

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS AGROPECUÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

ITALO DOS SANTOS COUTINHO

**AVALIAÇÃO DE MEMBRANA BIOLÓGICA E CÉLULAS TRONCO COMO
POTENCIAIS REPARADORAS DE TENORRAFIA EM RATOS WISTAR.**

Campos dos Goytacazes - RJ

Junho de 2022

ITALO DOS SANTOS COUTINHO

**AVALIAÇÃO DE MEMBRANA BIOLÓGICA E CÉLULAS TRONCO COMO
POTENCIAIS REPARADORAS DE TENORRAFIA EM RATOS WISTAR.**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologia Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Campos dos Goytacazes - RJ

Junho de 2022

ITALO DOS SANTOS COUTINHO

**AVALIAÇÃO DE MEMBRANA BIOLÓGICA E CÉLULAS TRONCO COMO
POTENCIAIS REPARADORAS DE TENORRAFIA EM RATOS WISTAR.**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agrárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção de título de Mestre em Ciência Animal, na área de concentração de Sanidade Animal.

Aprovado em ____ de _____ de 2022.

COMISSÃO EXAMINADORA

Dr^a. Rachel Bittencourt Ribeiro Rodrigues
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF

Prof. Dr^o. Raphael Medina Mansur
Universidade Iguazu- UNIG

Prof(a). Dr^a. Ana Bárbara Freitas Rodrigues
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro- UENF
Coorientadora

Prof. Dr^o. Eulógio Carlos Queiróz de Carvalho
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro- UENF
Orientador

*Dedico aos meus pais e avós, que são base da minha vida e história, sendo grandes exemplos de amor, caráter,
trabalho e fé.*

AGRADECIMENTOS

Ao final desse trabalho, além do resultado científico conquistado, levo comigo a experiência de que, sozinhos nada conseguimos fazer. Pois durante esse período, principalmente afetado por uma pandemia, foi preciso de apoio familiar, moral e profissional para realizar cada etapa da pesquisa científica. Com isso, me encontro agradecido por cada um que de alguma forma contribuiu com o sucesso desse trabalho.

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus e Nossa Senhora Aparecida, pela proteção, guia e conforto em todos os momentos que precisei.

Aos meus pais, Nestor de Souza Coutinho e Alessandra Gomes dos Santos Coutinho e meu irmão Arthur dos Santos Coutinho por todo apoio e acolhimento em meu caminho trilhado até aqui e também compreensão nos momentos de ausência.

Aos meus avós, Glauter, Marizete, Irene (*in memorian*) e Admario (*in memorian*) por serem meus exemplos e terem influenciado direto e indiretamente na minha vida pessoal e profissional.

Aos meus tios e primos pelos momentos de felicidade e lazer em família que sempre sou proporcionado e pelos momentos de apoio quando necessário.

Ao Afonso Rangel, aluno de iniciação científica, mas antes disso, um amigo que foi meu braço direito em todo o experimento, sendo de fundamental importância para a conclusão deste trabalho. Layane Rocha, Luiza Feitosa e Ana Claudia, grande amigas que também auxiliaram durante o experimento, além das conversas e conselhos.

Aos técnicos e residentes do Laboratório de Morfologia e Patologia Animal da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (LMPA/UENF), onde principalmente Elizabeth Gonçalves e Aline Felix foram muito importantes no auxílio das lâminas histológicas.

À minha colega e amiga Dra. Rachel Bittencourt Ribeiro Rodrigues, me auxiliando na leitura das lâminas histológicas de parte do experimento e também pelos conselhos dados.

Aos demais pós-graduandos que foram grandes amigos e colegas, auxiliando durante todo o programa de mestrado, em especial à Géssica Gomes e Brenda Petroneto, as quais me ajudaram muito.

À minha co-orientadora, Professora Dra. Ana Bárbara Freitas Rodrigues, por todo apoio, guia, conselhos em toda minha vida acadêmica, sendo certamente minha grande influência em todo meu aspecto profissional.

Ao meu orientador, Professor Dr. Eulógio Carlos Queiróz de Carvalho, onde eu me considero um privilegiado por ter tido a oportunidade de compartilhar esse trabalho. Aprendi muito tanto de forma profissional, quanto pessoal, pois além de um excelente professor, orientador, profissional, é também uma pessoa muito generosa, humilde e de caráter ímpar.

Aos professores e colegas do Centro de Ciências Biológicas (CBB) da UENF, que me ajudaram imensamente na logística e realização do trabalho. Em especial, professor Clóvis, professora Rita, Nina, Fabrício e Giliane.

Ao Enrico Jardim, com apoio da sua empresa Celltrovet também foi de fundamental importância para a realização e sucesso do trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão do auxílio financeiro.

Agradeço a Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, pela oportunidade de fazer parte do grupo de discentes pós-graduandos.

Agradeço aos animais que participaram da realização do trabalho, com a consciência de que foram utilizados para a contribuição e crescimento da medicina veterinária.

RESUMO

Ruptura e lacerações tendíneas são problemas ortopédicos de grande importância na medicina veterinária. Muitas das vezes, animais são descartados ou retirados da vida atlética por conta de rompimento de tendões. Sendo assim, novas possibilidades terapêuticas vêm sendo utilizadas para melhorar e acelerar a cicatrização tendínea. O objetivo do trabalho foi avaliar o uso de membrana biológica derivada de túnica albugínea bovina e células tronco em tenorrafias na medicina veterinária. Para isso foram utilizados 31 ratos da raça Wistar, adultos, subdivididos em 4 grupos experimentais sendo o grupo controle (GC) com 4 animais, grupo tenotomia (GT), grupo membrana biológica (GMB) e grupo célula tronco (GCT), cada um com 9 animais. As túnicas albugíneas foram coletadas diretamente de frigorífico abatedouro de bovinos da região Norte Fluminense do estado do Rio de Janeiro. As túnicas passaram por processamento de limpeza, conservação e análises de qualidade, estando aptas para uso. Foram utilizados 3 ratos jovens da raça Wistar, para extrair tecido adiposo subcutâneo com a finalidade de cultivo de células tronco para futura utilização no experimento. Após as cirurgias em todos os grupos experimentais, os animais foram eutanasiados em 3 momentos; 7, 14 e 21 dias de pós-operatório, onde foram avaliados macroscopicamente e microscopicamente. O GT e GMB demonstraram baixa qualidade de cicatrização, inflamação em quase todos os momentos avaliados, com membros edemaciados, inflamações tendíneas e tecido conjuntivo pouco denso e irregular. O GCT apresentou um resultado muito superior, em relação a todos os parâmetros avaliados entre os grupos, baixa inflamação tendínea, sem edema de membros, quantidade e qualidade de colágeno muito superior e desde o primeiro momento de avaliação, demonstrando uma cicatrização rápida e de muita qualidade tecidual. Sendo assim, concluímos que a utilização de membranas biológicas não apresenta bons resultados em tenorrafias, e por sua vez a utilização de células tronco demonstra um excelente resultado quantitativo e qualitativo na recuperação dos tecidos de tendões operados.

Palavras chave: Ruptura tendínea, células tronco, histologia.

ABSTRACT

Tendon rupture and lacerations are orthopedic problems of great importance in veterinary medicine. Many times, animals are discarded or withdrawn from athletic life due to tendon rupture. Therefore, new therapeutic possibilities have been used to improve and accelerate tendon healing. The objective of this work was to evaluate the use of biological membrane derived from bovine tunica albuginea and stem cells in tenorrhaphies in veterinary medicine. For this, 31 adult Wistar rats were used, subdivided into 4 experimental groups, the control group (CG) with 4 animals, tenotomy group (TG), biological membrane group (GMB) and stem cell group (GCT), each one with 9 animals. The albuginous tunics were collected directly from a cattle slaughterhouse in the North Fluminense region of the state of Rio de Janeiro. The tunics underwent cleaning processing, conservation and quality analysis, being ready for use. Three young Wistar rats were used to extract subcutaneous adipose tissue in order to grow stem cells for future use in the experiment. After the surgeries in all the experimental groups, the animals were euthanized in 3 moments; 7, 14 and 21 days after surgery, where they were evaluated macroscopically and microscopically. The GT and GMB showed poor healing quality, inflammation at almost all evaluated moments, with swollen limbs, tendinous inflammations and non-dense and irregular connective tissue. The GCT presented a much superior result, in relation to all parameters evaluated between the groups, low tendinous inflammation, without limb edema, much higher quantity and quality of collagen and from the first moment of evaluation, demonstrating a fast healing and a lot of healing. tissue quality. Therefore, we conclude that the use of biological membranes does not present good results in tenorrhaphies, and in turn the use of stem cells demonstrates an excellent quantitative and qualitative result in the recovery of tissues from operated tendons.

Key words: Tendon rupture, Stem cells, histology.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Imagem ilustrativa de membro pélvico de cão, demonstrando a localização do tendão, iniciando nas extremidade do músculo e inserindo-se no perióstio. Fonte: Reece (2009).....	5
Figura 2: Microestrutura. Organização das camadas formadoras tendíneas. Fonte: Kannus (2000).....	6
Figura 3: Ilustração anatômica de testículo, evidenciando seus componentes anatômicos, incluindo a túnica albugínea. Fonte: KONIG, 2011.	10
Figura 4: Foto de testículo bovino no momento recente após colheita e lavagem, ainda no interior do frigorífico bovino. Fonte: Arquivo pessoal.....	14
Figura 5: Túnicas albugíneas extraídas de testículos bovinos durante o processo de limpeza. Fonte: Arquivo pessoal.....	15
Figura 6: Coleta de tecido adiposo subcutâneo em rato jovem da raça Wistar. Fonte: Arquivo pessoal.....	17
Figura 7: Tubo estéril com amostra de tecido adiposo em solução para transporte. Fonte: Arquivo pessoal.....	17
Figura 8-A: Retirada dos criotubos, com células tronco, do botijão de nitrogênio. 8-B: Procedimento de descongelamento de células em banho maria. Fonte: Arquivo pessoal.....	18
Figura 9-A: Homogeneização das células tronco com solução fisiológica com auxílio de pipeta Pasteur. 9-B: Centrifugação de células tronco. Fonte: Arquivo pessoal.....	18
Figura 10-A e B: Seringa evidenciando o volume de 0,1 ml e caixa térmica acondicionando seringas preparadas com solução. Fonte: Arquivo pessoal.....	19
Figura 11-A: Coloração da solução das células tronco com Azul de Tripán 1% na câmara de Neubauer. 11-B: Avaliação quantitativa e qualitativa das células tronco através de microscopia. 11-C: Células tronco evidenciadas na câmara de Neubauer através de microscopia. Fonte: Arquivo pessoal.....	19
Figura 12: Biotério de criação e manutenção dos ratos participantes do experimento com ambiente controlado, água e ração a vontade. Fonte: Arquivo pessoal.....	20
Figura 13-A: Incisão de pele da região caudal da tibia. 13-B: Exposição do tendão calcâneo comum para posterior tenotomia por cisalhamento transversal. Fonte: Arquivo pessoal.....	21
Figura 14-A: Tenorrafia do tendão calcâneo comum. 14-B: Tenorrafia associada à membrana biológica. Fonte: Arquivo pessoal.....	21
Figura 15: Aplicação de células tronco no local da tenorrafia. Fonte: Arquivo pessoal.....	22
Figura 16: Animal com o membro operado imobilizado. Fonte: Arquivo pessoal.....	22
Figura 17: Mensuração de espessura tendínea com auxílio de paquímetro digital. Fonte: Arquivo pessoal.....	23
Figura 18: Região caudal da tibia do membro pélvico direito, evidenciando a localização do tendão calcâneo comum. Imagem com destaque para as regiões operadas, circulares em vermelho. 18-A: Animal do GT no 14º dia pós-operatório evidenciando edema em toda extensão da região caudal da tibia. 18-B: Animal do GMB no 14º dia pós-operatório, também com a mesma característica de edema na região. 18-C: Animal do grupo GCT no 14º dia pós-operatório demonstrando um aspecto muito próximo da normalidade para a região caudal da tibia. Fonte: Arquivo pessoal.....	26
Figura 19-A/B/C: Tendões calcâneo comum de ratos wistar no 21º dia pós operatório. 19-A: Tendão de animal do GT, evidenciando um espessamento irregular desde junção miotendínea até porção final da imagem. 19-B: Tendão de animal do GMB, com espessamento tendíneo irregular e local de	

cicatrização com evidente desorganização tecidual. **19-C:** Tendão de animal do GCT demonstrando um bom padrão de cicatrização e espessura tendínea bem regular em toda sua extensão. **19-D:** Tendão de animal do GC, para ilustrar o padrão tendíneo normal. Fonte: Arquivo pessoal.....27

Figura 20: Tendão com baixa qualidade cicatricial, sem padronização tecidual e membrana biológica (seta vermelha) alterada em aspectos de coloração e consistência. Fonte: Arquivo pessoal.....28

Figura 21-A e 21-B: Fotomicrografia de lâminas coradas em HE com aumento de objetiva 10X (A) 40X (B), (C) e (D). Ilustrando o GMB ao 7º e 21º dia respectivamente pós operatório, apresentando macrófagos e neutrófilos. **21-C:** Fotomicrografia da lâmina do GT ao 7º dia com marcante característica inflamatória. **21-D:** Fotomicrografia da lâmina do GCT ao 7º dia, sem células inflamatórias e uma característica de fibrose intensa. Fonte: Arquivo pessoal.....29

Figura 22: Fotomicrografias de lâminas coradas em TM com aumento de objetiva 10X (A) e (D) 40X (B) e (C). **22-A:** GMB ao 7º dia apresentando leve intensidade de colágeno. **22-B:** GMB ao 14º dia com moderada presença de colágeno. **22-C:** GT demonstrando presença intensa de colágeno ao 21º dia. **22-D:** GCT ao 7º dia evidenciando a intensa presença de colágeno e de forma organizada. Fonte: Arquivo pessoal.....30

Figura 23: Fotomicrografia de lâminas coradas em Tricômico de Masson com aumento de objetiva 10X. Evolução cicatricial do GCT evidenciadas em lâminas coradas em TM. **23-A:** 7º dia. **23-B:** 14º dia. **23-C:** 21º dia. Fonte: Arquivo pessoal.....31

Figura 24: Fotomicrografia de lâmina corada em Tricômico de Masson com aumento de objetiva 40X. 21º dia do GT de forma comparativa ao GCT. Fonte: Arquivo pessoal.....31

Figura 25: Fotomicrografia de lâminas coradas em Pricosírus-Red com aumento de objetiva 40X (A) e (B) 10X (C) e (D). Fibras espessas e vermelhas: Colágeno tipo I. Fibras finas e amarelo esverdeadas: Colágeno tipo III. **25-A:** Lâmina do GT ao 21º dia, demonstrando uma igualdade dos tipos de colágeno. **25-B:** Lâmina do GMB ao 21º dia, com uma igualdade de tipos de colágeno. **25-C:** Lâmina do GCT ao 7º dia, evidenciando uma considerável predominância de colágeno tipo I. **25-D:** Lâmina do GCT ao 21º dia, também com maior quantidade de colágeno tipo I de forma bem modelada. Fonte: Arquivo pessoal.....33

LISTA DE ABREVIATURAS

CBB – Centro de Biociências e Biotecnologia

CTDA – Célula tronco derivada de tecido adiposo

CTE – Célula tronco embrionária

CTH – Célula tronco hematopoiética

CTM – Célula tronco mesenquimal

CTM-MO – Célula tronco mesenquimal extraído de medula óssea

HE – Hematoxilina-Eosina

HVET – Hospital Veterinário

LBR – Laboratório de Biologia do Reconhecer

LMPA – Laboratório de Morfologia e Patologia Animal

PBS – Phosphate Buffered Saline

PG – Proteoglicano

PNC – Proteína não colagênica

GC – Grupo Ratos Controle

GCT – Grupo Ratos Células Tronco

GMB – Grupo Ratos Membrana Biológica

GT – Grupo Ratos Tenotomia

MPD – Membro pélvico direito

MPE – Membro pélvico esquerdo

UENF – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

PS – Pricosirus-Red

TM – Tricômico de Masson

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 – GRUPOS EXPERIMENTAIS	20
TABELA 2 – PRESENÇA DE EDEMA E INFLAMAÇÃO TENDÍNEA.....	25
TABELA 3 – ESPESSURA TENDÍNEA (MPD / MPE) (em milímetros).....	26
TABELA 4 – FASE INFLAMATÓRIA (AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA)	29
TABELA 5 – AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA QUALITATIVA DE COLÁGENO (COLORAÇÃO PRICOSIRIUS RED)	32

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – ESPESSURA TENDÍNEA (MPD) (em milímetros)	26
--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	4
2. OBJETIVOS	4
2.1 OBJETIVO GERAL.....	4
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	4
3. REVISÃO DE LITERATURA	5
3.1 TENDÕES	5
3.1.1 ASPECTOS GERAIS.....	5
3.1.2 COMPOSIÇÃO DO TENDÃO.....	7
3.1.3 LESÃO E CICATRIZAÇÃO TENDÍNEA.....	8
3.2 ANATOMIA E HISTOLOGIA DA TÚNICA ALBUGÍNEA	9
3.3 MEMBRANA BIOLÓGICA DERIVADA DE TÚNICA ALBUGÍNEA DE BOVINO	10
3.4 CARACTERÍSTICAS E IMPORTÂNCIA DAS CÉLULAS TRONCO.....	11
4. MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1 MEMBRANA BIOLÓGICA.....	14
4.1.1 COLHEITA E PREPARAÇÃO DE TÚNICA ALBUGÍNEA TESTICULAR BOVINA 14	
4.1.2 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA.....	16
4.1.3 AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA.....	16
4.2 CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS EXTRAÍDAS DE TECIDO ADIPOSEO	16
4.3 ENSAIO IN VIVO – MODELO EXPERIMENTAL: RATOS WISTAR.....	19
4.3.1 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	20
4.3.2 ANÁLISES E AVALIAÇÕES	22
4.3.2.1 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA	22
4.3.2.2 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA.....	23
5. RESULTADOS	24
6. DISCUSSÃO	33
7. CONCLUSÃO	36
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
9. ANEXO I	43

1. INTRODUÇÃO

Os músculos e tendões têm grande importância e participação nos problemas ortopédicos dos animais domésticos. Nos equinos, lesões tendíneas ocorrem com frequência, especialmente em cavalos atletas. As lacerações de tendões se apresentam desde formas mais brandas, com mínimos sinais de dor e sem lesões cortantes até formas mais graves, gerando dor intensa e muitas vezes associadas a lesões perfuro-cortantes (CORRÊA, 2012). Na busca de melhorar e acelerar processos regenerativos, pesquisas têm sido realizadas em diferentes tecidos como a pele (KOTTON et al., 2001), osso (KOSACHENCO et al., 1998), nervos (STAINKI et al., 1995) e músculos e tendões (REDDY et al., 1998; BOTTAGISIO e LOVATI, 2017). Em especial, o estudo do reparo tendíneo vem crescendo, uma vez que a recuperação do tecido após lesão ainda é um grande desafio na prática clínica (LUCKE, 2018).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a possibilidade do uso de células tronco e membrana biológica bovina em tenorrafias na medicina veterinária.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Avaliar e selecionar método eficaz de sedação e anestesia para ratos wistar.
- Avaliação tecidual de fragmentos da túnica albugínea bovina encontradas nos 4 pólos testiculares: extremidade capitata, extremidade caudata, borda livre e borda epididimária.
- Avaliação microbiológica das túnicas albugíneas preservadas em glicerina 98%.

- Aperfeiçoar a técnica de descongelamento, preparação e avaliação de células tronco para utilização em terapias regenerativas.
- Avaliar a reação e cicatrização de tenorrafias realizadas em ratos wistar com o auxílio de membrana biológica bovina.
- Avaliar a reação e cicatrização de tenorrafias realizadas em ratos wistar com o auxílio de células tronco.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 TENDÕES

3.1.1 ASPECTOS GERAIS

O tendão é uma estrutura constituída de tecido conjuntivo, dando característica fibrosa, grossa, forte e flexível, coloração esbranquiçada e está presente em diversos locais do corpo do animal, nas extremidades dos músculos e se inserindo no perióstio (Figura 1). Por isso, tem a função de manter o equilíbrio estático e dinâmico do corpo através da transmissão da força muscular aos ossos e articulações, permitindo dessa forma a locomoção. (CORRÊA, 2012).

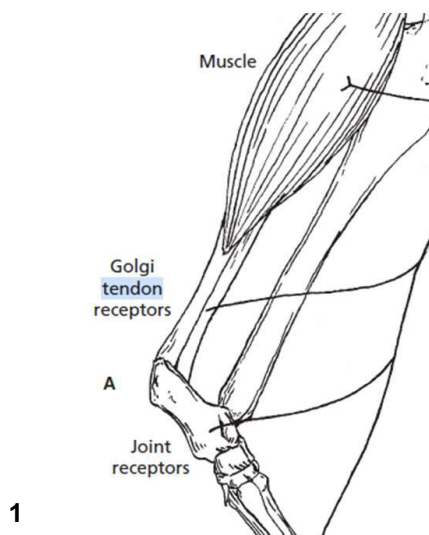


Figura 1: Imagem ilustrativa de membro pélvico de cão, demonstrando a localização do tendão, iniciando nas extremidade do músculo e inserindo-se no perióstio. Fonte: Reece (2009).

Primeiramente, a formação tendínea começa com o tropocolágeno (uma cadeia polipeptídica em tripla hélice), o qual se une em fibrilas, fibras

(feixes primários), fascículos (feixes secundários), feixes de fascículos (feixes terciários) formando o tendão propriamente dito (Sharma e Maffulli, 2006) (Figura 2).

Ainda existem os tenoblastos, que ficam orientados em longas fileiras paralelas nos espaços entre os feixes de colágeno e tem como função renovar fibras degradadas e colágeno, mantendo a característica do tendão como estrutura dinâmica (CORRÊA, 2012). Cada fibra tendínea é envolvida por uma malha reticular fina de tecido conjuntivo, chamado de endotendão. Já o tendão como um todo é revestido pelo epitendão (bainha fina de tecido conjuntivo frouxo), a qual contém artérias, veias, vasos linfáticos e nervos que suprem o tendão (Figura 2). O epitendão é revestido superficialmente pelo paratendão, formado de tecido conjuntivo frouxo constituído de fibras de colágeno do tipo I e III, fibras elásticas, proteoglicanos, glicoproteínas, células sinoviais, íons e água. O epitendão e o paratendão compõem o chamado peritendão, responsável por reduzir o atrito com o tecido adjacente. O espaço entre essas duas camadas contém líquido rico em mucopolissacarídeos que fornece a lubrificação, evita a fricção e protege o tendão reduzindo o atrito (ALMEIDA, 2015; JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2004). Receptores de Golgi, que são encontrados nos tendões, são responsáveis por avaliar a tensão no tendão e transmitir essa informação ao sistema nervoso central (CORRÊA, 2012) (Figura 1).

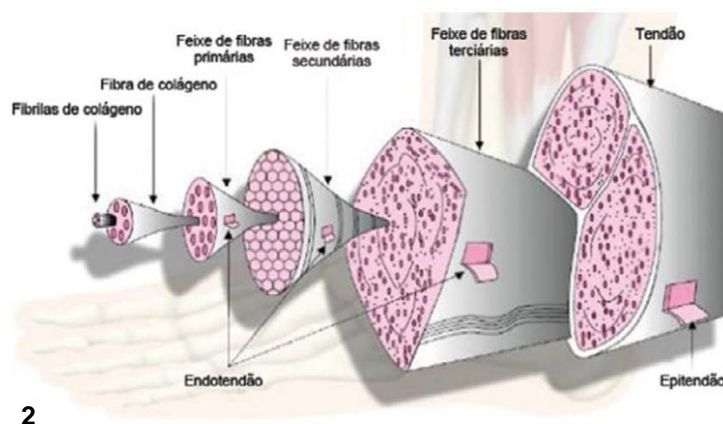


Figura 2: Microestrutura. Organização das camadas formadoras tendíneas. Fonte: Kannus (2000)

3.1.2 COMPOSIÇÃO DO TENDÃO

O tendão é constituído de colágeno, proteoglicanos, proteínas não colagênicas (PNCs), células e água. O colágeno é encontrado em grande quantidade nos tendões, sendo o colágeno tipo I, o componente mais abundante, chegando a corresponder cerca de 60% da massa seca do tendão e cerca de 95% do colágeno total. Os 5% restantes correspondem aos colágenos tipo III e V. O colágeno tipo III está localizado principalmente no endotendão e epitendão, formando fibrilas pequenas e menos organizadas. O colágeno tipo V é intercalado dentro da estrutura das fibrilas do colágeno tipo I e regula o crescimento da fibrila (ALMEIDA, 2015). Outros colágenos incluindo os tipos II, VI, IX, X e XI, estão presentes em quantidades vestigiais nos tendões. Esses colágenos são encontrados principalmente no local de inserção óssea de fibrocartilagem, onde eles reforçam a conexão através da redução da concentração de tensões na interface tecidual (FUKUTA et al, 1998).

Além dos colágenos, temos as PNCs que são glicoproteínas, tais como os proteoglicanos (PGs), proteínas matricelulares e as fibras elásticas. Os PGs desempenham diversas funções, como participação na regulação da formação de fibrilas, de colágeno, influenciando diretamente na modulação da força do tendão, os PGs constituem o tendão nos locais onde este sofre tensão (ALMEIDA, 2015). Ainda existe a proteína oligomérica da matriz de cartilagem, que é uma glicoproteína não colagenosa componente da matriz extracelular tendínea (STASHAK, 2006). As proteínas matricelulares participam tanto na manutenção da estrutura normal dos tendões, quanto durante seu processo de cicatrização. Como exemplo, temos a tenomodulin, a qual tem funções de proliferação de tenócitos e envolvida também no alinhamento e organização das fibrilas de colágeno. Já a tenascina-C está aumentada em regiões de lesão e tem função na orientação e alinhamento da fibra de colágeno. Finalizando esse grupo de PNCs, temos as fibras elásticas, as quais são compreendidas em elastinas e as proteínas microfibrilares, representando cerca de 2% do peso seco do tendão. E ambas contribuem para a recuperação da configuração ondulada das fibras colágenas após um alongamento (ALMEIDA, 2015).

3.1.3 LESÃO E CICATRIZAÇÃO TENDÍNEA

Conformação do animal, idade, rotina de treinamento e até mesmo tipo de ferradura, são fatores externos que podem influenciar nas lesões tendíneas. No caso de lacerações ou rompimentos, podemos adicionar os traumas nessa lista.

Na ortopedia equina subdividiram-se as rupturas tendíneas em três categorias. A ruptura traumática, onde é causada pelo excesso de esforço no movimento. A ruptura degenerativa, a qual é uma lesão caracterizada pelo tendão fragilizado por lesões anteriores como por exemplo a tenossinovite séptica. E secção tendínea, que são traumas provocados por fatores externos, muita das vezes por objetos causando feridas abertas (STASHAK, 2006).

Na resposta ao trauma, o tendão tende a sofrer aderência, pois a ferida que envolve diferentes tecidos cicatriza como uma unidade, ou seja, “uma ferida, uma cicatriz” (PEACOCK e Van WINKLE, 1976).

O processo de reparo do tendão ocorre em três fases que se sobrepõem: Inflamatória, proliferativa e remodelamento (ALMEIDA, 2015).

Logo após a lesão a sequência inflamatória estende-se por três a sete dias, caracterizada pelas alterações nas células endoteliais provenientes da lesão de vasos sanguíneos, e ativação de plaquetas que sofrem degranulação e secretam múltiplos mediadores, formando coágulos. Os mediadores liberados formam um gradiente quimiotático que orienta o recrutamento e a migração das células inflamatórias, sendo que monócitos e macrófagos predominam nas primeiras 24 horas e são responsáveis pela fagocitose do material necrosado. Outras células também envolvidas na instalação da inflamação são recrutadas, principalmente os neutrófilos. Ao final dessa fase ocorre ainda, o início da angiogênese, estimulação da proliferação de tenócitos, o início da produção de colágeno III e também a expressão de citocinas responsáveis por ativar vias anti-inflamatórias como a desativação de macrófagos e células natural killer (LUCKE, 2018; CLUTTERBUCK et al., 2010; MORITA et al., 2017).

Durante a segunda semana (8º dia até 14º dia), a chamada fase proliferativa, continua uma dramática proliferação fibroblástica e produção de

colágeno (matriz extracelular) e angiogênese (tecido de granulação). Essa fase é a responsável pelo fechamento da lesão propriamente dita. Ainda ocorre o pico da produção de colágeno III, iniciando a organização dos feixes desta fibra. (SHARMA e MAFFULLI, 2005).

A partir do 14º dia até o 21º dia, inicia-se a terceira e última fase do processo de cicatrização, o remodelamento, a qual pode durar até 1 ano após a lesão (ABATE et al, 2009). O crescimento e migração de fibroblastos e as fibras colágenas entre os cotos tendíneos são orientadas perpendiculares ao eixo de tensão longitudinal. Os tenócitos e as fibras de colágeno se alinham, tornando-se o colágeno o principal componente da matriz extracelular. Nesta fase ocorre acentuada mudança da proporção do tipo de colágeno, onde o colágeno III vai sendo degradado enquanto grande quantidade de colágeno I é sintetizada pelos tenócitos. A reação vascular também alcança seu pico durante esse período (LUCKE, 2018; RAISER, 2001).

3.2 ANATOMIA E HISTOLOGIA DA TÚNICA ALBUGÍNEA

Os testículos são envolvidos por uma grossa cápsula de tecido conjuntivo denso, a túnica albugínea que, por sua vez, além de ser constituída por tecido conjuntivo é bem vascularizada (Figura 3). O tecido conjuntivo denso é adaptado para fornecer resistência e proteção aos tecidos. Sua composição é semelhante ao tecido conjuntivo frouxo, porém existem menos células e uma prevalência de fibras colágenas, com isso dando menos flexibilidade e mais resistência em comparação ao tecido conjuntivo frouxo (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

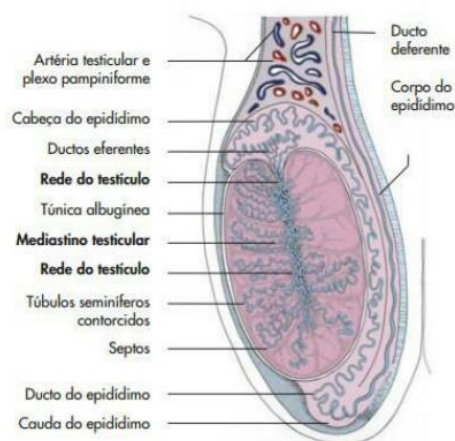


Figura 3: Ilustração anatômica de testículo, evidenciando seus componentes anatômicos, incluindo a túnica albugínea Fonte: KONIG, 2011.

A túnica albugínea é a membrana que está intimamente ligada ao testículo e sendo assim, seguindo a anatomia, a túnica contém 4 regiões, sendo elas: Borda livre, borda epididimária, extremidade capitata e extremidade caudata. Borda livre é onde não há nenhum tipo de estrutura anexa ou próxima. Já a borda epididimária, como sugere o seu nome, é a borda onde o testículo e conseqüentemente a túnica albugínea está em íntimo contato com o epidídimo. A extremidade capitata é a região onde fica em contato com a cabeça do epidídimo e a extremidade caudata é a região onde fica em contato com a cauda do epidídimo e seu ligamento (KONIG, 2011).

3.3 MEMBRANA BIOLÓGICA DERIVADA DE TÚNICA ALBUGÍNEA DE BOVINO

Enxertos e implantes podem ser utilizados como material reparador de perda tecidual. O enxerto é um transplante cujas células mantenham viabilidade vital no hospedeiro, diferentemente do implante, que é o transplante cujas células sem viabilidade são substituídas ou incorporadas por tecidos do receptor (QUEIROZ et al., 2012; SALBEGO, 2010). São classificados segundo o seu local de origem, podendo ser heterólogo, homólogo e autólogo. Os implantes podem ser chamados de biomateriais e o colágeno é o de origem natural mais amplamente utilizado devido a algumas

características bem conhecidas como a biocompatibilidade, quimiotaxia para fibroblastos, ativação e atração de neutrófilos e a ampla disponibilidade (GASQUE et al., 2008).

Os testículos, de maneira geral, têm uma cápsula fina de tecido conjuntivo denominada de túnica albugínea, a qual não apresenta muita diferença em sua arquitetura histológica e anatomia dentre as espécies animais domésticos. É composta por tecido conjuntivo denso, caracterizada por uma maior quantidade de fibras colágenas e um menor número de células, comparado com o tecido conjuntivo frouxo. Além dessas características, a túnica albugínea bovina é um material destinado à graxaria em frigoríficos abatedouros, por tanto é um material de custo extremamente baixo e fácil de adquirir (QUEIROZ et al., 2012).

Para a conservação de qualquer material biológico para implante, existe a necessidade de um meio de conservação (QUEIROZ et al., 2012). A glicerina 98% tem sido o meio amplamente divulgado como forma de preservação, devido a suas vantagens como a capacidade de desidratação do material, poder antisséptico, pouca toxicidade em concentrações baixas e o custo baixo (RODASKI et al., 2000; MARQUES et al., 2015). Além disso, aumenta a resistência à tração sem alterar o grau de elasticidade, reduz a antigenicidade, possibilita a manutenção do enxerto em temperatura ambiente e tem baixo custo (OLIVEIRA et al., 2009).

3.4 CARACTERÍSTICAS E IMPORTÂNCIA DAS CÉLULAS TRONCO

Nos últimos anos, pesquisas estão demonstrando que a longevidade de animais de companhia está diretamente relacionada à melhoria da qualidade de vida (BARBOSA, 2015). Para continuar mantendo a qualidade de vida dos animais, novas linhas terapêuticas estão sendo introduzidas no mercado veterinário como a nutrição, fisioterapia, acupuntura, ozonioterapia e homeopatia (BARBOSA, 2015; MATHIE et al., 2010; BUDGIN e FLAHERTY, 2013).

As células tronco constituem uma população de células indiferenciadas com características únicas de auto renovação e plasticidade. Essas células

estão presentes em todos os tecidos ao longo da vida e estão envolvidas nos processos de embriogênese e regeneração (LUCKE, 2018). Fundamentalmente existem dois tipos de células tronco: a célula tronco embrionária (CTE) que é oriunda da massa interna do blastocisto e a célula tronco adulta a qual é dividida em célula tronco mesenquimal (CTM) e célula tronco hematopoiética (CTH).

As CTEs são capazes de se transformar em qualquer tipo de célula e por consequência em um organismo inteiro. Porém apresentam riscos relacionados tanto a rejeição imunológica como a formação de tumores, além do fato de sua obtenção ter a necessidade da destruição de um blastocisto, podendo ser interpretado como uma violação dos princípios éticos (SANTOS, 2017). Fato esse que não ocorre com a célula tronco adulta, também chamada de multipotentes e pluripotentes, pois é obtida a partir de tecidos que constituem o organismo adulto plenamente desenvolvido, como na medula óssea, sangue, fígado, cordão umbilical, placenta, tecido muscular, tecido adiposo, entre outros.

As CTHs foram as primeiras células tronco descritas, identificadas por Till e McCulloch há mais de 40 anos. Como característica principal, o potencial de dar origem a diversos tipos de células do sangue, tanto as de origem mielóide (macrófago e monócito) como as de origem linfóide (linfócitos B e T) (MARTINS, 2019). Dessa forma, as CTHs são responsáveis pela manutenção do sistema hematopoiético durante a vida do organismo (SANTOS, 2017).

Já as CTMs têm capacidade de se diferenciar em linhagens de tecidos mesodérmicos, como o músculo esquelético, ossos, tendões, cartilagem e gordura, quando em condições de cultivo adequado (GONDA et al., 2008). As CTMs têm diversas propriedades que sugerem alta capacidade na terapia celular em inúmeras patologias. Modulação do sistema imunológico do animal receptor, se diferenciar em osteoblastos, fibroblastos, miócitos, tenócitos, osteócitos e adipócitos, além da capacidade de promover a neovascularização e diminuição da produção de células e citocinas pró-inflamatórias, promovendo o processo de reparação tecidual e remodelamento (SANTOS, 2017; PERONI et al., 2011; MAXSON et al., 2012; SCHIPPER et al. 2008). Além dessas características, uma das que mais

chama a atenção e tornam as células tronco muito atrativas para o combate de diversas patologias é o fato de CTMs possuírem um comportamento migratório, sendo a base para as células tronco atingirem os locais enfermos após administração intravenosa, intralesional ou perilesional. As citocinas liberadas nos sítios de inflamação ou lesão geram a sinalização química orientando a migração das células (MAIA, 2012).

Em relação as suas fontes de colheita, os primeiros estudos com células troncos adultas, se iniciaram com células-tronco mesenquimais de medula óssea (CTM-MO) (MARTINS, 2019). Atualmente têm sido obtidas a partir de inúmeras fontes teciduais, porém dentre estas, visando sua utilização terapêutica na medicina veterinária, o tecido adiposo, o cordão umbilical assim como o sangue do mesmo, são as fontes utilizadas de forma mais frequente (SANTOS, 2017). Porém, tendo em vista o procedimento cirúrgico simples, o fácil acesso e os simples procedimentos de isolamento com base em enzimas de digestão tecidual tornaram o tecido adiposo subcutâneo uma atraente fonte para obtenção de CTM para os pesquisadores e clínicos de quase todas as áreas da medicina e medicina veterinária (MARTINS, 2019; SANTOS, 2017). As células tronco derivadas de tecido adiposo (CTDA), em uma análise comparativa com as CTM obtidas da medula óssea, o tecido adiposo mostrou que CTDA não são diferentes em relação a sua morfologia, imunofenótipo, frequência na formação de colônias, plasticidade, podem render 500 vezes mais células a partir da mesma quantidade de tecido e são geneticamente mais estáveis em culturas a longo prazo (MIZUNO, 2009). Em um estudo realizado, as CTDA corresponderam cerca de 2% de todo total do lipoaspirado (KINGHAM et al., 2007), enquanto a medula óssea apresenta entre 0,001 a 0,01% de CTM do total extraído (MIAO et al., 2006). E essa informação é de extrema importância, pois lesões em tecidos como ossos e tendões requerem grandes quantidades celulares para alcançar a eficácia terapêutica, principalmente na medicina equina (BRAVO et al., 2012). Além disso, outra vantagem das CTDA é que após serem isoladas, podem ser crio-preservadas por até 6 meses mantendo suas características (MARTINS, 2019).

Na medicina humana, as CTM já vêm sendo utilizadas há algum tempo no reparo de tendões (GOMIERO, 2016; LUCKE 2018). Na medicina veterinária, já há relatos de utilização terapêutica em muitas áreas, como em osteoartrites (BURKE et al., 2016; AFIZAH e HIU, 2016), tendinites (LEPPANEN et al., 2009; BREHM et al., 2012), não união óssea (CHEN et al., 2003; ZAMPROGNO, 2007), lesões medulares (PENHA et al., 2014; SARMENTO et al., 2014), úlcera de córnea (TAKÁCS et al., 2009), ceratoconjutivite seca (VILLATORO et al., 2015), doença renal (QUINBY et al., 2016), dermatologia (HARMAN, 2013), doença inflamatória intestinal (PEREZ-MERINO et al., 2016; WEBB et al., 2015) e cardiomiopatia (POGUE et al., 2013). Com isso, podemos demonstrar a eficácia e segurança do uso de células tronco em novas terapias na medicina veterinária.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MEMBRANA BIOLÓGICA

4.1.1 COLHEITA E PREPARAÇÃO DE TÚNICA ALBUGÍNEA TESTICULAR BOVINA

Foram coletadas 10 túnicas albugíneas de bovinos provenientes de frigorífico abatedouro na região Norte Fluminense do estado do Rio de Janeiro (Figura 4). Todos os animais abatidos foram examinados e com atestado de sanidade e livres de qualquer tipo de patologia ante e post mortem. Embora não seja necessária uma técnica estéril para a colheita, estas se deram com o maior controle de higiene possível.



Figura 4: Foto de testículo bovino no momento recente após colheita e lavagem, ainda no interior do frigorífico bovino. Fonte: Arquivo pessoal.

Logo após a retirada do trato reprodutivo, os testículos foram segregados e a túnica albugínea cuidadosamente dissecada do parênquima testicular. Em seguida foram acondicionadas em caixa térmica para transporte até o Setor de Anatomia Animal do Laboratório de Morfologia e Patologia Animal (LMPA) no Hospital Veterinário da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (HVET UENF). No setor, primeiramente, as túnicas albugíneas passaram por uma debridaç o a fim de evitar excessos de tecidos indesejáveis e resquícios de tecido adiposo. Após essa limpeza as t nicas foram suavemente lavadas em água corrente, em um recipiente e cobertos por uma compressa, por 2 horas com o objetivo de retirar o máximo de tecido sanguíneo, deixando-a com o aspecto claro (Figura 5). Em seguida foram retiradas da água e submersas em soluço fisiológica 0,9% por aproximadamente 3 horas para reidrat -las.

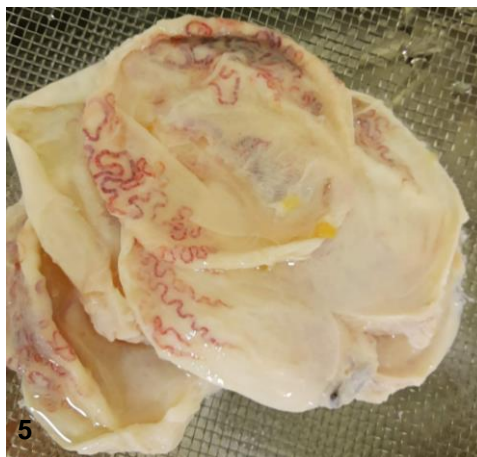


Figura 5: T nicas albugíneas extraídas de testículos bovinos durante o processo de limpeza. Fonte: Arquivo pessoal.

Para análise histológica, 2 t nicas foram selecionadas ao acaso e foram colhidos 4 fragmentos 4 cm² de cada uma delas, sendo eles; 1 fragmento da extremidade capitata, 1 fragmento da extremidade caudata, 1 fragmento borda livre e 1 fragmento da borda epididimária. Em seguida sendo fixados em formalina neutra tamponada   10%. Concomitantemente, foi realizada uma sele o das t nicas restantes e as 4 que apresentaram melhores condi es macroscópicas foram submersas em soluço de glicerina

98%, coberta com gaze ou compressa para manter a submersão na proporção de 10:1, ou seja, 10 vezes o volume da membrana para 1 de glicerina. As membranas se tornaram disponíveis para uso após um tempo mínimo de 30 dias, preservadas.

4.1.2 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

No setor de Patologia Animal (LMPA-HVET-UENF) foram realizadas as análises e avaliações histológicas. Fragmentos de túnica albugínea foram colhidos em dois momentos do processo de preparação, sendo eles: logo após a debridaçãõ e reidratação e após 30 dias preservada.

Após a fixaçãõ das amostras em formol tamponado neutro a 10% e identificaçãõ das mesmas, foi realizado todo processo histotécnico de rotina e em seguida a coloraçãõ pelo método de Hematoxilina-Eosina (HE).

4.1.3 AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA

Após o período mínimo de preservaçãõ em glicerina, foram coletados 4 fragmentos das membranas biológicas, e submetidos a uma análise microbiológica, no laboratório de bacteriologia da UENF. Esta avaliaçãõ teve por objetivo testar a eficácia da técnica de preservaçãõ das membranas em relaçãõ à contaminaçãõ por bactérias e fungos.

4.2 CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS EXTRAÍDAS DE TECIDO ADIPOSE

As células tronco mesenquimais foram derivadas de tecido adiposo de 3 ratos jovens. Os animais foram eutanasiados por aprofundamento de anestésicos (xilazina 2% e cetamina 10%), conforme uma das indicações para pequenos roedores de laboratório (LUCKE, 2018). Em seguida foi realizada uma incisãõ do tecido cutâneo e subcutâneo na regiãõ inguinal, tendo acesso ao tecido adiposo (Figura 6). O tecido foi extraído, cortado em pequenos pedaços e amostras do tecido com vasos sanguíneos foram

descartados para evitar contaminação. As amostras foram colocadas em 3 tubos falcon estéreis e adição de 4% de penicilina e estreptomicina em solução PBS(Tampão fosfato-salino ou phosphate buffered saline) (Figura 7). Logo após o procedimento os tubos foram acondicionados em caixa térmica com gelo e transportados até o CELLTROVET, laboratório de preparação e cultura de células tronco, localizado na cidade de São Paulo – SP. O laboratório enviou as células tronco congeladas em criotubos, onde cada criotubo continha 3 milhões de células.

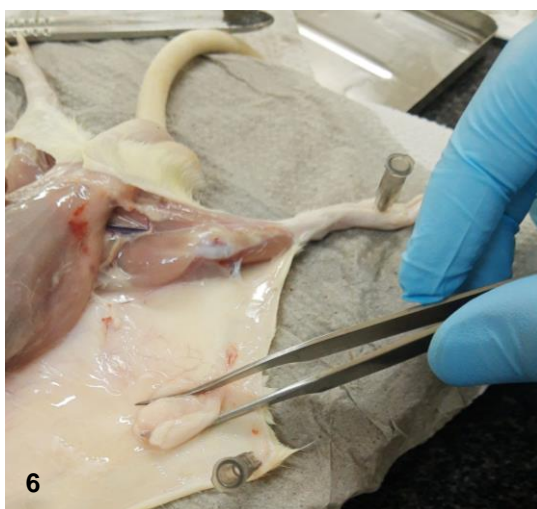


Figura 6: Coleta de tecido adiposo subcutâneo em rato jovem da raça Wistar. Fonte: Arquivo pessoal.

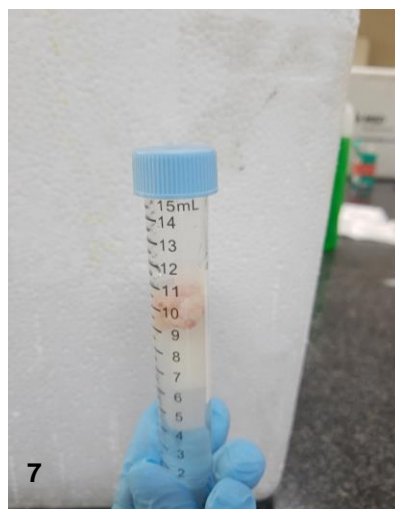


Figura 7: Tubo estéril com amostra de tecido adiposo em solução para transporte. Fonte: Arquivo pessoal.

No Laboratório de Biologia do Reconhecer (LBR) do Centro de Ciências Biológicas (CBB) da UENF, foi realizado o processo de descongelamento e preparação para uso das células. Primeiramente, após a retirada do criotubo do botijão de nitrogênio, colocou-se em água destilada em “Banho Maria” até que todo conteúdo do criotubo estivesse líquido, sendo o tempo estimado em média 5 minutos (Figura 8). Após a retirada do “Banho Maria” borrifou-se álcool 70° no criotubo e foi levado a capela de fluxo, onde com auxílio de uma pipeta Pauster retirou-se todo o líquido do tubo criogênico e transferiu para um tubo cônico estéril que em seguida também foi adicionado lentamente solução fisiológica na proporção de 1:1, homogeneizando-se com cautela. Após o fechamento, o tubo cônico estéril foi levado à centrifuga por 5 minutos a 1500 rpm, sendo assim as células se

sedimentaram no fundo do tubo e descartou-se o sobrenadante com auxílio de pipeta Pasteur (Figura 9).

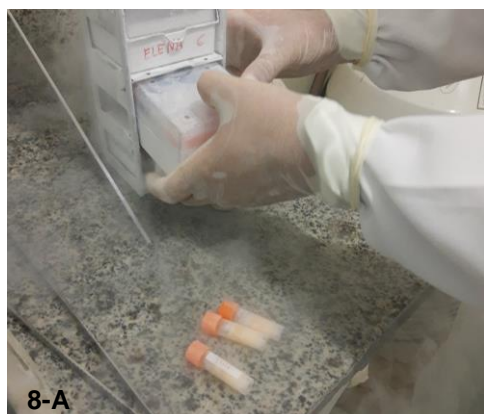


Figura 8-A: Retirada dos criotubos, com células tronco, do botijão de nitrogênio. **8-B:** Procedimento de descongelamento de células em banho maria. Fonte: Arquivo pessoal.



Figura 9-A: Homogeneização das células tronco com solução fisiológica com auxílio de pipeta Pasteur. **9-B:** Centrifugação de células tronco. Fonte: Arquivo pessoal.

Em seguida foi adicionado lentamente 3 ml de solução fisiológica ressuspensando as células, para novamente realizar centrifugação por 5 minutos a 1500 rpm. Esse procedimento foi realizado 3 vezes no total. Por fim as células foram ressuspensas em volume final desejado, de acordo com que cada 0,1 ml de solução contivesse no mínimo 500 mil células tronco viáveis (Figura 10). Para confirmação do sucesso da técnica após toda preparação, 1 alíquota de solução preparada foi corada com Azul de Tripán 1% para teste de quantificação e viabilidade celular. Onde essa alíquota corada na câmara de Neubauer, foi observada em microscópio para realizar contagem de células viáveis (Figura 11).

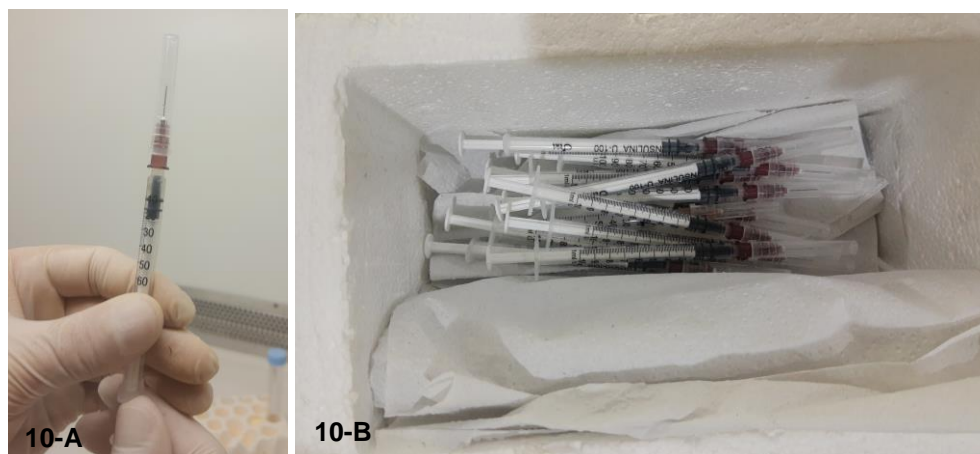


Figura 10-A e B: Seringa evidenciando o volume de 0,1 ml e caixa térmica acondicionando seringas preparadas com solução. Fonte: Arquivo pessoal.

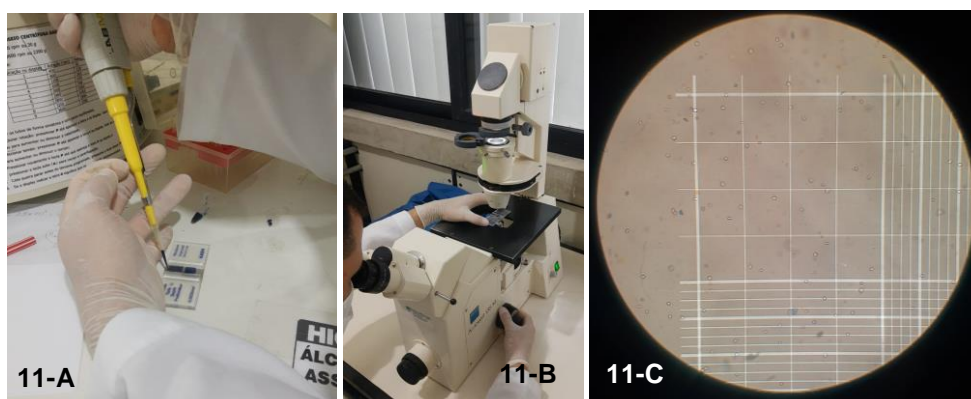


Figura 11-A: Coloração da solução das células tronco com Azul de Tripán 1% na câmara de Neubauer. **11-B:** Avaliação quantitativa e qualitativa das células tronco através de microscopia. **11-C:** Células tronco evidenciadas na câmara de Neubauer através de microscopia. Fonte: Arquivo pessoal.

4.3 ENSAIO IN VIVO – MODELO EXPERIMENTAL: RATOS WISTAR

Foram utilizados 31 ratos da raça Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), a partir de 3 meses de idade, atingindo a fase adulta, entre 350 e 450g. Todos foram pesados, identificados e permaneceram individualmente em gaiolas padrão de polipropileno no biotério do Setor de Anatomia Animal (LMPA-HVET-UENF), mantidos sob temperatura ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade relativa do ar ($55\% \pm 5\%$) controladas e fotoperíodo de 12/12 horas, recebendo ração balanceada e água a vontade (Figura 12). Os ratos foram separados aleatoriamente em 4 grupos, sendo o primeiro o grupo controle(GC)(n=4), o qual não sofreu nenhum tipo de procedimento, porém passou por todos os

exames e análises. O segundo grupo(GT)(n=9) passou pelo procedimento de tenorrafia simples, o terceiro foi o grupo onde o procedimento de tenorrafia teve a associação da membrana biológica(GMB)(n=9) e o quarto grupo(GCT)(n=9) houve a aplicação de células tronco no foco da tenorrafia (TABELA 1).



Figura 12: Biotério de criação e manutenção dos ratos participantes do experimento com ambiente controlado, água e ração a vontade. Fonte: Arquivo pessoal.

TABELA 1 – GRUPOS EXPERIMENTAIS

	GRUPO	Nº DE ANIMAIS	PROCEDIMENTO REALIZADO
1	GC	4	Grupo controle
2	GT	9	Grupo tenorrafia
3	GMB	9	Grupo tenorrafia + membrana biológica
4	GCT	9	Grupo tenorrafia + célula tronco

4.3.1 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Os animais foram inicialmente pesados e anestesiados com Cloridrato de Cetamina a 10% (75 mg/kg) e Cloridrato de Xilazina a 2% (4 mg/kg) com aplicação intraperitoneal. E para associação analgésica também foi utilizada a Morfina 1% (3 mg/kg) também por via intraperitoneal. Essa última, por sua vez, seguiu sendo realizada a cada 4 horas no pós-operatório por via subcutânea durante as primeiras 24 horas pós cirúrgicas. A pele sobre a região caudal da tíbia do membro pélvico direito (MPD), no local correspondente ao tendão calcâneo, foi tricotomizada manualmente. Após

asepsia local (álcool iodado), realizou-se uma incisão longitudinal na pele sobre o local correspondente a tenotomia, entre a inserção calcanear e a junção miotendínea, onde foi realizada a tenotomia total por cisalhamento transversal, utilizando lâmina de bisturi número 12 (Figura 13).

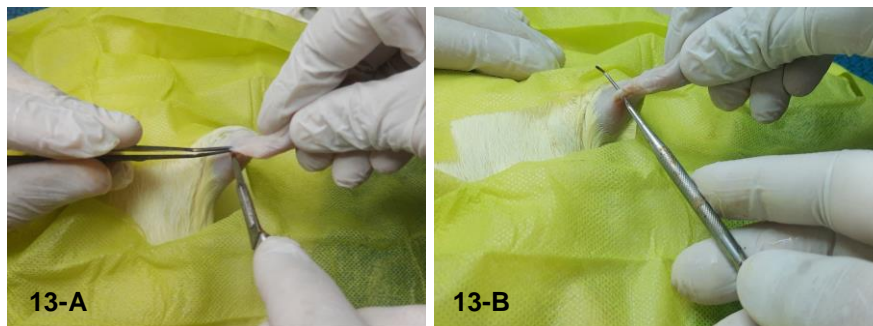


Figura 13-A: Incisão de pele da região caudal da tíbia. **13-B:** Exposição do tendão calcâneo comum para posterior tenotomia por cisalhamento transversal. Fonte: Arquivo pessoal.

O procedimento nos animais do grupo GT serviu de controle, sendo uma tenotomia completa seguida de tenorrafia com fio 5.0 poliglactina 910 monofilamentado permitindo a aproximação dos cotos tendíneos. Já no grupo GMB a tenorrafia foi associada ao uso de um fragmento de membrana biológica, no padrão de 3 mm x 5 mm. (Figura 14) e no grupo GCT ocorreu a aplicação de 500 mil células tronco no local da tenorrafia (Figura 15). A seguir, a pele foi suturada com fio 5.0 nylon não absorvível e submetida à limpeza local (com álcool iodado), e em seguida imobilização do membro com algodão ortopédico e bandagem elástica (Figura 16). No pós-operatório imediato, os animais receberam cetoprofeno 10% (3 mg/kg^{-1} SC, SID) durante três dias seguidos. A avaliação de cada indivíduo foi monitorada nas primeiras 12 horas de pós cirúrgico e em seguida diariamente.

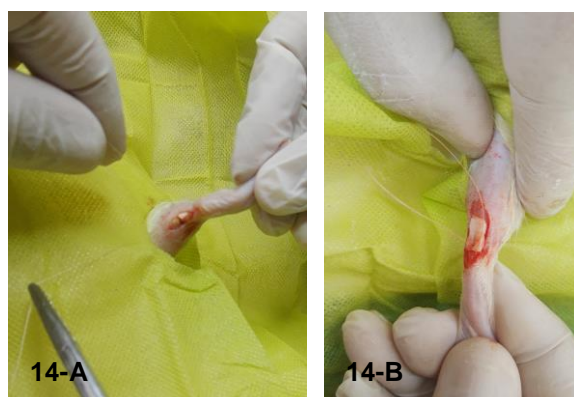


Figura 14-A: Tenorrafia do tendão calcâneo comum. **14-B:** Tenorrafia associada à membrana biológica. Fonte: Arquivo pessoal.



Figura 15: Aplicação de células tronco no local da tenorrafia.
Figura 16: Animal com o membro pélvico direito (operado) imobilizado. Fonte: Arquivo pessoal.

4.3.2 ANÁLISES E AVALIAÇÕES

Foram realizadas análises e avaliações dos tendões dos ratos de todos os grupos. Após a realização do procedimento, os animais foram selecionados de forma aleatória para serem eutanasiados e passarem por avaliações macro e microscópicas. As eutanásias se deram em três momentos, sendo em cada um com um animal do grupo GC e três animais de cada grupo de tratamento, sendo eles GT, GMB e GCT. O primeiro momento, foi onde os animais foram eutanasiados 7 dias após o procedimento. O segundo foi o momento onde os animais estavam completando 14 dias de pós-cirúrgico e por fim com 21 dias de pós-cirúrgico. Esses tempos de eutanásia eleitos correspondem aos tempos de regeneração tecidual do tendão, nas suas respectivas fases inflamatória, proliferativa e de remodelamento (CLUTTERBUCK et al., 2010; MORITA et al., 2017; LUCKE, 2018; RAISER, 2001).

4.3.2.1 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA

As eutanásias foram realizadas pelo aprofundamento de anestésicos (xilazina 2% e cetamina 10%), conforme o protocolo de Lucke, 2018. Após as eutanásias, foram realizadas as avaliações macroscópicas, seguindo os parâmetros: presença e coloração da membrana biológica, consistência,

edema, presença de vascularização, infecção da ferida operatória, deiscência de pontos, inflamação tendínea e formação de aderências. Além desses parâmetros, também foi realizada uma mensuração de espessura tendínea em cada tendão operado e não operado (Figura 17). Todas essas avaliações foram realizadas de forma padrão e anotadas em fichas individuais, para cada animal.



Figura 17: Mensuração de espessura tendínea com auxílio de paquímetro digital. Fonte: Arquivo pessoal.

4.3.2.2 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

As avaliações microscópicas foram realizadas após a colheita da ferida cirúrgica, onde o tendão calcâneo foi dissecado, desde sua origem miotendínea até sua inserção na tuberosidade do calcâneo e, em seguida, fixados em solução aquosa de formalina neutra tamponada à 10%. Após toda preparação histotécnica, que foi realizada no setor de Patologia Animal (LMPA-HVET-UENF), as lâminas foram coradas com Hematoxilina Eosina (HE), Picrosirius-Red (PS) e Tricrômico de Masson (TM) e examinadas por microscopia de luz. A técnica em HE teve por objetivo avaliar a reação inflamatória, como a presença de macrófagos, fibrina, neutrófilos, tecido de granulação, fibrose e presença da membrana biológica. A técnica em PS objetivou-se uma análise qualitativa das fibras colágenas do tecido conjuntivo, através da diferente interferência de cores, intensidade e birrefringência dos

tecidos corados, diferenciando principalmente as fibras tipo I e tipo III. As fibras tipo I apresentam-se como fibras espessas, altamente birrefringentes e na cor vermelha, enquanto que as fibras tipo III se apresentam em feixes finos, com fraca birrefringência e na cor amarelo-esverdeado. Já a técnica de Tricrômico de Masson objetivou-se fazer uma análise quantitativamente das fibras colágenas do tecido conjuntivo, conferindo a coloração azul a todas estas fibras, porém não permitindo a diferenciação entre os tipos I e III.

5. RESULTADOS

Em relação às análises da túnica albugínea, os fragmentos coletados antes do processamento para preservação em glicerina, não apresentaram diferença histológica em suas composições nas distintas regiões coletadas, sendo elas; extremidade capitata; extremidade caudata; borda livre e borda epididimária. Onde basicamente, todas essas regiões caracterizaram-se por serem constituídas de tecido conjuntivo frouxo e denso, além de vasos sanguíneos. Também foi coletado um fragmento de forma estéril, porém após o tempo mínimo de preservação em glicerina, onde foi realizado exame microbiológico. E não houve crescimento de bactérias ou fungos no fragmento, demonstrando que a técnica realizada de forma limpa e segura, para a preservação da membrana biológica.

Nos resultados dos grupos experimentais, tivemos as análises macroscópicas, onde foi possível observar uma diferença significativa de padrão de cicatrização entre os grupos, onde o grupo GCT demonstrou ter uma cicatrização muito mais eficiente e organizada. Essa conclusão se responde através de alguns parâmetros que possibilitaram realizar a comparação entre os grupos experimentais. O grupo GT e GMB apresentaram edema na região do membro operado até os 21º dia de pós operatório, já o GCT desde o 7º dia de pós operatório não foi observado sinais de edema no membro operado (Tabela 2) (Figura 18).

TABELA 2 – PRESENÇA DE EDEMA E INFLAMAÇÃO TENDÍNEA

GRUPO TENOTOMIA			GRUPO MEMBRANA BIOLÓGICA			GRUPO CÉLULA TRONCO		
Tempo de eutanásia	Edema	Inflamação tendínea	Tempo de eutanásia	Edema	Inflamação tendínea	Tempo de eutanásia	Edema	Inflamação tendínea
7 DIAS	Sim	Sim	7 DIAS	Sim	Sim	7 DIAS	Não	Sim
14 DIAS	Sim	Sim	14 DIAS	Sim	Sim	14 DIAS	Não	Não
21 DIAS	Sim	Não	21 DIAS	Sim	Sim	21 DIAS	Não	Não

Outro parâmetro avaliado foi a inflamação tendínea, onde todos os grupos experimentais, apresentaram inflamação tendínea ao 7º dia de pós operatório, sendo o GCT o que apresentou de forma mais branda e a partir do 14º dia de pós operatório não apresentava mais a inflamação. O GT demonstrou a inflamação até o 14º dia e GMB evidenciou a inflamação tendínea em todos os momentos avaliados, ou seja, até o 21º dia de pós operatório (TABELA 2) (Figura 19).

Esse parâmetro também pôde ser avaliado e comparado através da mensuração dos tendões após a necropsia com o auxílio do paquímetro digital. Essa mensuração foi realizada de 2 formas, sendo a primeira comparando os dois membros do mesmo animal, membro pélvico direito (operado) e membro pélvico esquerdo (não operado) (Tabela 3). E a segunda forma de avaliação foi comparando os membros operados (MPD) de todos os grupos, incluindo o GC, o qual não sofreu procedimento cirúrgico. Onde fica bem claro que o GCT demonstra ter uma maior qualidade de cicatrização em menos tempo, comparado aos outros grupos (GT e GMB) (Gráfico 1).

TABELA 3 – ESPESSURA TENDÍNEA (MPD / MPE) (em milímetros)

Tempo de eutanásia	GRUPO TENOTOMIA		GRUPO MEMBRANA BIOLÓGICA		GRUPO CÉLULA TRONCO	
	Membro Pélvico direito	Membro Pélvico Esquerdo	Membro Pélvico direito	Membro Pélvico Esquerdo	Membro Pélvico direito	Membro Pélvico Esquerdo
	7 DIAS	5,72 mm	3,84 mm	7,4 mm	3,73 mm	4,96 mm
14 DIAS	7,07 mm	4,89 mm	6,5 mm	4,2 mm	4,93 mm	3,8 mm
21 DIAS	5,85 mm	5,34 mm	6,06 mm	4,3 mm	4,03 mm	4,06 mm

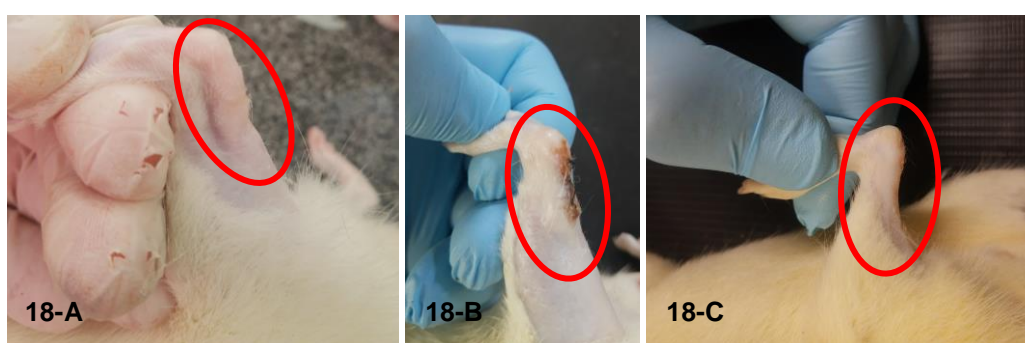
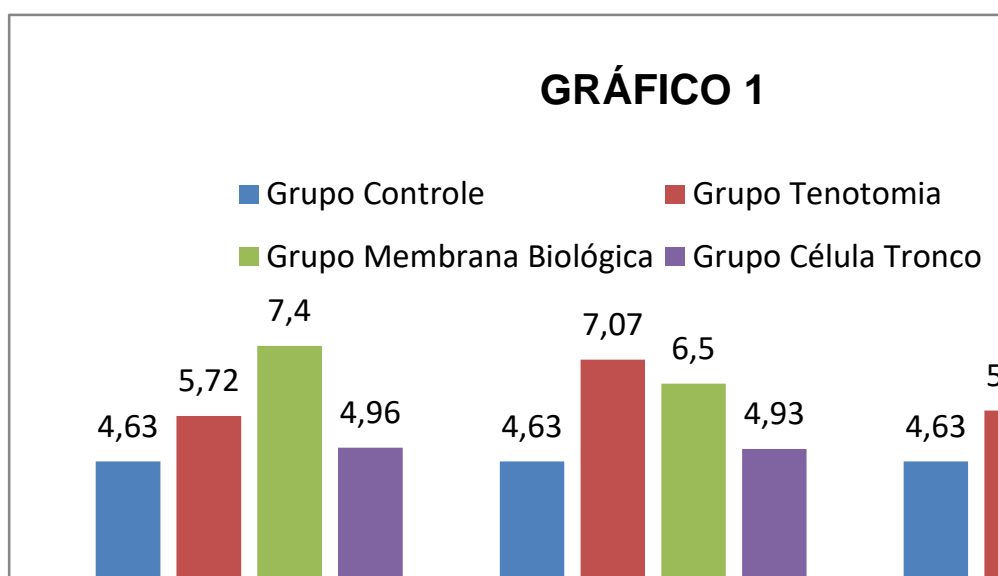


Figura 18: Região caudal da tíbia do membro pélvico direito, evidenciando a localização do tendão calcâneo comum. Imagem com destaque para as regiões operadas, circulas em vermelho. **18-A:** Animal do GT no 14º dia pós-operatório evidenciando edema em toda extensão da região caudal da tíbia. **18-B:** Animal do GMB no 14º dia pós-operatório, também com a mesma característica de edema na região. **18-C:** Animal do grupo GCT no 14º dia pós-operatório demonstrando um aspecto muito próximo da normalidade para a região caudal da tíbia. Fonte: Arquivo pessoal.

GRÁFICO 1 – ESPESSURA TENDÍNEA (MPD) (em milímetros)



Durante as necrópsias, outra característica avaliada e que teve uma diferença significativa entre os grupos, foi a consistência da ferida cirúrgica. Onde o GT e o GMB apresentaram, em todos os animais avaliados dentro do seu respectivo grupo, consistência da ferida cirúrgica alterada através de palpação das feridas. No GT foi possível observar uma rigidez tecidual em todos os momentos de avaliação, desde o 7º ao 21º dia pós-cirúrgico e o GMB inicialmente apresentou rigidez tecidual nos 2 primeiros momentos de avaliação, porém no 21º dia pós-cirúrgico todos os 3 animais avaliados apresentaram uma certa flacidez da ferida cirúrgica e tecidos adjacentes.



Figura 19-A/B/C: Tendões can cânneo comum de ratos wistar no 21º dia pós operatório. **19-A:** Tendão de animal do GT, evidenciando um espessamento irregular desde junção miotendínea até porção final da imagem. **19-B:** Tendão de animal do GMB, com espessamento tendíneo irregular e local de cicatrização com evidente desorganização tecidual. **19-C:** Tendão de animal do GCT demonstrando um bom padrão de cicatrização e espessura tendínea bem regular em toda sua extensão. **19-D:** Tendão de animal do GC, para ilustrar o padrão tendíneo normal. Fonte: Arquivo pessoal.

Além disso, nesse 21º dia, as membranas biológicas, que estavam associadas às feridas, também se encontraram flácidas e com uma coloração alterada (Figura 20). Em contrapartida, o GCT na fase inicial, ou seja, na avaliação dos animais eutanasiados com 7 dias de pós-cirúrgico, foi observado uma leve rigidez na ferida cirúrgica, porém tanto no 14º como no 21º dia de pós-cirúrgico, os tecidos apresentaram consistência bem próxima ao de tecidos tendíneos normais, não operados, como visualizados no GC.



Figura 20: Tendão com baixa qualidade cicatricial, sem padronização tecidual e membrana biológica (seta vermelha) alterada em aspectos de coloração e consistência.

Fonte: Arquivo pessoal

Nas análises microscópicas também foi possível visualizar marcantes diferenças entre os grupos experimentais, em relação ao padrão de inflamação, tempo e qualidade de cicatrização. Assim como realizado durante as necrópsias, no momento de avaliação microscópica das lâminas, foi padronizado uma ficha de avaliação para cada animal. Onde, nessa ficha foi preenchida com anotações e graduações das características apresentadas nas lâminas, coradas em HE, TM e PS.

Na tabela 4 evidencia que durante a análise das lâminas coradas em HE, o GMB ao 7^o, 14^o e 21^o dia pós-operatório, apresentou presença de macrófagos e neutrófilos, indicando um processo inflamatório bem ativo durante todo esse processo cicatricial, além de uma sinalização de resposta imunológica ativa também (Figura 21-A e B). O GT ao 7^o dia pós-operatório confirmou presença de macrófagos e neutrófilos, porém ao 14^o dia somente presença de macrófagos e ao 21^o dia não havia presença dessas células, indicando que após o 14^o dia de pós operatório, os animais desse grupo passaram da fase inflamatória da ferida (Figura 21-C). Já o GCT desde o 7^o dia em diante, todos os animais do grupo não apresentaram macrófagos e neutrófilos na região cicatricial, apontando assim uma fase inflamatória muito rápida e eficiente (Figura 21-D).

TABELA 4 – FASE INFLAMATÓRIA (AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA)

GRUPOS	Tempo de eutanásia	Presença de macrófago	Presença de neutrófilo
GRUPO TENOTOMIA	07 DIAS	Sim	Sim
	14 DIAS	Sim	Não
	21 DIAS	Não	Não
GRUPO MEMBRANA BIOLÓGICA	07 DIAS	Sim	Sim
	14 DIAS	Sim	Sim
	21 DIAS	Sim	Sim
GRUPO CÉLULA TRONCO	07 DIAS	Não	Não
	14 DIAS	Não	Não
	21 DIAS	Não	Não

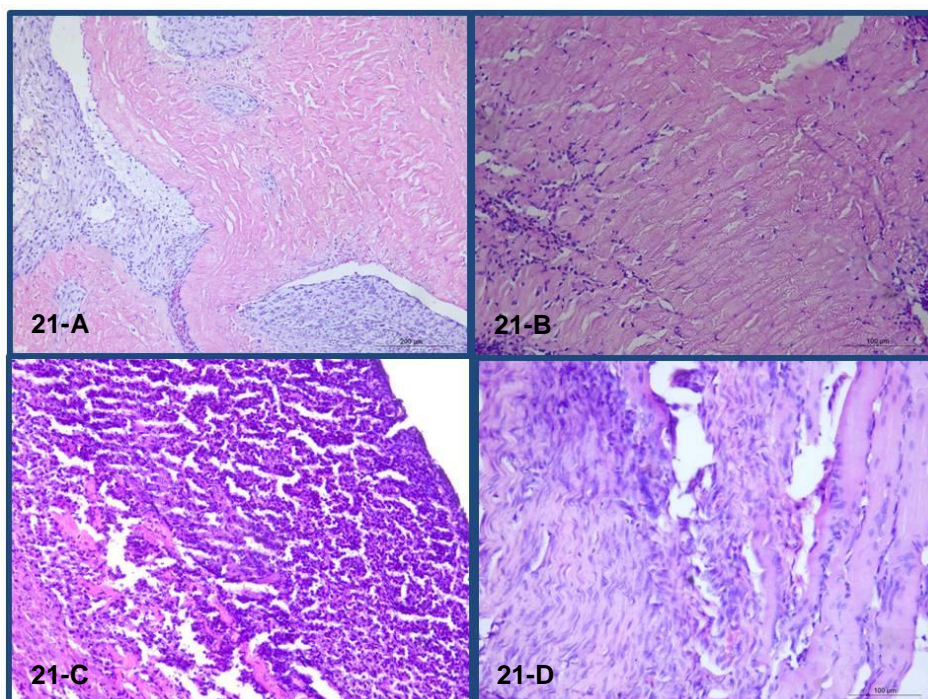


Figura 21-A e 21-B: Fotomicrografia de lâminas coradas em HE com aumento de objetiva 10X (A) 40X (B), (C) e (D). Ilustrando o GMB ao 7º e 21º dia respectivamente pós operatório, apresentando macrófagos e neutrófilos. **21-C:** Fotomicrografia da lâmina do GT ao 7º dia com marcante característica inflamatória. **21-D:** Fotomicrografia da lâmina do GCT ao 7º dia, sem células inflamatórias e uma característica de fibrose intensa. Fonte: Arquivo pessoal

Outra característica que conseguimos fazer avaliações e comparações entre os grupos na coloração de HE, foi a presença de fibrina, tecido de granulação e fibrose. Onde no GT ao 7º dia, apresentaram fibrina e início de tecido de granulação (Figura 21-C), ao 14º dia já não apresentava mais a fibrina e somente o tecido de granulação e com alguns pontos de fibrose e no 21º dia apenas fibrose. O GMB ao 7º dia apresentava um início de tecido de granulação, juntamente com alguns pontos de fibrose inicial também e a partir do 14º dia, já se identificava apenas fibrose, assim como no 21º dia (Figura 21-A e 21-B). Já no GCT ao 7º dia, já havia uma fibrose muito bem instalada em toda área lesionada (Figura 21-D). Demonstrando no GCT, uma agilidade na cicatrização, de forma organizada e com qualidade.

Na avaliação das lâminas coradas com TM, onde o tecido colágeno fica corado em azul, também foram observadas características diferentes entre os grupos, principalmente destacando o grupo GCT dos demais. Visto que as lâminas do GCT apresentaram uma densidade de colágeno intensa desde do 7º dia de pós operatório, enquanto os demais grupos (GMB e GT) apresentaram densidade de colágeno leve ao 7º dia e moderado ao 14º dia (Figura 22).

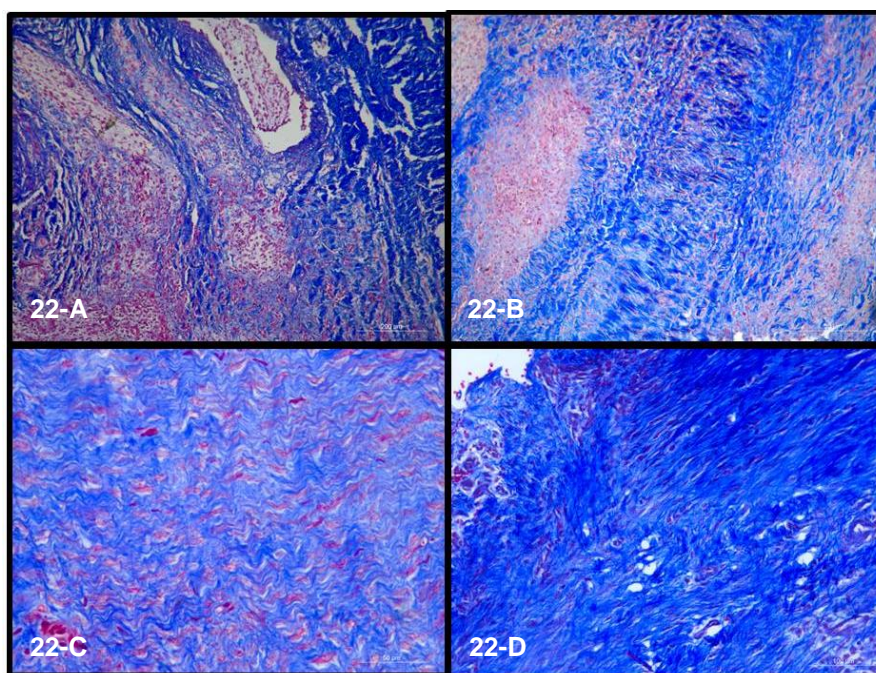


Figura 22: Fotomicrografias de lâminas coradas em TM com aumento de objetiva 10X (A) e (D) 40X (B) e (C). **22-A:** GMB ao 7º dia apresentando leve intensidade de colágeno. **22-B:** GMB ao 14º dia com moderada presença de colágeno. **22-C:** GT demonstrando presença intensa de colágeno ao 21º dia. **22-D:** GCT ao 7º dia evidenciando a intensa presença de colágeno e de forma organizada. Fonte: Arquivo pessoal

Mais uma vez, demonstrando que o uso de membrana biológica no GMB não causou melhora ou aceleração no efeito cicatricial, comparado ao GT. Em contrapartida o GCT apresentou uma produção de colágeno em grande quantidade em menor tempo e analisando as lâminas do 14º e 21º dia, além de intensidade de colágeno, o GCT demonstrou uma progressão acelerada em modelação do tecido (Figura 23).

Assim como a coloração de TM, também foram observadas diferenças entre os grupos na coloração em PS, onde essa técnica visa qualificar o tipo de colágeno prevalente no tecido. Os resultados obtidos foram coerentes com os resultados demonstrados até o momento. Nesta avaliação foi estipulado uma graduação em cruces, de 1 à 3 cruces, como está demonstrado na tabela 5.

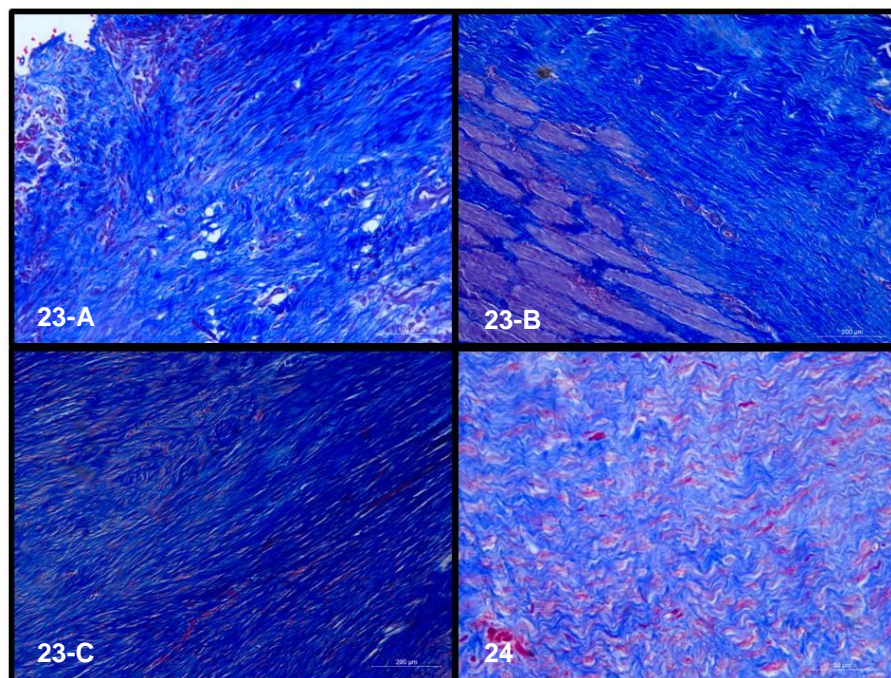


Figura 23: Fotomicrografia de lâminas coradas em TM com aumento de objetiva 10X. Evolução cicatricial do GCT evidenciadas em lâminas coradas em TM. **23-A:** 7º dia. **23-B:** 14º dia. **23-C:** 21º dia.

Figura 24: Fotomicrografia de lâmina corada em TM com aumento de objetiva 40X. 21º dia do GT de forma comparativa ao GCT.

Fonte: Arquivo pessoal

TABELA 5 – AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA QUALITATIVA DE COLÁGENO (COLORAÇÃO PRICOSIRIUS RED)

GRUPOS	Tempo de eutanásia	Colágeno tipo I	Colágeno tipo III
GRUPO TENOTOMIA	07 DIAS	+	++
	14 DIAS	+	++
	21 DIAS	++	++
GRUPO MEMBRANA BIOLÓGICA	07 DIAS	+	++
	14 DIAS	++	+++
	21 DIAS	++	++
GRUPO CÉLULA TRONCO	07 DIAS	+++	++
	14 DIAS	+++	+
	21 DIAS	+++	+

Por tanto, bem como está demonstrado na tabela acima, nos grupos GT e GMB observamos uma prevalência de colágeno tipo III até o 14º dia e a partir do 21º dia, uma igualdade entre os tipos de colágeno. Isso demonstra que somente a partir deste momento está começando uma transição do colágeno tipo III, o qual é um colágeno de fase inicial de cicatrização, com boa resistência porém pouca capacidade elástica, para o colágeno tipo I, o qual é o colágeno predominante nos tecidos em fase de modelação, tendo ampla capacidade de elasticidade.

Como vem sendo demonstrado nas outras avaliações, o GCT apresentou diferença significativa dos demais grupos, onde desde o 7º dia pós-operatório foi observado uma grande quantidade de colágeno tipo I e menor quantidade de colágeno tipo III. Apontando que além de uma aceleração na cicatrização dos tendões, o GCT tem uma cicatrização de alta qualidade com predominância de tecido organizado e com maior capacidade de elasticidade, o que é de extrema importância para os tendões.

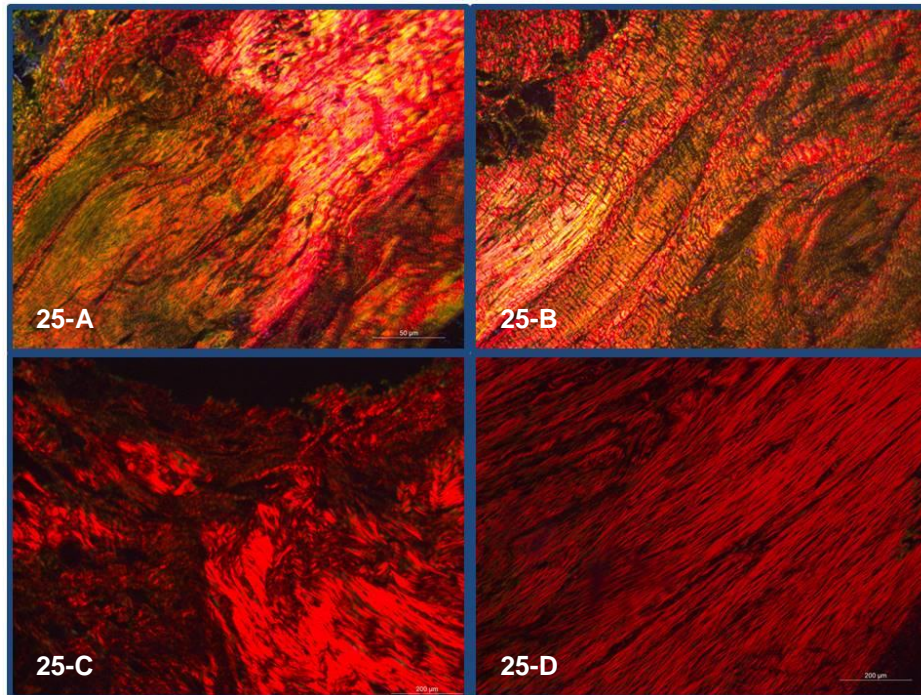


Figura 25: Fotomicrografia de lâminas coradas em Primosirus-Red com aumento de objetiva 40X (A) e (B) 10X (C) e (D). Fibras espessas e vermelhas: Colágeno tipo I. Fibras finas e amarelo esverdeadas: Colágeno tipo III. **25-A:** Lâmina do GT ao 21º dia, demonstrando uma igualdade dos tipos de colágeno. **25-B:** Lâmina do GMB ao 21º dia, com uma igualdade de tipos de colágeno. **25-C:** Lâmina do GCT ao 7º dia, evidenciando uma considerável predominância de colágeno tipo I. **25-D:** Lâmina do GCT ao 21º dia, também com maior quantidade de colágeno tipo I de forma bem modelada. Fonte: Arquivo pessoal

6. DISCUSSÃO

Para a realização desse trabalho, utilizamos algumas fontes de informações na literatura disponível, visto que exigia muito conhecimento prático principalmente do procedimento a ser realizado nos animais. E não encontramos informações muito detalhadas, o que pode influenciar diretamente no sucesso do trabalho. Na literatura consultada, achamos alguns protocolos anestésicos para realização de procedimento cirúrgicos em ratos wistar por via intraperitoneal, porém ao realizar um projeto piloto fomos observando que o protocolo sugerido por Lucke et al. (2018) não estava dando resultado satisfatório, onde a dose recomendada era de 80 mg/kg de cetamina e 10 mg/kg de xilazina.

Os animais estavam deprimindo muito durante a cirurgia, demoravam a retomar consciência no pós-cirúrgico e vinham à óbito em seguida. Com isso fizemos ajustes nas doses, além de associarmos a morfina ao protocolo

anestésico, como também na terapia pós-operatória para o controle da dor, como foi citado nesse presente trabalho. Martins (2019) também fez uso de protocolo analgésico para controle da dor, sendo que foi utilizado o tramadol (20 mg/kg) por via intraperitoneal durante o procedimento cirúrgico e no pós.

Por tanto, após esses ajustes, nos grupos experimentais conseguimos ter uma excelente indução anestésica, com retomada da consciência mais rápida e eficiente controle da dor, evitando o óbito dos animais e garantindo o bem estar durante a pesquisa. Já Costa (2011) utilizou em seu experimento, anestesia por meio de vaporização em aparato inalatório com halotano (indução 4%, manutenção de 1,5 a 2%, diluído em 70% N₂O e 30% O₂). Podemos observar que na literatura há uma grande variedade de protocolos anestésicos, tanto de forma inalatória como intraperitoneal, porém esse último não tão bem descrito e detalhado para ser adotado com técnica padrão. E neste presente trabalho conseguimos estipular e comprovar uma técnica eficiente para anestesia intraperitoneal em ratos Wistar.

Assim como Felix (2013), utilizamos CTM extraídas de tecido adiposo devido ao bom desempenho, fácil reprodução celular em cultura, alta capacidade anti-inflamatória, baixa expressão de antígenos e sua capacidade imunomoduladora. O sítio de coleta do tecido adiposo escolhido foi o acesso subcutâneo da região inguinal dos ratos, assim como no estudo de Lucke (2018). Já Felix (2013) e Martins (2019) descrevem que realizam a coleta do tecido na região abdominal dos animais. De forma geral, haverá tecido adiposo subcutâneo em ambas as regiões, inguinal e abdominal. Santos (2017) descreve que nos animais domésticos a fonte mais utilizada para isolamento e cultura de células tronco é o tecido adiposo, assim como Oliveira (2019), que publicou um trabalho realizando a coleta de tecido adiposo em equinos, na região paralela à base da cauda, através de uma incisão de pele de 4 à 5 cm atingindo o tecido adiposo entre a pele e a musculatura.

Porém Bernardo et al. (2017) realizou um estudo em equinos, descrevendo uma técnica de obtenção de células tronco, a partir da corrente sanguínea, sendo chamadas de células progenitoras periféricas. Onde informou que é uma técnica de fácil execução, sendo possível em ambiente

ambulatorial, pois é necessário somente o acesso à veia do equino sem necessidade de anestesia ou sedação e com menor risco de contaminação. Porém em comparação com outras fontes de células tronco, a eficácia dessa técnica é um pouco inferior necessitando mais estudos para aperfeiçoamento e redução do tempo de procedimento de coleta, considerado alto, sendo em média de 2 horas e 30 minutos.

No presente trabalho, em relação aos grupos experimentais, foi possível obter um resultado bem significativo em relação aos animais tratados com células tronco, devido às lesões sem aspecto inflamatório ou infeccioso, nenhum tipo de reação imunológica ao uso das células, alta capacidade de cicatrização e modelamento em curto espaço de tempo, garantindo uma cicatrização tendínea de alta qualidade e de forma ágil, o que é extremamente buscado em casos de rupturas tendíneas na rotina veterinária.

No estudo realizado por Lucke (2018) após transecção parcial de tendões calcâneo de ratos wistar foi utilizado $4,5 \times 10^5$ CTM intralesional e em seguida sutura de pele. Por microscopia de polarização avaliando a birrefringência, comparando tendões tratados com CTM e com uso de laser de baixa potência, obtiveram uma organização de colágeno melhor em tendões tratados somente com laser do que apenas com CTM. Porém o grupo tratado com CTM obteve melhor resultado em comparativo ao grupo controle, onde foi somente transecionado. Na coloração em HE o grupo tratado com laser apresentou mais celularidade em comparado ao grupo de tratado com CTM.

No presente trabalho, foram utilizadas 5×10^5 CTM intralesional e nas lâminas coradas em PS e TM, para avaliação de quantidade e qualidade de colágeno, houve uma diferença significativa em relação aos demais grupos, assim como nas análises das lâminas coradas em HE, demonstrando uma eficácia muito superior aos tratamentos convencionais realizados comparativamente. Por isso que é necessário mais estudos sobre tratamentos utilizando células tronco, para se determinar critérios e padrões, desde a escolha do animal fornecedor, da fonte que se utilizará, passando pela método de coleta e cultura até a aplicação com doses, para que se tenha

melhor compreensão da técnica, segurança e eficácia terapêutica (Lucke 2018). Em trabalhos em humanos relacionados a sistema nervoso central as CTMs tem apresentado eficácia, com capacidade de se diferenciar em neurônios e células da glia, migração para local lesionado e promover a recuperação funcional (Costa, 2011).

Oliveira (2019), descreve a utilização de CTMs autólogas derivadas de tecido adiposo, por perfusão regional em equinos com laminite crônica, onde foi utilizada a dose de 2×10^7 células em solução fisiológica. Obtendo um resultado satisfatório comparando com o tratamento placebo, em relação a taxa de crescimento do casco, relação espacial entre a terceira falange e o estojo córneo, perfusão vascular e processo cicatricial lamelar.

Membranas biológicas derivadas de tecidos de animais vem sendo estudadas e utilizadas principalmente em reparos cirúrgicos de hérnias na medicina veterinária (Vidor et al. 2013; Marques et al. 2015) e como curativos em feridas externas e enxertos (Aceto et al. 2007; Queiroz et al. 2012).

No presente trabalho, as membranas biológicas derivadas de túnica albugínea bovina, foram utilizadas em conjunto à tenorrafia, com objetivo de avaliar a capacidade de algum auxílio na cicatrização. Porém observamos que não houve melhora cicatricial nos tecidos e também uma reação inflamatória exacerbada. Demonstrando que seu uso deve ser mais aplicado em curativos cutâneos e locais onde tenham falhas teciduais como já descrito com sucesso (Queiroz et al. 2012; Aceto et al. 2007; Salbego, 2010; Vidor et al. 2013; Marques et al. 2015).

7. CONCLUSÃO

Ao final deste trabalho chegamos a algumas conclusões:

- A anestesia geral de ratos wistar se mostrou eficaz com as associações de Cloridrato de Cetamina a 10% (75 mg/kg), Cloridrato de Xilazina a 2% (4 mg/kg) e a Morfina 1% (3 mg/kg) por via intraperitoneal. Onde os animais tiveram uma ótima indução e manutenção anestésica, além de uma rápida recuperação após o procedimento.

- Na avaliação dos fragmentos de tecido de túnica albugínea de diferentes regiões testiculares, não houve qualquer diferença significativa entre as mesmas.
- Microbiologicamente a técnica de preservação de membranas biológicas em glicerina à 98% se mostrou eficaz, após culturas realizadas em fragmentos de túnicas albugíneas imersas na solução por 30 dias.
- Durante o processo de descongelamento de células tronco, constata-se necessário o procedimento de contagem de células viáveis em câmara de Neubauer através da técnica de coloração de uma alíquota de solução com Azul de Tripán 1% e posterior visualização em microscópio óptico.
- A túnica albugínea apesar da sua elevada capacidade de resistência e cicatrizante, como auxiliar em tenorrafias não demonstra ser uma técnica viável, pois apresenta uma influência negativa através de processos inflamatórios intensos gerando um atraso na cicatrização dos tendões e de má qualidade. Já as células tronco demonstram ser uma excelente ferramenta para acelerar o processo cicatricial de tendões, com crescimento quantitativo e qualitativo de tecido conjuntivo no local da tenorrafia. Sendo de grande importância para clínicos e cirurgiões veterinários em lesões tendíneas graves. Para isso é importante saber formas de coleta, doses, avaliações das células antes de realizar cada procedimento, para se alcançar o sucesso.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abate M, Gravare-Silbernagel K, Siljeholm C, Di Iorio A, De Amicis D, Salini V, Werner S, Paganelli, R. Pathogenesis of tendinopathies: inflammation or degeneration? **Arthritis Res Ther**. 2009, 11(3): doi: 10.1186/ar2723.

Aceto, M. L.; Coelho, M. C. O. C.; Monteiro, V. L. C.; Carneiro-Leão, A. M. A.; Melo Junior, M. M. Membrana amniótica e pericárdio canino como curativos biológicos na preparação do leito receptor para enxertia cutânea autógena. **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**, v.59, n.2, p.358-362, Recife, 2007.

AFIZAH, H.; HUI, J. H. P. Mesenchymal stem cell therapy for osteoarthritis. **J Clin Orthop Trauma**, 7(3):177-82, 2016.

ALMEIDA, M. S. **Análises de diferentes protocolos de acupuntura nos aspectos bioquímicos, ultraestruturais e organizacionais de tendões de ratos em processo de cicatrização**. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural) – Universidade Estadual de Campinas – 2015.

BARBOSA, B. C. R. **Melhora da qualidade de vida do paciente idoso com osteoartrose pela acupuntura**. Trabalho de conclusão de curso em Medicina Veterinária - Universidade de Brasília/ Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília, 2015.

BERNARDO, J. O.; ESCODRO, P. B.; NOTOMI, M. K.; ROVERI, E. G.; GOMES DO NASCIMENTO, T. Coleta de células progenitoras periféricas por aférese automatizada em equino: relato de procedimento. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.69, n.1, p. 259-263, São Paulo-SP, 2017.

BOTTAGISIO, M.; LOVATI, A. B. A review on animal models and treatments for the reconstruction of Achilles and flexor tendons. **Journal Material Science Material Medicine**. Mar; v.28, n.3, p.45, 2017.

BRAVO, M. O. *et al.* Isolamento, expansão e caracterização de células tronco do tecido adiposo de equinos. **ARS Veterinária**, v.28, n.2, p. 066-074, Jaboticabal-SP, 2012.

BREHM, W. *et al.* Stem cell-based tissue engineering in veterinary orthopaedics. **Cell Tissue Research**, v.347, p.677-688, 2012.

BUDGIN, J. B.; FLAHERTY, M. Alternative therapies in veterinary dermatology. **Veterinary Clinical North American Small Animal Practice**, 43(1):189-204, January 2013

BURKE, J. *et al.* Therapeutic potential of mesenchymal stem cell based therapy for osteoarthritis. **Clin Transl Medicine**, 5(1):27, 2016.

CHEN, H. *et al.* Combination of local and systemic parathyroid hormone enhances bone regeneration. **Clin Orthop Relat Research**, (416):291-302, 2003.

CLUTTERBUCK, A. L. *et al.* Matrix metalloproteinases in inflammatory pathologies of the horse. **Veterinary Journal**, v. 183, n. 1, p. 27–38, 2010.

CORRÊA, R. R. **Propriedade mecânica de dois padrões de sutura e dois tipos de fios aplicados à tenorrafia de equinos**. Tese (Doutorado em ciências veterinárias) – Universidade de São Paulo. São Paulo, 2012.

COSTA, D. A. **Efeito da terapia com células-tronco mesenquimais em ratos Wistar submetidos à isquemia focal e tratamento de reabilitação**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Neurociências) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2011.

FELIX, R. G. **Contribuição da terapia celular com células tronco em fibrose pulmonar em ratos**. Dissertação (Mestrado em medicina) – Universidade Estadual Paulista. Botucatu, 2013.

Fukuta S, Oyama M, Kavalkovich K, Fu FH, Niyibizi C. **Identification of types II, IX and X collagens at the insertion site of the bovine achilles tendon**. *Matrix Biol.* 1998, 17(1): 65-73.

GASQUE, K. C. S. *et al.* Avaliação da biocompatibilidade de uma membrana de pericárdio bovino acelular e seu potencial como carreador de osteoblastos. **Ciência Odontológica Brasileira**, v.11, n.1, p.58-66, 2008.

GOMIERO, C. *et al.* Tenogenic induction of equine mesenchymal stem cells by means of growth factors and low-level laser technology. **Veterinary Research Communications**, v. 40, n. 1, p. 39–48, 2016.

Gonda K. *et al.* Preserved proliferative capacity and multipotency of human adipose derived stem cells after long term cryopreservation. **Plast Reconstr Surg**. v.121: p.401–410, 2008.

GUTHRIE, H. D.; LIU, J.; CRITSER, J. K. Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.67, p.1811- 1816, 2002.

HARMAN, R. J. Stem cell therapy in veterinary dermatology. **Vet Dermatology**, 24(1):90-6.e23-4, 2013.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 92-124.

KANNUS P. Structure of the tendon connective tissue. **Scand J Med Sci Sports** 2000;10:312-320.

KINGHAM, P. J.; KALBERMATTEN, D. F.; MAHAY, D.; ARMSTRONG, S. J.; WIBERG, M.; TERENCEHI, G. Adipose-derived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. **Experimental Neurology**, v.207, n.2, p.267–274, 2007.

KOSACHENCO, B. G. *et al.* Artrodese de joelho de cães pela fixação externa. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 28, n. 2, p. 271-275, Abr./Jun., 1998.

KONIG, H. E.; LIEBICH, H. G. Anatomia dos Animais Domésticos. Texto e atlas colorido. **Artmed**, Porto Alegre, 4ª ed, p. 429, 2011.

KOTTON, D.N. *et al.* Bone marrow-derived cells as progenitors of ling alveolar epithelium. **Development and Disease**, v. 128, p. 5181-5188, Out., 2001.

LEPPANEN, M.; MIETTINEN, S.; MAKINEN, S. J. Management of equine tendon & ligament injuries with expanded autologous adiposederived mesenchymal stem cells: a clinical study. **Regen Medicine**, 4:S21, 2009.

LUCKE, L. D. **Efeito combinado da aplicação de células tronco e laser de baixa potência sobre a cicatrização do tendão calcâneo de ratos após transecção parcial.** Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural na área de concentração de Biologia Celular.) – Universidade Estadual de Campinas. São Paulo, 2018.

MAIA, L. **Coleta, processamento, caracterização fenotípica das células tronco mesenquimais e sua viabilidade de aplicação por via intratecal em equinos.** Tese (Doutorado em medicina veterinária). Universidade Estadual Paulista. Botucatu – SP. 2012.

MARQUES, D. R. C.; RUSSO, C.; IBAÑES, J. F. Utilização de pericárdio bovino conservado em glicerina 98% na herniorrafia perineal em cães – relato de 12 casos. **Arq. Ciênc. Vet. Zool.** UNIPAR, Umuarama, v. 18, n. 3, p. 185-190, 2015.

MARTINS, J. M. P. **Uso de células-tronco derivadas de tecido adiposo para redução de complicações da cicatrização cutânea em indivíduos tabagistas: Um modelo experimental em ratos.** Dissertação (Mestrado em Ciências Cirúrgicas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2019.

MATHIE, R. T. *et al.* Homeopathic prescribing for chronic conditions in feline and canine veterinary practice. **Homeopathy**, 99(4):243-8, October 2010.

MAXSON, S. *et al.* Concise Review: Role of Mesenchymal Stem Cells in Wound Repair. **Stem Cells Translational Medicine**, v. 1, n. 2, p. 142–149, 2012.

MCILWRAITH, W. C. Doenças das Articulações, Tendões, Ligamentos e Estruturas Relacionadas. In: STASHAK, T. S. **Claudicação Em Equinos Segundo Adams.** 5. Ed. São Paulo: Roca. p. 417-601, 2006.

MIAO, Z.; JIN, J.; CHEN, L.; ZHU, J.; HUANG, W.; ZHAO, J.; QIAN, H.; ZHANG, X. Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: Comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells. **Cell Biology International**, v.30, n.3, p.681-687, 2006.

MIZUNO, H. Adipose derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review. **J Nippon Med Sch**, v.76, p.56-66, 2009.

MORITA, W. *et al.* Cytokines in tendon disease. **Bone and Joint Research**, v. 6, n. 12, p. 656–664, 2017.

OLIVEIRA, A. P. L. **Células tronco mesenquimais autólogas infundidas por perfusão regional venosa na terapia da laminite crônica em equinos.** Tese (Doutorado em Medicina Veterinária na área de concentração de Clínica e Cirurgia Veterinárias.) – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2019.

OLIVEIRA, L. L. *et al.* Métodos de preservação de membranas biológicas para uso cirúrgico. **Jornal Brasileiro de Ciência Animal**, v. 2, n. 3, p. 175-188, 2009.

PEACOCK, E. E., Van WINKLE, W. Repair of tendons and restoration of gliding function. **Wound repair**. 2 ed. Philadelphia : Saunders. chap.8: p.367-464, 1976.

PENHA, E. M. *et al.* Use of autologous mesenchymal stem cells derived from bone marrow for the treatment of naturally injured spinal cord in dogs. **Stem Cells Int** 2014:437521, 2014.

PEREZ-MERINO, E. M. *et al.* Safety and efficacy of allogeneic adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for treatment of dogs with inflammatory bowel disease: Endoscopic and histological outcomes. **Veterinary Journal**, 206:391–397, 2016.

PERONI, J. F. *et al.* Anti-inflammatory and immunomodulatory activities of stem cells. **Veterinary Clinical North American Equine Practice**, v.27, p.351–362, 2011.

POGUE, B. *et al.* Stem-cell therapy for dilated cardiomyopathy: a pilot study evaluating retrograde coronary venous delivery. **Journal of Small Animal in Practice**, 54(7):361-6, 2013.

QUEIROZ, F. F. *et al.* Ensaio biomecânico da túnica albugínea bovina conservada em glicerina 98% para utilização como membrana biológica. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 3, p.501-506, 2012.

QUIMBY, J. M., *et al.* Assessment of intravenous adipose-derived allogeneic mesenchymal stem cells for the treatment of feline chronic kidney disease: a

randomized, placebo-controlled clinical trial in eight cats. **J Feline Med Surg.**, 18(2):165-71, 2016.

RAISER, A. G. Reparação do Tendão Calcâneo em Cães – Revisão Bibliográfica. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 2, p.351-359, 2001.

REDDY, G. K.; ENWEMEKA, C.S.; STEHNO-BITTEL, L. Laser photostimulation of collagen production in healing rabbit Achilles tendons. **Lasers in Surgery and Medicine**, New York, v. 22, p. 281-287, Mai., 1998.

REECE, W. O. Funcional anatomy and physiology of domestic animals. **Wiley-Blackwell**, EUA, 4th ed, cap. 4, p. 93, 2009.

RIZZOTO, G. *et al.* Efeitos da adição de glicerol e etilenoglicol associados sobre parâmetros de viabilidade espermática na criopreservação de sêmen canino. **PUBVET**, Londrina, v. 8, n. 22, 2014

RODASKI, S. *et al.* Esfincteroplastia anal externa experimental com membrana de peritônio bovino preservada em glicerina a 98%, em cães. **Archives of Veterinary Science**, v.5, p.55- 60, 2000.

SALBEGO, F.Z. **Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femural em cães associado à inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea.** Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2010.

SANTOS, E. J. Análise da Aplicação Terapêutica das Células Tronco na Medicina Veterinária. **Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento.** Ano 02, Vol. 01. p.269-295, 2017.

SARMENTO, C.A. *et al.* Pilot study: Bone marrow stem cells as a treatment for dogs with chronic spinal cord injury. **Regen Med Research** 2:9, 2014.

SHARMA P, MAFFULLI N. Biology of tendon injury: healing, modeling and remodeling. **J Musculoskelet Neuronal Interact.** 2006, 6(2): 181-190.

SCHIPPER, B. M. *et al.* Regional anatomic and age effects on cell function of human adipose derived stem cells. **Ann Plast Surg**, v.60, p.538–544, 2008.

SHARMA, P.; MAFFULLI, N. Basic biology of tendon injury and healing. **The Surgeon**, v. 3, n. 5, p. 309–316, 2005.

SILVA, S. V.; GUERRA, M. M. P. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 35, n. 4, p.370-384, 2011.

STAINKI, D. R. *et al.* Influência da radiação laser arseneto de gálio (AsGa) sobre a regeneração de nervo periférico após reparação cirúrgica primária. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 47, n. 06, p. 763-771, Nov./Dez., 1995.

TAKÁCS, L. *et al.* Stem cells of the adult cornea: from cytometric markers to therapeutic applications. **Cytometry A**. 75(1):54-66, 2009.

VIDOR, S. B.; MARQUES, J. M. V.; MOURA, L. F. L.; GOMES, C.; PAZ, A. H.; GOMES, H. M.; MEURER, L.; BARROS, R. R.; GUIMARÃES, K. M.; LIMA, E. O. C.; CONTESINI, E. A. Reparo de hernia abdominal com pericárdio bovino associado a células tronco mesenquimais em ratos Wistar. **Acta Scientiae Veterinariae**, 41, 1102, Porto Alegre, 2013.

VILLATORO, A. J. *et al.* Use of adipose-derived mesenchymal stem cells in keratoconjunctivitis sicca in a canine model. **Biomed Res Int.**, 2015:527926, 2015.

WEBB, T. L. *et al.* Stem cell therapy in cats with chronic enteropathy: A proof-of-concept study. **J Feline Med Surgery**, 17:901–908, 2015.

ZAMPROGNO, H. Células tronco esqueléticas para o tratamento da não união de fraturas. **Acta Scientiae Veterinaria**, 35(Supl 2): s289-s290, 2007.

9. ANEXO I



Secretaria de Estado de Ciência, Tecnologia e Inovação
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

REITORIA
Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 492, intitulado “AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E MICROBIOLÓGICA DA TÚNICA ALBUGÍNEA TESTICULAR BOVINA E CÉLULAS TRONCO COMO POTENCIAIS REPARADORES DA TÉCNICA DE TENORRAFIA EM RATOS WISTAR” sob a responsabilidade do Dr. Eulógio Carlos Queiroz de Carvalho, Centro de Ciências Tecnológicas e Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório/Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (SBCAL/COBEA) bem como a lei federal 11. 794 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA DE USO DE ANIMAIS (CEUA - UENF) em reunião ocorrida em 14/10/2021. Este programa está licenciado na presente formatação e tem validade até 14/10/2025.

Campos dos Goytacazes, 14 de outubro de 2021.

Clóvis de Paula Santos

Presidente da Comissão de Ética de uso de Animais



Av. Alberto Lamego, 2000 - Parque Califórnia - Campos dos Goytacazes/ RJ - 28013-602
Tel.: (22) 2739-4178 - (22) – 2739-7180 correio eletrônico: adrianafaria@uenf.br