crescimento é semelhante entre todas as origens de CTM. no entanto o número de CTMad ao final do cultivo se destaca pela superioridade aos demais. Não houve diferença estatística significativa ao final do cultivo de  $1 \times 10^4$  entre as diferentes fontes de CTM (Figura 8B). Com a concentração de  $3 \times 10^4$  (Figura 8C), foi possível identificar superior TPC das CTMad sobre CTMmo, CTMtd ISO (P = <0,0001\*\*\*\*) e

CTMtd EXPL ( $P = 0,0034^{**}$ ). As CTMtd EXPL apresentaram TPC significativamente superior as CTMmo e CTMtd ISO ( $P = 0,0295^*$  e  $0,0061^{**}$ , respectivamente). Esse perfil se repetiu na concentração de  $1 \times 10^5$  (Figura 8D) com superior taxa de proliferação das CTMad sobre CTMmo, CTMtd ISO ( $P = <0,0001^{****}$ ) e CTMtd EXPL ( $P = 0,0007^{***}$ ). As CTMtd EXPL também apresentaram TPC significativamente superior as CTMmo e CTMtd ISO ( $P = 0,0114^*$  e  $0,0011^{**}$ , respectivamente)

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

CTMad	$1.10^5$	$3 \times 10^4$	$1 \times 10^4$	CTMmo	$1.10^5$	$3 \times 10^4$	$1 \times 10^4$
<b>24 horas</b>	95 ± 5,2	26 ± 3,3	7 ± 2,4	<b>24 horas</b>	105 ± 6,3	21 ± 3,3	7.5 ± 2,5
<b>48 horas</b>	153.5 ± 2	39 ± 3,7	15 ± 3,5	<b>48 horas</b>	117 ± 7,2	30 ± 3,9	11 ± 4,3
<b>72 horas</b>	234 ± 7,3	84 ± 4,5	33 ± 3	<b>72 horas</b>	155 ± 8,6	47 ± 4,6	25 ± 4,6

CTMtd ISO	$1.10^5$	$3 \times 10^4$	$1 \times 10^4$	CTMtd EXPL	$1.10^5$	$3 \times 10^4$	$1 \times 10^4$
<b>24 horas</b>	75 ± 5,6	16 ± 4,2	6.5 ± 5,7	<b>24 horas</b>	90 ± 8,7	19 ± 5,3	5.6 ± 4,5
<b>48 horas</b>	105 ± 8,4	26 ± 3,8	9 ± 3,5	<b>48 horas</b>	112 ± 12	27 ± 6,5	11.5 ± 5,1
<b>72 horas</b>	141 ± 9,8	42 ± 5,8	19.5 ± 6	<b>72 horas</b>	186 ± 9,5	62 ± 5,5	26 ± 6,5

Valores da tabela representados  $\times 10^3$

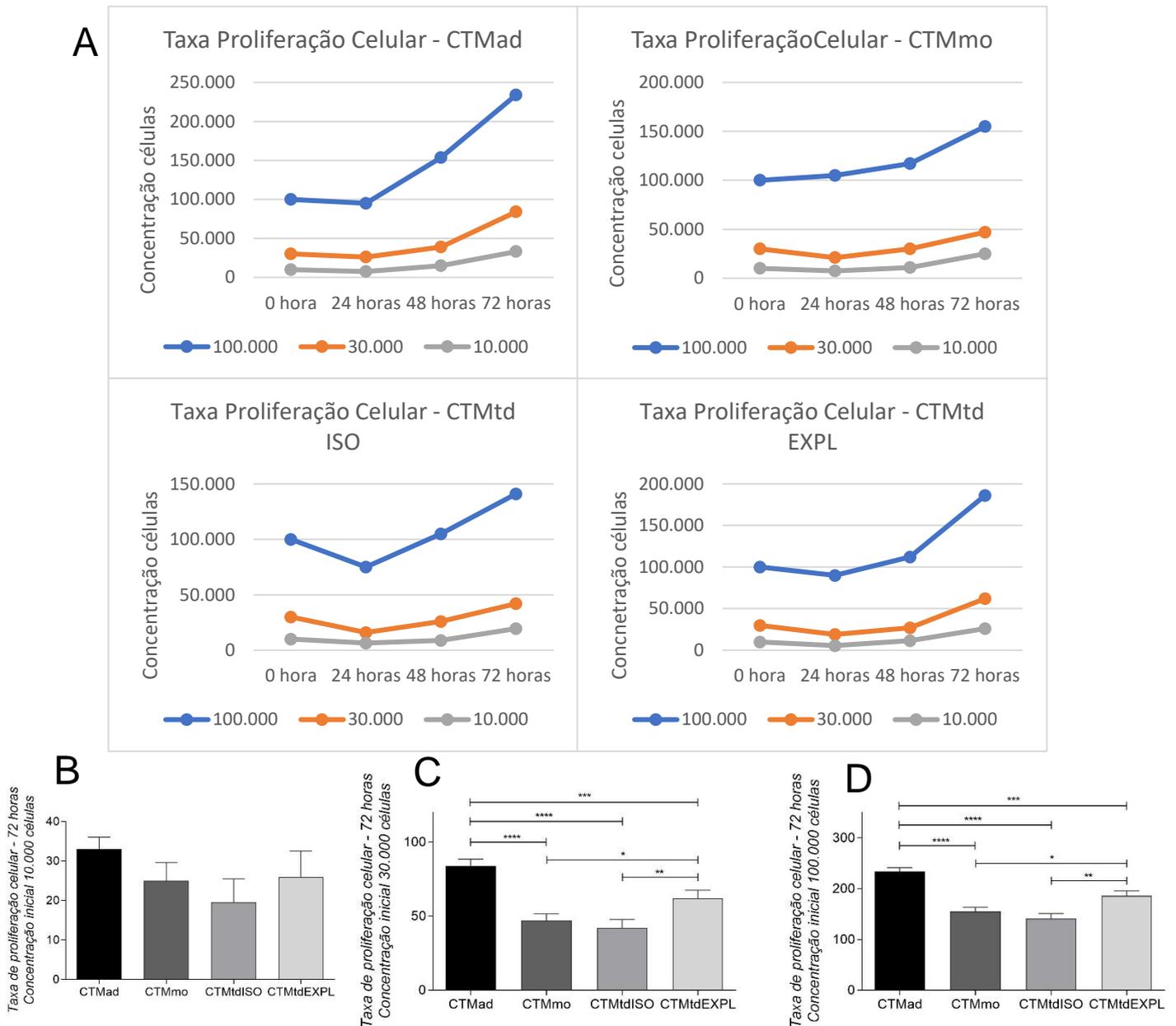
### Tempo de Duplicação da População Celular (TDPC)

Os valores do PDT de cada origem e concentração celular estão dispostos na TABELA 4 e ilustrados na FIGURA 9. Representam o tempo necessário para a população de células dobrar de tamanho, destacando os menores valores para CTMad em relação aos tempos de CTMmo, CTMtd ISO e CTMtd EXPL.

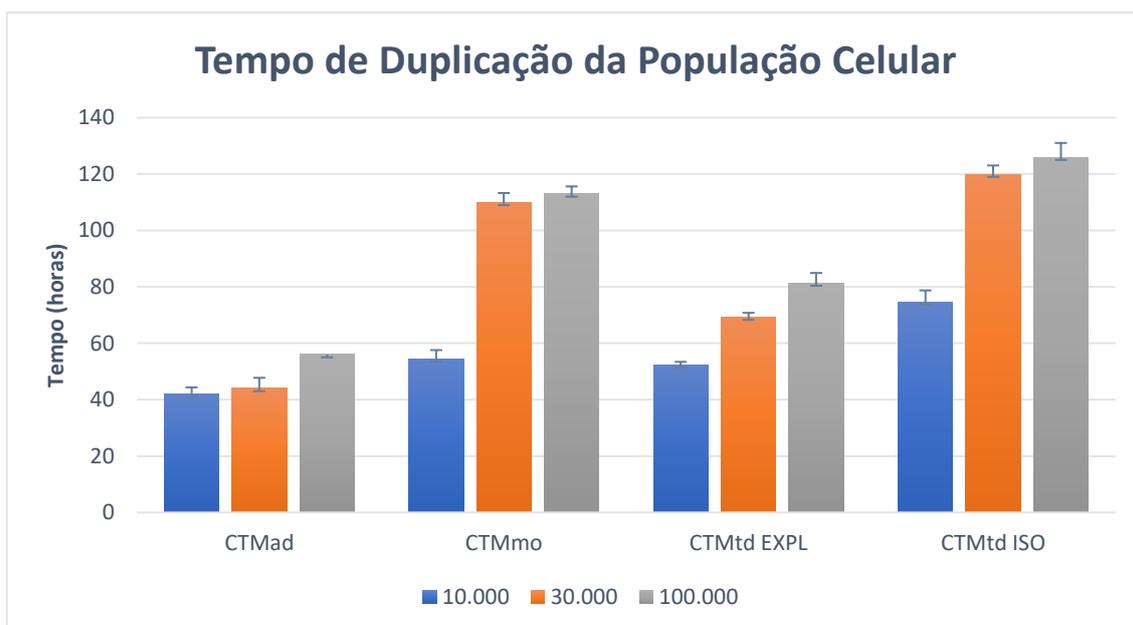
**TABELA 4.** Valores em horas de PDT das CTMad, CTMmo, CTMtd ISO e CTMtd EXPL (dados apresentados em média +- desvio padrão)

PDT	CTMad	CTMmo	CTMtd EXPL	CTMtd ISO
<b><math>1 \times 10^4</math></b>	42 ± 2,3	54,47 ± 3,1	52,4 ± 1,0	74,73 ± 4,0

$3 \times 10^4$	$44 \pm 3,7$	$110 \pm 3,2$	$69,3 \pm 1,5$	$120 \pm 3,0$
$1.10^5$	$56 \pm 2,3$	$113 \pm 2,6$	$81,4 \pm 3,5$	$126 \pm 5,0$



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



**FIGURA 9.** Ilustração dos valores médios de PDT em horas das CTMad, CTMmo, CTMtd ISO e CTMtd EXPL.

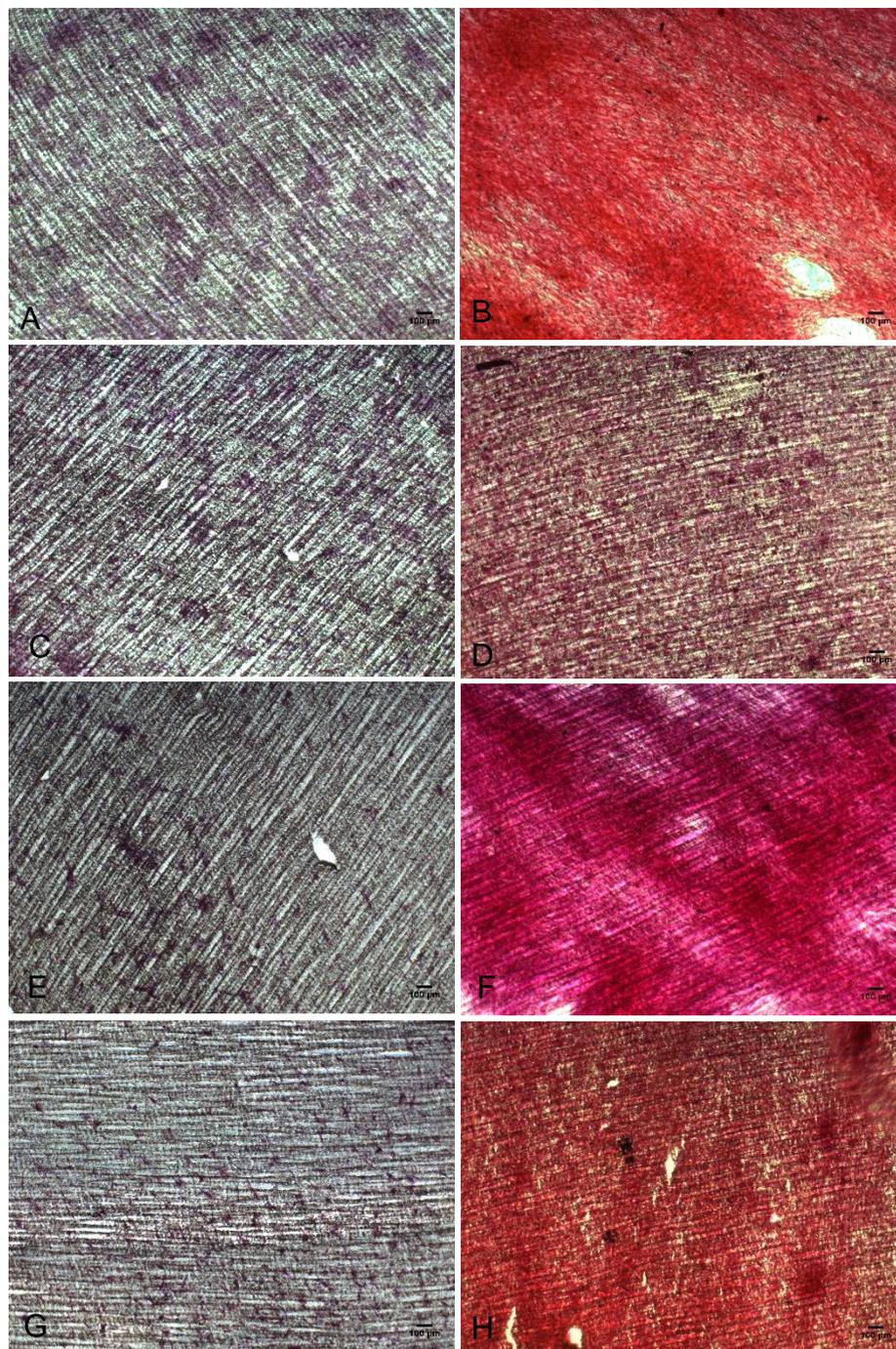
### Diferenciação tenogênica

Foi possível identificar maior quantidade de deposição de colágeno no grupo de células tratadas com o meio tenogênico comparado ao grupo controle para todas as origens de CTM (FIGURA 10). As CTMad, CTMtd ISO e CTMtd EXPL apresentaram homogênea deposição e distribuição de colágeno. Inferior capacidade de produção de colágeno foi observada para as CTMmo. Em nosso estudo foi possível determinar que dois diferentes métodos de obtenção das CTMtd (isolamento e explante) de um mesmo fragmento do endotendão, geram populações de CTMtd com distintas características de diferenciação em tri-linhagem, imunofenotipagem, taxas de proliferação *in vitro* e diferenciação tenogênica.

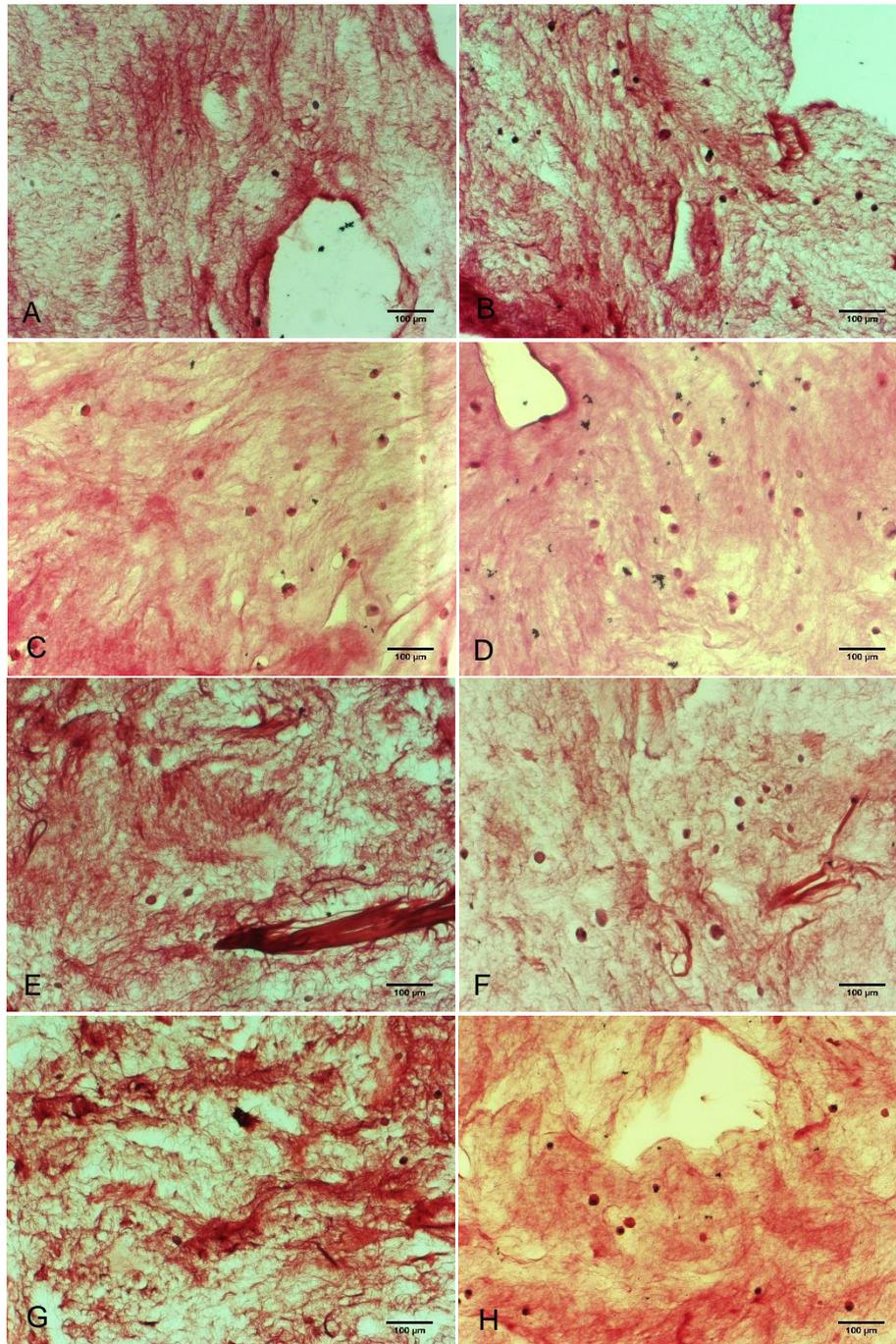
### Interação tridimensional CTM e hidrogel de MEC tendínea equina

A interação tridimensional das quatro origens de CTM com o HgMECTdEq foi avaliada por coloração de *Picrosirius Red*. Foi possível observar morfologia preservada das CTM de todas as origens em interação com o HgMECTdEq e maior número de células nos cultivos 3D tratados com meio de diferenciação

tenogênico (FIGURA 11).



**FIGURA 10.** Avaliação da diferenciação tenogênica em membrana *Transwell*<sup>®</sup> de colágeno 1 e 3. CTMad (A,B), CTMmo (C,D), CTMtd ISO (E,F), CTMtdEXPL (G,H). Controle (A,C,E,G) *objetiva de 5x*, tenogênico (B,D,F,H) *objetiva de 5x*. Ambos, controle e tratados corados com Picrosirius Red.



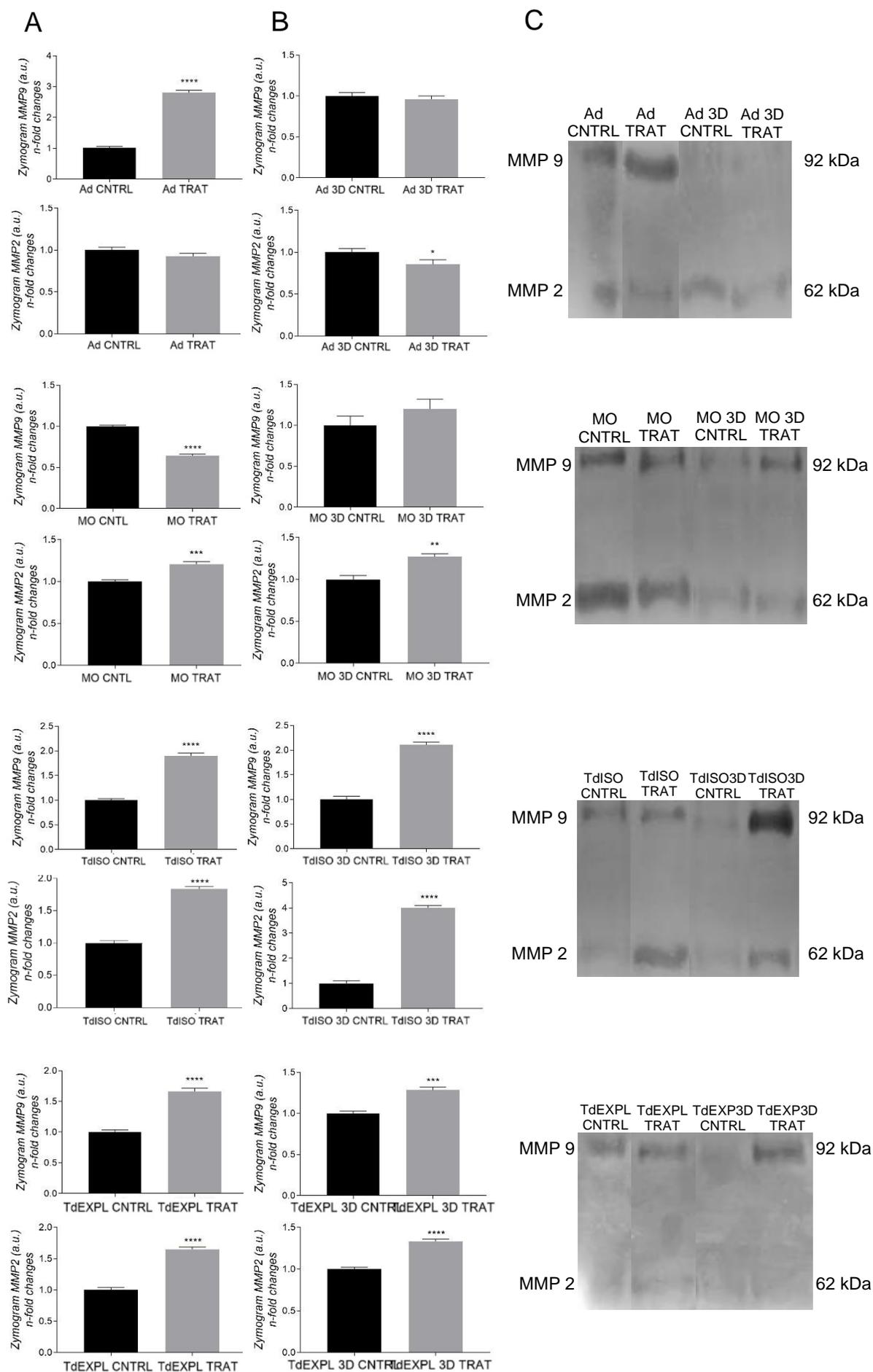
**FIGURA 11.** Avaliação da interação 3D em HgMECTdEq. CTMad (A,B), CTMmo (C,D), CTMtd ISO (E,F), CTMtd EXPL (G,H). Controle (A,C,E,G) *objetiva de 5x*, tenogênico (B,D,F,H) *objetiva de 5x*. Coloração *Picro Sirius Red*

### Zimografia

A resposta adaptativa das CTM ao ambiente que são expostas é acompanhado pelo remodelamento da MEC, ao qual é orquestrado pela

atividade das MMP. Desta forma, o ensaio de zimografia permite avaliar o perfil enzimático das MMP-2 e MMP-9, sendo assim, correlacionados com comportamento celular de proliferação e diferenciação. Os resultados do teste de zimografia estão dispostos na Figura 12. Através da análise semiquantitativa da concentração enzimática, foi possível identificar a maior concentração da enzima MMP-9 para as CTMad cultivadas em membrana de COL1:COL3 em meio tenogênico. Já a maior concentração de MMP-2 identificada nas CTMtd ISO cultivo 3D em HgMECTdEQ em meio tenogênico.

As CTM oriundas de tendão (CTMtd ISO e EXPL) apresentaram aumento significativo da expressão de MMP-9 e MMP-2 ao serem cultivadas com o meio tenogênico em ambas condições de cultivo 3D em HgMECTdEq e em membrana de COL1:COL3. Esta correlação não foi evidente em todos grupos de CTMad, apenas significância ( $P < 0,0001$ ) para MMP-9 no cultivo em membrana de COL1:COL3 com meio tenogênico. Já as CTMmo apresentaram significância estatística no cultivo com meio tenogênico em HgMECTdEq ( $P < 0,0011$ ) e em membrana COL1:COL3 ( $P < 0,0007$ ) para MMP-2.



**FIGURA 12.** Ensaio de zimografia e concentração de MMP-2 e MMP-9. **A**, coluna representa o

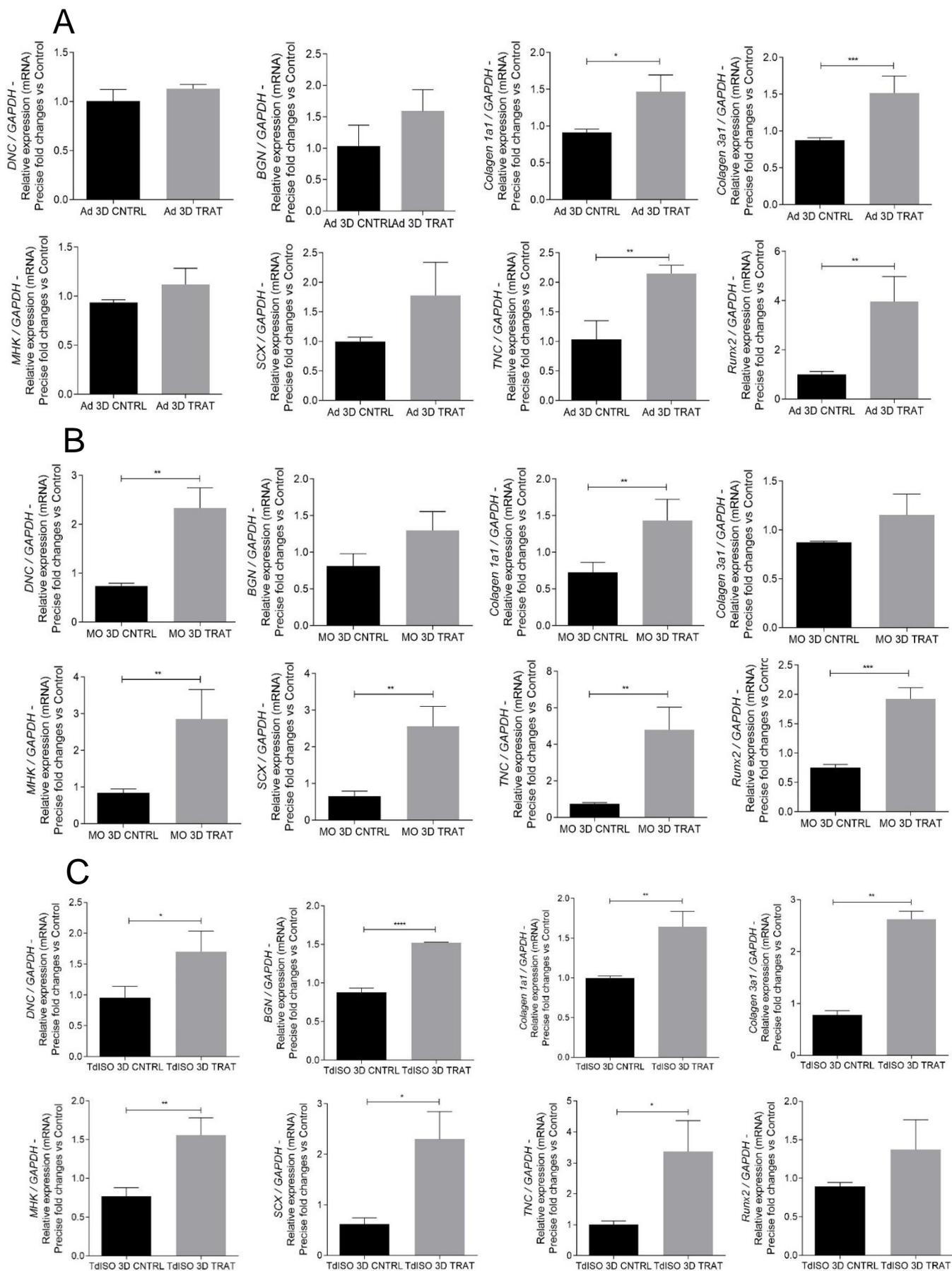
cultivo em membrana de COL1:COL3 em meio padrão (CNTRL) e meio tenogênico (TRAT) de cada origem de CTM. **B**, coluna representa o cultivo 3D em HgMECTdEq em meio padrão (CNTRL) e meio tenogênico (TRAT) de cada origem de CTM. **C**, concentração de MMP-9 e MMP-2 em gel de poliacrilamida contendo gelatina.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

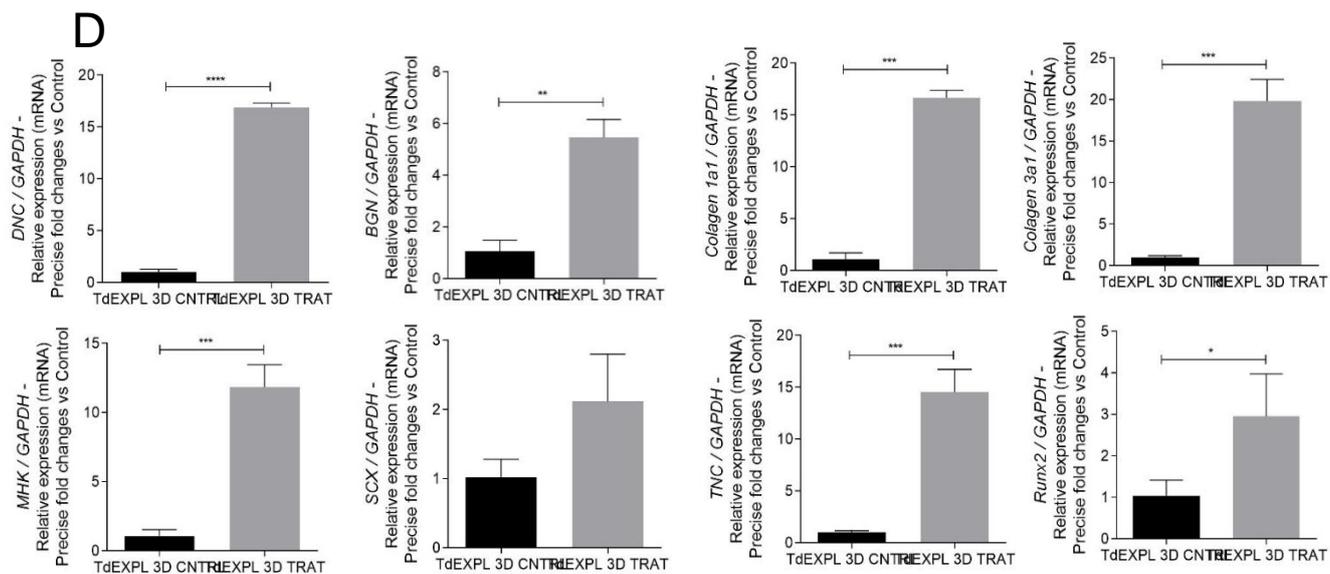
### **Expressão gênica (qPCR)**

A expressão relativa dos genes tenogênicos (BGN, COL1, COL3, DCN, MHK, SCX, TNC) e osteogênico (RUNX2) foi dividida em cultivo 3D em HgMECTdEq e em cultivo em membrana de COL1 e COL3.

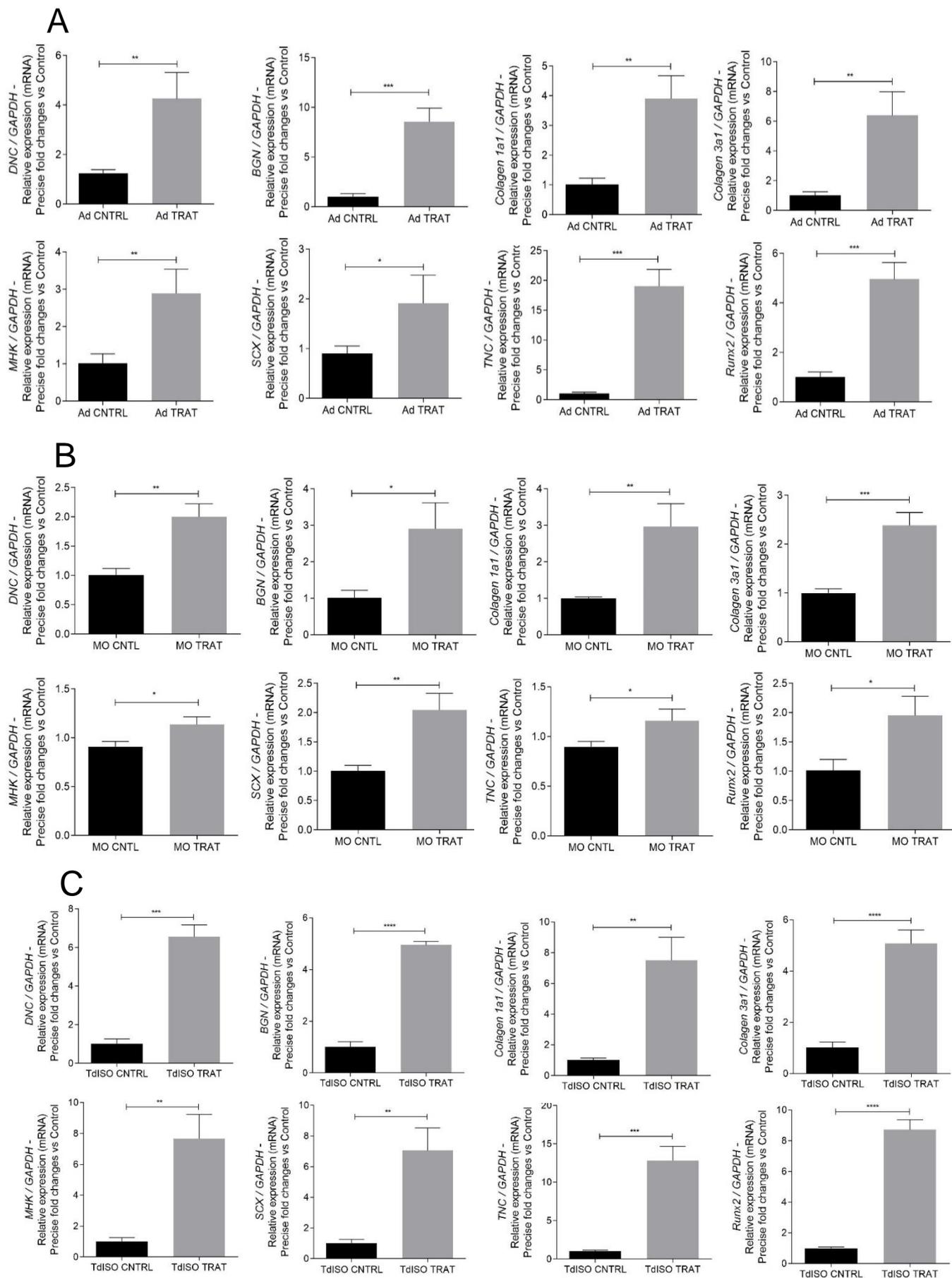
A combinação de cultivo 3D em HgMECTdEq e meio tenogênico foi capaz de aumentar a expressão gênica e todos os marcadores tenogênicos e osteogênico (Figura 13). Em todas as fontes de CTM avaliadas, houve aumento da expressão gênica de tenogênese do grupo tratado em relação ao grupo controle, no entanto, as CTMtd EXPL apresentaram o melhor desempenho.

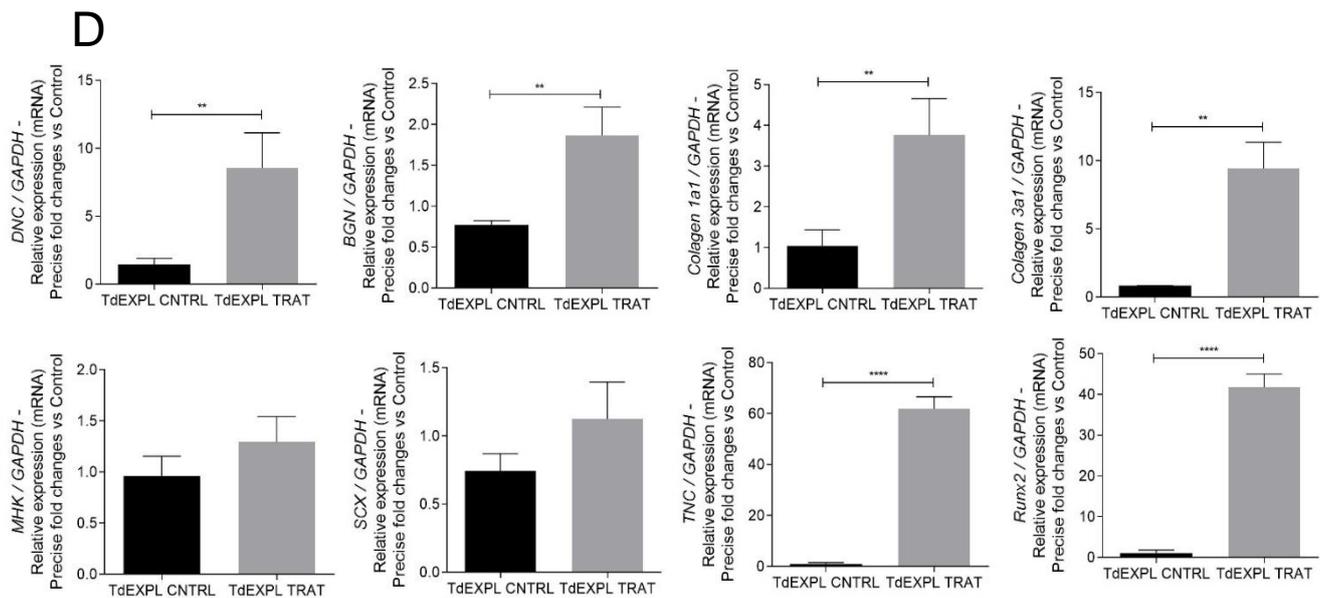
O cultivo em membrana de COL1 e COL3 associado ao meio tenogênico também foi eficaz em aumentar a expressão gênica dos marcadores tenogênicos em relação aos grupos controle com meio padrão (Figura 14). Inferior capacidade de aumento da expressão de fatores tenogênicos foi observado para CTMmo em comparação as demais origens celulares onde as significâncias sobre os grupos controles foram mais expressivas.





**FIGURA 13.** Avaliação da expressão gênica de fatores tenogênicos em cultivo 3D em HgMECTdEq. **A**, cultivo 3D de CTMad com meio padrão (Ad 3D CNTRL) e cultivo 3D de CTMad em meio tenogênico (Ad 3D TRAT). **B**, cultivo 3D de CTMmo com meio padrão (MO 3D CNTRL) e cultivo 3D de CTMmo em meio tenogênico (MO 3D TRAT). **C**, cultivo 3D de CTMtdISO com meio padrão (TdISO 3D CNTRL) e cultivo 3D de CTMtd em meio tenogênico (TdISO 3D TRAT). **D**, cultivo 3D de CTMtd EXPL com meio padrão (TdEXPL 3D CNTRL) e cultivo 3D de CTMtd EXPL em meio tenogênico (TdEXPL 3D TRAT). Valores de P:  $P \leq 0,05^*$ ,  $P \leq 0,01^{**}$ ,  $P \leq 0,001^{***}$  e  $P \leq 0,0001^{****}$ .



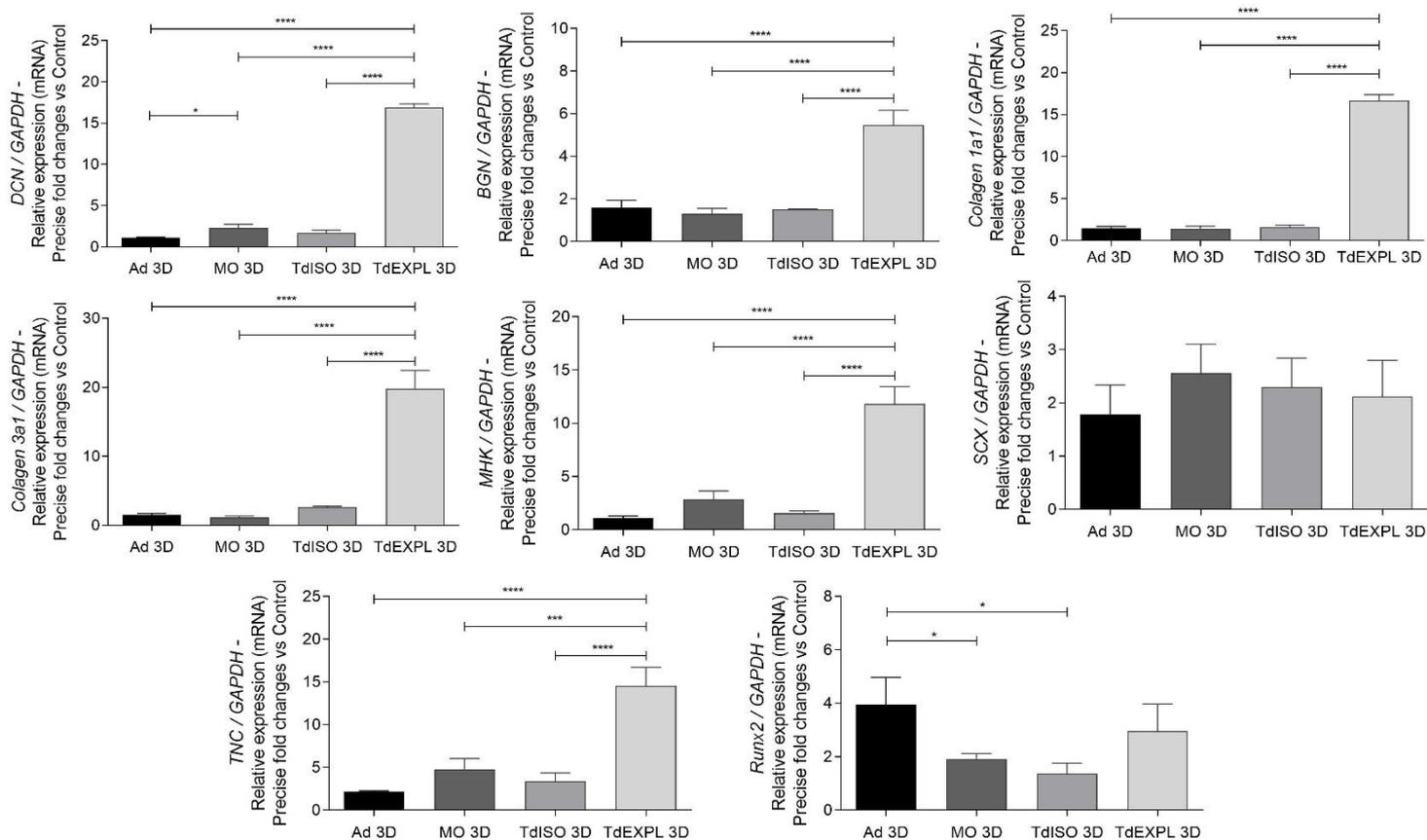


**FIGURA 14.** Avaliação da expressão gênica de fatores tenogênicos de CTM cultivadas em membrana de COL1 e COL3. **A**, cultivo 2D em membrana COL1:COL3 de CTMad com meio padrão (Ad CNTRL) e cultivo 2D em membrana COL1:COL3 de CTMad em meio tenogênico (Ad TRAT). **B**, cultivo 2D em membrana COL1:COL3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

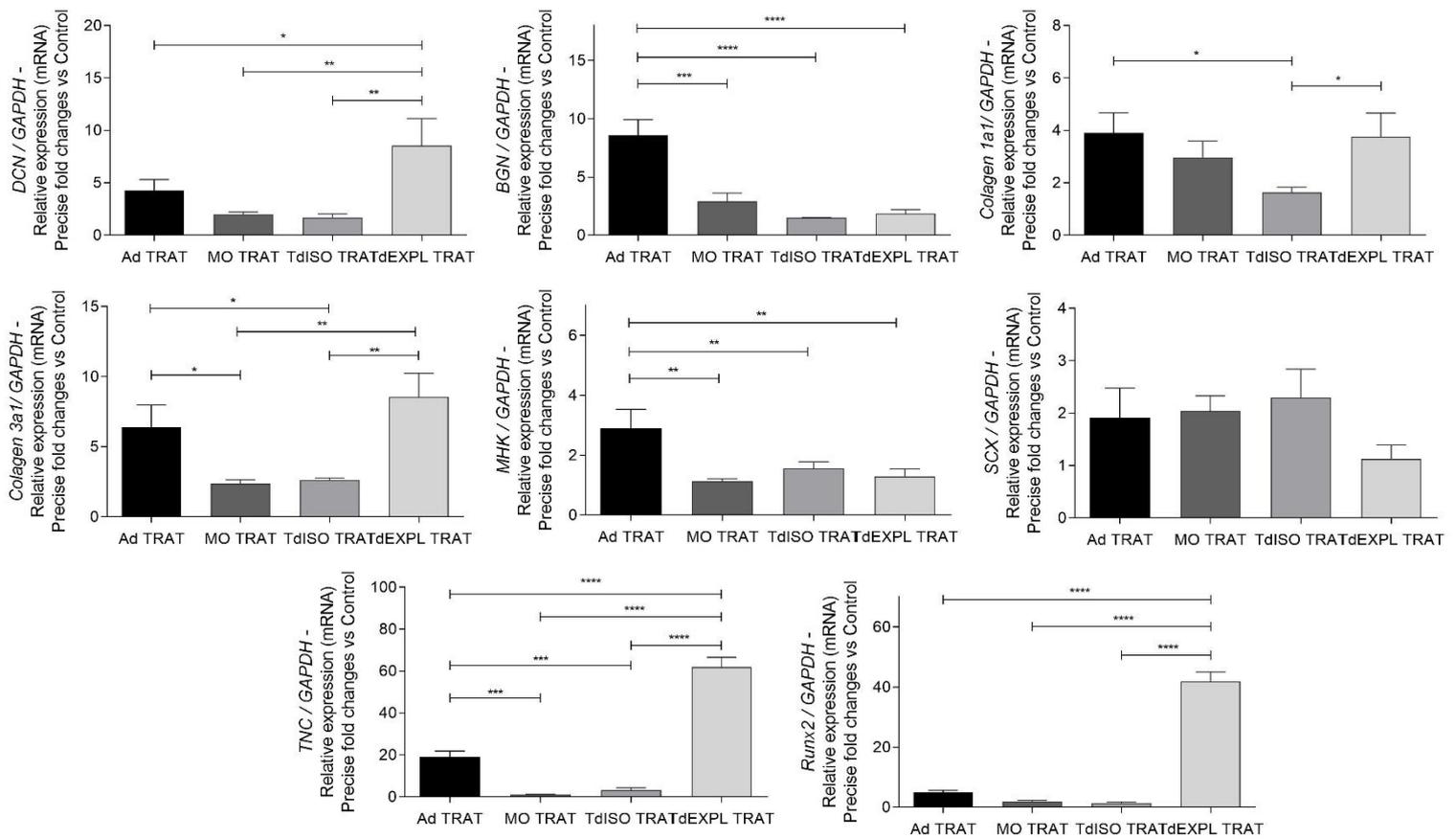
Com a finalidade de determinar qual origem de CTM apresentou melhores características de expressão gênica de tenogênese, os valores obtidos dos grupos tratados em cada gene foram comparados entre cada origem de CTM do estudo. Para o cultivo 3D em HgMECTdEq (Figura 15) as CTMtd EXPL apresentaram significativamente maior expressão gênica dos fatores tenogênicos Decorin, Biglicana, COL1, COL3, Mohawk e Tenascina C. O gene de diferenciação osteogênica Runx2 apresentou significativa maior expressão nas CTMad sobre CTMmo ( $P = 0,0428^*$ ) e CTMtd ISO ( $P = 0,0125^*$ ). Não houve diferença estatística para o gene Scleraxis.

Já a comparação entre origens de CTM em cada gene no cultivo 2D em membrana de COL1 e COL3 (Figura 16), as CTMad apresentaram superior

expressão de Biglicana e Mohalk em relação as demais origens de CTM, enquanto CTMtd EXPL apresentou expressão significativa de Decorin, Tenascina C e Runx2 em relação as demais origens. Não houve diferença estatística entre CTMad e CTMtd EXPL para expressão de COL1 e COL3, no entanto apresentaram superior expressão em comparação com CTMmo e CTMtd ISO.



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



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

## Discussão

O primeiro objetivo deste estudo foi comparar as CTMad, CTMmo e CTMtd ISO e CTMtd EXPL, importantes fontes de coleta de CTM para o tratamento de tendinite em equinos, quanto à caracterização como células-tronco mesenquimais, à capacidade de proliferação e de diferenciação tenogênica *in vitro* através da identificação da produção de colágeno, da concentração de MMP e da expressão gênica de marcadores de tenogênese.

Diversos são os fatores que influenciam no desempenho do cultivo *in vitro* e na capacidade terapêutica das CTM: fatores relacionados ao doador, como idade; presença de enfermidades e uso de fármacos.<sup>28</sup> Devido a este fato, as distintas amostras teciduais para o isolamento das CTM foram coletadas de um mesmo animal de 8 meses de idade que foi submetido a eutanásia por possuir fratura de tíbia. Portanto, as células foram expostas a condições sistêmicas similares, eliminando a variação individual que poderia interferir nos resultados obtidos.

Já foram identificadas populações de CTM derivadas de tendão obtidas de diferentes regiões como peritendão e endotendão com características morfológicas e potencial terapêutico distintos.<sup>13,14</sup> As CTM derivadas do endotendão possuem melhor capacidade de diferenciação em trilhação, além de maior expressão gênica dos fatores tenogênicos Scleraxis e Tenomodulina, em comparação das CTM obtidas do peritendão.<sup>13,15</sup> Mesmo nas CTM obtidas do endotendão foi identificado através do isolamento em *single-cells*, três fenótipos com diferentes capacidades de diferenciação tenogênica, osteogênica, condrogênica e adipogênica. O melhor fenotipo para tenogênese foi o que apresentou a melhor diferenciação em trilhação<sup>14</sup>. Desta forma, as CTMtd para realização deste estudo, foram obtidas de fragmentos do endotendão em dois diferentes métodos de isolamento, possibilitando o isolamento de distintas populações celulares de uma mesma amostra.

Foi possível observar morfologia fibroblastoide similar entre as quatro fontes de obtenção de CTM, além de habilidade de aderência ao plástico e expansão clonal. No entanto, na sexta passagem das CTMtd EXPL, foram identificadas duas colônias, com capacidades de aderência ao plástico e

expansão clonal, mas morfologia celular não-fibroblastóide. A população celular heterogênea obtida das CTMtd já é descrita, sendo um fator limitante para utilização desta fonte.<sup>12,20</sup> Apesar da morfologia globoide em cultivo 2D, que contrasta com a morfologia tipicamente fusiforme dos tenócitos, a hipótese de diferenciação tenogênica espontânea deve ser considerada, como já relatado em estudos com CTMtd de ratos<sup>10</sup>.

De acordo com os resultados expostos acima, foi possível determinar que as CTMad, CTMmo, CTMtd ISO e CTMtd EXPL possuem a capacidade de diferenciação em trilhaagem osteogênica, condrogênica e adipogênica. Foi observada inferior capacidade de diferenciação adipogênica e condrogênica para as CTMtd EXPL. A inabilidade de diferenciação adipogênica já foi identificada em um fenótipo de CTMtd equina. Os autores ainda sugerem que a inabilidade adipogênica de determinada população de CTMtd esteja associada a aumento do potencial proliferativo e menor expressão gênica de fatores tenogênicos.<sup>14</sup>

As CTMad apresentaram as melhores taxas de proliferação e menor tempo para a duplicação da população celular em cultivo 2D nas concentrações iniciais de  $3 \times 10^4$  e  $1 \times 10^5$ . Esta superioridade de proliferação *in vitro* das CTMad já é descrita e corrobora os nossos resultados.<sup>33</sup>

A avaliação das CTM por imunofenotipagem revelou epítomos positivamente expressos para o CD90 e negativos para CD45 e CD34 em todas origens celulares. A baixa expressão do marcador de angiogênese CD105 para a CTMtd ISO (22,57%), pode estar explicada pela existência de uma população de CTM CD105<sup>-</sup> que, como relatado por Pham et al. (2019), possui capacidade imunomoduladora superior à população celular CD105<sup>+</sup>.<sup>29</sup> Neste estudo foram avaliadas CTMad e CTM derivadas de cordão umbilical de humanos.<sup>29</sup> Em estudo realizado por De Mattos Carvalho et al., (2009), foi identificada variabilidade de expressão do marcador CD44 (30.63% a 75.85%) de acordo com a passagem celular de CTMad equina<sup>30</sup>, justificando a baixa expressão do marcador CD44 nas CTMad (5.16%) do nosso estudo. Apesar de descrito como marcador negativo para CTMtd do homem e ratos,<sup>12</sup> o marcador endotelial CD106 foi 58.11% positivo para as CTMtd ISO. O CD106 é descrito como um marcador

capaz de identificar uma população de CTM com atividade imunomoduladora única, apta a modular a resposta de linfócitos T *helper*.<sup>31</sup> A elevada expressão do marcador MHC-II (74.58%) das CTMtd EXPL, condiz com uma população celular não indiferenciada, podendo estar relacionado a diferença morfológica dessa origem em cultivo (FIGURA 2) e habilidade de diferenciação espontânea em tenócitos de CTMtd cultivadas em 2D.<sup>10</sup> No entanto, relatos recentes sobre a população celular tendínea foram descritas por Kental et al., (2020), onde através de análise de multiômica, foram identificados 5 fenótipos distintos de tenócitos da população celular tendínea.<sup>32</sup> De acordo com nossos resultados, sugere-se que as CTMtd ISO são precursoras de Tenócitos C (SCCM) pois, apresentaram baixa expressão do marcador de superfície CD105, negativo para o CD34 e elevada expressão positiva para o CD90. Enquanto as CTMtd EXPL demonstraram receptores de superfície similares a Tenócitos B (SCX+) por positiva expressão do CD105 e CD90, enquanto negativa expressão do CD34.<sup>32</sup>

Embora a imunofenotipagem tenha demonstrado diferenças entre as origens de CTM, todas apresentaram diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica, o que comprova sua multipotência. As diferenças de CDs entre as origens indicam que, apesar de multipotentes, as CTM apresentam heterogenicidade de proteínas de superfície de acordo com o nicho tecidual em que são obtidas.

O segundo objetivo proposto pelo estudo foi a elaboração de uma nova metodologia de indução da diferenciação tenogênica, de fácil formulação e eficácia comprovada através da capacidade de produção de colágeno e expressão gênica de fatores tenogênicos. Dentre os componentes do meio tenogênico, a BMP-12, também denominada de fator de crescimento e diferenciação 7 (GDF-7) é conhecida por sua capacidade de providenciar diferenciação tenogênica de CTM de equinos<sup>14,22</sup> e do homem<sup>34</sup>. Outros membros da família das Proteínas Ósseas Morfogenéticas como a BMP-13 e BMP-14 também possuem essa característica, no entanto com capacidade inferior.<sup>35,36</sup> Em recente estudo foi determinado que a suplementação de 50 ng/ml de BMP-12 no meio de cultivo, associada ao cultivo 3D em MEC de COL1 é capaz de estimular a expressão gênica de marcadores tendíneos, aumentar o alinhamento celular e constituição morfológica similar ao tendão quando comparado aos demais

grupos.<sup>22</sup> O ácido ascórbico é amplamente conhecido por sua capacidade antioxidante e de hidroxilação de colágeno. Estudos recentes determinaram o ácido ascórbico como substância essencial a ser suplementado no meio de cultivo para produção de colágeno *in vitro* por tenócitos e CTMad humanos.<sup>21,37</sup>

Conforme expresso pelos resultados histológicos, foi possível determinar que as CTMad, CTMmo, CTMtd ISO e CTMtd EXPL, possuem capacidade de diferenciação tenogênica devido a produção de MEC de colágeno, identificado pela coloração de Picro Sirius Red, quando cultivadas em membrana revestida de COL1:COL3 e meio tenogênico durante 7 dias de cultivo, com destaque para as CTMad, CTMtd ISO e EXPL, pela superioridade na produção de colágeno. No entanto, essa característica foi pouco observada para as CTMmo, expostas às mesmas condições. Apesar de a capacidade de diferenciação tenogênica de CTMmo equina já ser descrita, o método de determinação da diferenciação tenogênica foi realizada pela alteração morfológica de célula fibroblastóide para célula alongada, em cultivo 2D e expressão gênica dos marcadores Tenomodulina e Decorin após 14 dias de cultivo suplementado com 50 ng / ml de BMP-12.<sup>38</sup> A capacidade de produção de colágeno não foi avaliada no referido estudo.<sup>38</sup> Em estudo comparativo de CTM de ratos, foi determinada capacidade de diferenciação osteo, condro e adipogênica superior das CTMtd sobre as CTMmo, além de maior expressão de marcadores tenogênicos como Tenomodulina, Scleraxis, Colágeno I, Decorin e Biglicana.<sup>39</sup> Ao contrário, Dai et al., (2015) após infectar as CTMmo, CTMad e CTM derivadas de membrana sinovial (CTMms) com adenovírus recombinante de BMP-12 determinaram capacidade de diferenciação tenogênica superior através da expressão do marcadores tenogênicos Scleraxis, Tenomodulina e Tenascina C, além da diferenciação em trilhação das CTMmo sobre as CTMad e CTMms murinas.<sup>40</sup> As CTM infectadas pelo BMP-12 foram implantadas no tecido subcutâneo de camundongos e após 3 e 6 semanas de incubação, foram analisados por histologia. Em avaliação de imunohistoquímica, foi identificada maior intensidade de coloração para o marcador de COL1 nas CTMmo e CTMms em comparação com as CTMad.<sup>40</sup>

Em nosso estudo, através da coloração de Picrosirius red foi possível identificar alteração da morfologia celular após a indução tenogênica em

membrana de COL1:COL3 (Figura 10). As células que possuíam formato fibroblastóide, adquiriram morfologia mais delgada, alongadas e fusiformes. Esta alteração foi recentemente descrita por Javanshir et al., (2020) ao avaliar a morfologia das células em 2D após indução tenogênica em meio composto por Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF-BB) e/ou Fator de crescimento / diferenciação 6 (GDF-6), por 14 dias<sup>41</sup> e por Rajpar e Barret (2020) em cultivo 3D em COL1, em meio composto por BMP-12, IGF-1 e AA, por 10 dias de cultivo.

Em recente estudo, foi avaliada a expressão gênica de fatores tenogênicos das CTMad, CTMmo e CTMtd humanas em condições tradicionais de cultivo, sem indução tenogênica e em monocamada. As CTMtd apresentaram significativa expressão dos fatores Scleraxis e Mohawk em relação às demais células.<sup>11</sup> Foi identificada também a capacidade de diferenciação tenogênica espontânea de CTMtd de ratos cultivadas por 30 dias inicialmente em monocamada com subsequente agrupamento 3D e produção de colágeno. Esta determinação baseia-se na identificação da produção de colágeno por coloração de Picrosirius Red e aumento da expressão gênica de fatores tenogênicos concomitante a redução da expressão de marcadores de multipotência.<sup>10</sup> Devido a esses fatores, a conhecida tecido-especificidade associada ao sítio de coleta das CTM,<sup>9</sup> e os resultados do nosso estudo, podemos sugerir a existência de vantagens do uso de CTMtd ISO no tratamento de lesões tendíneas quando comparada com CTMad e CTMmo, assumindo a capacidade de diferenciação tenogênica destas células.

Com a finalidade de elucidar o panorama de remodelamento da MEC no cultivo em HgMECTdEq e em membrana COL1:COL3 foi avaliado o perfil de secreção de MMP-2 e MMP-9 através do ensaio de zimografia. Foi possível identificar que o meio tenogênico foi capaz de aumentar a concentração de MMP-2 e MMP-9 em ambas modalidades de cultivo (HgMECTdEq e membrana COL1:COL3) para as CTMtd ISO e EXPL. Esta dinâmica não se repetiu na totalidade para as CTMad, havendo aumento da concentração apenas da MMP-9 em membrana COL1:COL3 do meio tenogênico em relação ao controle. Já as CTMmo apresentaram significativo aumento de MMP-2 em ambos cultivos em meio tenogênico em relação ao controle, o que não se repetiu para a MMP-9.

Podemos identificar que o meio tenogênico foi capaz de aumentar a secreção de MMP-2 e MMP-9. Esta habilidade de remodelamento da MEC foi superior para as CTMtd ISO e EXPL. Este fator pode ser determinado pela especificidade do tecido, pois são naturalmente envolvidas por grande quantidade de colágeno, e apresentam melhor perfil enzimático de gelatinases e colagenases.<sup>9,42</sup>

O meio tenogênico associado ao cultivo 3D em HgMECTdEq (Figura12) e cultivo 2D em membrana *Transwell*<sup>TM</sup> revestida de COL1:COL3 (Figura 13) foi capaz de aumentar significativamente a expressão dos dos fatores de transcrição tenogênicos Scleraxis e Mohawk, dos pequenos proteoglicanos ricos em leucina, Decorin e Biglicana, dos principais componetes da MEC tendínea COL1 e COL3, da glicosaminoglicana Tenascina C e do fator de transcrição associado a diferenciação de osteoblastos RUNX2, nas quatro fontes de CTM avaliadas no estudo (CTMad, CTMmo, CTMtd ISO e CTMtd EXPL).

Descritos como os principais fatores relacionados a tenogênese, os fatores de transcrição gênicos Scleraxis e Mohawk, são expressos em tendões diferenciados e maduros<sup>14,43</sup>. O predomínio da expressão de Mohawk e Biglican para as CTMad no cultivo tenogênico em membrana COL1:COL3 (Figura 15) destaca a superioridade desta fonte de CTM para a diferenciação tenogênica. Assim como em nosso estudo, Javanshir et al., (2020) não obseveram diferença estatística para a expressão gênica de Sclerax de CTMad equinas cultivadas em meio contendo PDGF-BB e/ou GDF-6, analisado após 14 dias de cultivo. Os autores sugerem que o pico de expressão deste gene acontece nos primeiros dias de cultivo.<sup>41</sup> Houve maior expressão gênica de COL1 e COL3 para as CTMad e CTMtd EXPL no cultivo tenogênico em membrana de COL1:COL3, no entanto, os níveis similares destas duas proteínas sugerem um estágio imaturo da produção de MEC por essas células, pois, em tendões maduros e saudáveis há um predomínio de COL1 sobre COL3.<sup>14,44</sup>

No cultivo 3D em HgMECTdEq, houve uma significativa expressão dos fatores tenogênicos Decorin, Biglicana, Mohawk, COL1, COL3 e Tenascina C para as CTMtd EXPL em relação as demais fontes de CTM não havendo diferença estatística para expressão de Scleraxis e para expressão de Runx2. Esta evidente superioridade foi também demosntrada por Yang et al., (2019) ao

compararem o nível de expressão gênica dos marcadores Scleraxis, Mohawk, Resposta de crescimento inicial 1 (Egr1), Colágeno 1A2, Colágeno 14, Decorin, Elastin, Tenascina C e Fibromodulina entre tenócitos e CTMmo e tenócitos de pluripotência induzida (teno-IPSCs). Deste modo, aliado a alta expressão de MHC-II e reduzida capacidade de diferenciação em tri-linhagem, podemos sugerir que parte das CTMtd EXPL são na verdade células diferenciadas, possivelmente tenócitos.

Apesar da possibilidade de expressão gênica de fatores osteogênicos ter relação com metaplasia óssea no tecido tendíneo, recente estudo sugere que o fenótipo de CTMtd equina que possui menor capacidade osteogênica e menor expressão de Runx2, também demonstrou inferior habilidade de contração da MEC de colágeno e estaria associado a menor capacidade terapêutica *in vivo*.<sup>14</sup>

De acordo com os conhecimentos dos autores, este é o primeiro estudo que realiza a diferenciação tenogênica de CTMad, CTMmo e CTMtd cultivadas em membrana de COL1:COL3 e em HgMECTdEq. De acordo com nossos resultados a melhor fonte em capacidade de proliferação, diferenciação tenogênica *in vitro* e segurança para aplicações clínicas são as CTMad. Em contraste, as CTMmo apresentaram inferior habilidade de proliferação *in vitro* e de tenogênese. As CTMtd ISO apresentaram evidente capacidade de tenogênese *in vitro*, sendo uma fonte de CTM promissora. Apesar das CTMtd EXPL apresentarem evidente capacidade de tenogênese, foi identificado ser uma população heterogênea em cultivo e resultados de caracterização que desencorajam sua utilização clínica, especialmente de forma alogênica. A nova metodologia de diferenciação tenogênica proposta pelo estudo foi eficaz em induzir a tenogênese de todas as fontes de CTM avaliadas.

## Referências

1. O'Brien C, Marr N, Thorpe C. Microdamage in the equine superficial digital flexor tendon. *Equine Vet J*. 2020;(July):1-14. doi:10.1111/evj.13331
2. Docheva D, Müller SA, Majewski M, Evans CH. Biologics for tendon repair. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015;84:222-239. doi:10.1016/j.addr.2014.11.015
3. Barreira APB, Alves AL, Salto ME, et al. Autologous implant of bone

- marrow mononuclear cells as treatment of induced equine tendinitis. *Int J Appl Res Vet Med*. 2008;6(1):46-54.
4. Smith RKW, Korda M, Blunn GW, Goodship AE. Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. *Equine Vet J*. 2003;35(1):99-102. doi:10.2746/042516403775467388
  5. De Mattos Carvalho A, Alves ALG, De Oliveira PGG, et al. Use of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells for Experimental Tendinitis Therapy in Equines. *J Equine Vet Sci*. 2011;31(1):26-34. doi:10.1016/j.jevs.2010.11.014
  6. Carvalho ADM, Badial PR, Álvarez LEC, et al. Equine tendonitis therapy using mesenchymal stem cells and platelet concentrates: A randomized controlled trial. *Stem Cell Res Ther*. 2013;4(4). doi:10.1186/scrt236
  7. Alves AGL, Stewart AA, Dudhia J, Kasashima Y, Goodship AE, Smith RKW. Cell-based Therapies for Tendon and Ligament Injuries. *Vet Clin North Am - Equine Pract*. 2011;27(2):315-333. doi:10.1016/j.cveq.2011.06.001
  8. Heo JS, Choi Y, Kim HS, Kim HO. Comparison of molecular profiles of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, umbilical cord blood, placenta and adipose tissue. *Int J Mol Med*. 2016;37(1):115-125. doi:10.3892/ijmm.2015.2413
  9. Rohban R, Pieber TR. Mesenchymal stem and progenitor cells in regeneration: Tissue specificity and regenerative potential. *Stem Cells Int*. 2017;2017. doi:10.1155/2017/5173732
  10. Guo J, Chan KM, Zhang JF, Li G. Tendon-derived stem cells undergo spontaneous tenogenic differentiation. *Exp Cell Res*. 2016;341(1):1-7. doi:10.1016/j.yexcr.2016.01.007
  11. Orfei CP, Viganò M, Pearson JR, et al. In vitro induction of tendon-specific markers in tendon cells, adipose-and bone marrow-derived stem cells is dependent on TGF $\beta$ 3, BMP-12 and ascorbic acid stimulation. *Int J Mol Sci*. 2019;20(1):1-15. doi:10.3390/ijms20010149
  12. Bi Y, Ehrchiou D, Kilts TM, et al. Identification of tendon stem/progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche. *Nat Med*. 2007;13(10):1219-1227. doi:10.1038/nm1630
  13. Cadby JA, Buehler E, Godbout C, Van Weeren PR, Snedeker JG. Differences between the cell populations from the peritenon and the tendon core with regard to their potential implication in tendon repair. *PLoS One*. 2014;9(3):1-11. doi:10.1371/journal.pone.0092474
  14. Rajpar I, Barrett JG. Multi-differentiation potential is necessary for optimal tenogenesis of tendon stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2020;11(1):1-12. doi:10.1186/s13287-020-01640-8

15. Mienaltowski MJ, Adams SM, Birk DE. Regional differences in stem cell/progenitor cell populations from the mouse achilles tendon. *Tissue Eng - Part A*. 2013;19(1-2):199-210. doi:10.1089/ten.tea.2012.0182
16. S. Durgam S, C. Stewart M. Tendon-derived progenitor cells: In vitro characterization and clinical applications for tendon repair. *J Stem Cell Res Med*. 2016;1(1):8-17. doi:10.15761/jscrm.1000102
17. Smith RKW, Werling NJ, Dakin SG, Alam R, Goodship AE, Dudhia J. Beneficial Effects of Autologous Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Naturally Occurring Tendinopathy. 2013;8(9):1-14. doi:10.1371/journal.pone.0075697
18. O'Brien EJO, Smith RKW. Mineralization can be an incidental ultrasonographic finding in equine tendons and ligaments. 2018;(February):613-623. doi:10.1111/vru.12628
19. Abeysinghe HCS, Bokhari L, Quigley A, et al. Pre-differentiation of human neural stem cells into GABAergic neurons prior to transplant results in greater repopulation of the damaged brain and accelerates functional recovery after transient ischemic stroke. *Stem Cell Res Ther*. 2015:1-19. doi:10.1186/s13287-015-0175-1
20. Costa-almeida R, Calejo I, Gomes ME. Mesenchymal Stem Cells Empowering Tendon Regenerative Therapies. 2019.
21. Stanco D, Caprara C, Ciardelli G, et al. Tenogenic differentiation protocol in xenogenic-free media enhances tendon-related marker expression in ASCs. *PLoS One*. 2019;14(2):1-21. doi:10.1371/journal.pone.0212192
22. Rajpar I, Barrett JG. Optimizing growth factor induction of tenogenesis in three-dimensional culture of mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng*. 2019;10. doi:10.1177/2041731419848776
23. Abdulmalik S, Ramos D, Rudraiah S, Banasavadi-Siddegowda YK, Kumbar SG. The glucagon-like peptide 1 receptor agonist Exendin-4 induces tenogenesis in human mesenchymal stem cells. *Differentiation*. 2021;120(December 2020):1-9. doi:10.1016/j.diff.2021.05.001
24. Kapacee Z, Yeung CYC, Lu Y, Crabtree D, Holmes DF, Kadler KE. Synthesis of embryonic tendon-like tissue by human marrow stromal/mesenchymal stem cells requires a three-dimensional environment and transforming growth factor  $\beta$ 3. *Matrix Biol*. 2010;29(8):668-677. doi:10.1016/j.matbio.2010.08.005
25. Yang G, Rothrauff BB, Lin H, Gottardi R, Alexander PG, Tuan RS. Enhancement of tenogenic differentiation of human adipose stem cells by tendon-derived extracellular matrix. *Biomaterials*. 2013;34(37):9295-9306. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.08.054
26. Li W, Chi N, Rathnayake RAC, Wang R. Distinctive roles of fibrillar collagen I and collagen III in mediating fibroblast-matrix interaction: A nanoscopic

- study. *Biochem Biophys Res Commun.* 2021;560:66-71. doi:10.1016/j.bbrc.2021.04.088
27. Santos VH, Pfeifer JPH, De Souza JB, et al. Correction to: Culture of mesenchymal stem cells derived from equine synovial membrane in alginate hydrogel microcapsules (*Stem Cell Research and Therapy* (2018) 14 (114) DOI: 10.1186/s12917-018-1425-0). *Stem Cell Res Ther.* 2018;9(1):1-10. doi:10.1186/s13287-018-0999-6
  28. Yamaguchi S, Horie N, Satoh K, et al. Age of donor of human mesenchymal stem cells affects structural and functional recovery after cell therapy following ischaemic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2018;38(7):1199-1212. doi:10.1177/0271678X17731964
  29. Pham LH, Vu NB, Pham P Van. The subpopulation of CD105 negative mesenchymal stem cells show strong immunomodulation capacity compared to CD105 positive mesenchymal stem cells. 2016;6(4):3131-3140.
  30. de Mattos Carvalho A, Alves ALG, Golim MA, et al. Isolation and immunophenotypic characterization of mesenchymal stem cells derived from equine species adipose tissue. *Vet Immunol Immunopathol.* 2009;132(2-4):303-306. doi:10.1016/j.vetimm.2009.06.014
  31. Yang ZX, Han ZB, Ji YR, et al. CD106 Identifies a Subpopulation of Mesenchymal Stem Cells with Unique Immunomodulatory Properties. *PLoS One.* 2013;8(3):1-12. doi:10.1371/journal.pone.0059354
  32. Kendal AR, Layton T, Al-Mossawi H, et al. Multi-omic single cell analysis resolves novel stromal cell populations in healthy and diseased human tendon. *Sci Rep.* 2020;10(1):1-14. doi:10.1038/s41598-020-70786-5
  33. Li CY, Wu XY, Tong JB, et al. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue under xeno-free conditions for cell therapy. *Stem Cell Res Ther.* 2015;6(1). doi:10.1186/s13287-015-0066-5
  34. Zarychta-Wiśniewska W, Burdzinska A, Kulesza A, et al. Bmp-12 activates tenogenic pathway in human adipose stem cells and affects their immunomodulatory and secretory properties. *BMC Cell Biol.* 2017;18(1):1-14. doi:10.1186/s12860-017-0129-9
  35. Chai W, Ni M, Rui YF, et al. Effect of growth and differentiation factor 6 on the tenogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Chin Med J (Engl).* 2013;126(8):1509-1516. doi:10.3760/cma.j.issn.0366-6999.20123351
  36. Tan SL, Ahmad RE, Ahmad TS, et al. Effect of growth differentiation factor 5 on the proliferation and tenogenic differentiation potential of human mesenchymal stem cells in vitro. *Cells Tissues Organs.* 2012;196(4):325-338. doi:10.1159/000335693

37. Hakimi O, Poulson R, Thakkar D, Yapp C, Carr A. Ascorbic acid is essential for significant collagen deposition by human tenocytes in vitro. *Oxid Antioxid Med Sci*. 2014;3(2):119. doi:10.5455/oams.030514.or.063
38. Violini S, Ramelli P, Pisani LF, Gorni C, Mariani P. Horse bone marrow mesenchymal stem cells express embryo stem cell markers and show the ability for tenogenic differentiation by in vitro exposure to BMP-12. *BMC Cell Biol*. 2009;10:1-10. doi:10.1186/1471-2121-10-29
39. Tan Q, Lui PPY, Rui YF, Wong YM. Comparison of potentials of stem cells isolated from tendon and bone marrow for musculoskeletal tissue engineering. *Tissue Eng - Part A*. 2012;18(7-8):840-851. doi:10.1089/ten.tea.2011.0362
40. Dai L, Hu X, Zhang X, et al. Different tenogenic differentiation capacities of different mesenchymal stem cells in the presence of BMP-12. *J Transl Med*. 2015;13(1):1-14. doi:10.1186/s12967-015-0560-7
41. Javanshir S, Younesi Soltani F, Dowlati G, Parham A, Naderi-Meshkin H. Induction of tenogenic differentiation of equine adipose-derived mesenchymal stem cells by platelet-derived growth factor-BB and growth differentiation factor-6. *Mol Biol Rep*. 2020;47(9):6855-6862. doi:10.1007/s11033-020-05742-7
42. Page-mccaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. 2007;8(March):221-233. doi:10.1038/nrm2125
43. Yang F, Zhang A, Richardson DW. Regulation of the tenogenic gene expression in equine tenocyte-derived induced pluripotent stem cells by mechanical loading and Mohawk. *Stem Cell Res*. 2019;39(May):101489. doi:10.1016/j.scr.2019.101489
44. Pingel J, Lu Y, Starborg T, et al. 3-D ultrastructure and collagen composition of healthy and overloaded human tendon: Evidence of tenocyte and matrix buckling. *J Anat*. 2014;224(5):548-555. doi:10.1111/joa.12164