

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO  
COM A FRAÇÃO TOTAL DE CÉLULAS MONONUCLEARES  
AUTÓGENAS DA MEDULA ÓSSEA NA LESÃO IATROGÊNICA  
AGUDA DE TENDÃO CALCÂNEO DE CÃES**

**TESE DE DOUTORADO**

**Débora Cristina Olsson**

**Santa Maria, RS - Brasil  
2009**

**TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO  
COM A FRAÇÃO TOTAL DE CÉLULAS MONONUCLEARES  
AUTÓGENAS DA MEDULA ÓSSEA NA LESÃO IATROGÊNICA  
AGUDA DE TENDÃO CALCÂNEO DE CÃES**

**Por**

**Débora Cristina Olsson**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em  
Medicina Veterinária, Área de Concentração em Cirurgia Veterinária, da  
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS),  
como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Doutor em Medicina Veterinária.**

**Orientador: Prof. Ney Luis Pippi, PhD**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2009**

636.0897

O52t

Olsson, Débora Cristina

Transplante de células-tronco com a fração total de células mononucleares autógenas da medula óssea na lesão iatrogênica aguda de tendão calcâneo de cães. / Débora Cristina Olsson. – Santa Maria, 2009.

106 f. : il.

Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria, 2009.

Orientação: Prof. Ney Luis Pippi, PhD.

1. Células mononucleares. 2. Medula óssea. 3. Matriz Extracelular. 4. Tendão. 5. Cães. I. Título.

CDD - 636.0897

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária  
Renata Weingärtner Rosa – CRB 228/14<sup>a</sup> Região  
(Biblioteca Setorial do CAV/UDESC)

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Rurais  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Tese de Doutorado

**TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO  
COM A FRAÇÃO TOTAL DE CÉLULAS MONONUCLEARES  
AUTÓGENAS DA MEDULA ÓSSEA NA LESÃO IATROGÊNICA  
AGUDA DE  
TENDÃO CALCÂNEO DE CÃES**

Elaborada por  
**Débora Cristina Olsson**

Como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Doutor em Medicina Veterinária**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

**Ney Luis Pippi, PhD.**  
(Presidente/Orientador)

**Alceu Gaspar Raiser, Dr., UFSM**

**Alexandre Mazzanti, Dr., UFSM**

**Cleuza Maria de Faria Rezende, PhD., UFMG**

**Ewerton Nunes Moraes, Dr., UFSM**

Santa Maria, 03 de março de 2009.

## DEDICATÓRIA

*A Deus:*

Por sempre iluminar o meu caminho!

*À minha mãe, Ana*

Por todo amor e esforço dispensados à minha educação, pela credibilidade e orgulho que sente por mim e por me incentivar em todos os momentos da minha vida.

*Ao meu irmão, Emerson*

Sempre presente para me escutar e apoiar nos momentos mais difíceis.

*À minha cunhada, Ana Paula*

Pelo apoio, amizade e incentivo.

“Rir é arriscar-se a  
parecer louco.  
Chorar é arriscar-se a  
parecer sentimental.  
*Estender a mão para o outro  
é arriscar-se a se envolver.  
Expor seus sentimentos é  
arriscar-se a expor seu eu verdadeiro.  
Amar é arriscar-se a  
não ser amado.  
Expor suas idéias e sonhos ao público é arriscar-se a perder.  
Viver é arriscar-se a morrer.  
Ter esperança é arriscar-se a sofrer decepção.  
Tentar é arriscar-se a falhar.  
Mas, é preciso correr riscos.  
Porque o maior azar da vida é não arriscar nada...  
Pessoas que não arriscam, que nada fazem, nada são.  
Podem estar evitando o sofrimento e a tristeza.  
Mas assim não podem aprender, sentir, crescer, mudar, amar,  
viver...  
Acorrentadas às suas atitudes, são escravas.  
Abrem mão de sua liberdade.  
Só a pessoa que se arrisca é livre...  
Arriscar-se é perder o pé por algum tempo.  
Não se arriscar é perder a vida”.*

*(Fernando Pessoa)*

## **AGRADECIMENTOS**

À **Universidade Federal de Santa Maria** pela formação científica;

Ao **Prof. Dr. Ney Luis Pippi** pela orientação na área de cirurgia, pela amizade, por estar sempre presente a ajudar, ouvir e ensinar.

Aos **professores do Programa de Pós-Graduação** meu sincero agradecimento pelos conhecimentos transmitidos e pela convivência agradável;

A **todos os meus amigos e colegas da pós-graduação** principalmente à: Guilherme Kanciukaitis Tognoli, Daniel Curvello de Mendonça, Eduardo de Bastos Santos Jr, Graziela Kopinits de Oliveira, Anna Laetícia Barbosa Trindade, Paula Basso, Marina Gabriela Monteiro Carvalho Mori da Cunha, Mariana Carvalho Rosa, Lourenço Sausen, Raquel Baugartem, Mauricio Borges da Rosa, Aricia Sprada, João Paulo M. M. da Cunha, Lucieli Teixeira. Em especial à Danieli Brolo Martins, Fabiano Salbego, Renata Dezengrini, Francieli Marconato, Priscilla Domingues Mörchbacher e Tiago Luis Eilers Treichel. Muito obrigada pela confiança, pela amizade, pelos ótimos momentos que vocês me proporcionaram, pelos conhecimentos que me deram. Sem vocês nada teria dado certo. Aos amigos e colegas, Charles Pelizzari, Rafael Festugato, Kleber Gomes obrigada pelo convívio. Minha amizade será eterna;

Ao **Laboratório Hemato-onco do Hospital Universitário de Santa Maria**, à Dra Virgínia Maria Coser, Liliane Zimmermann, Valússia Scapin, Claudia Machado, Alice Brulé e a enfermeira Chuca que através de seus conhecimentos me deram a oportunidade de estagiar por dois anos no laboratório e acompanhar todas as colheitas de medula óssea no centro cirúrgico e CTMO.

Aos **profissionais do laboratório LACVET** que estiveram a nossa disposição pelo tempo necessário;

Ao **Prof. Dr. Rudi Weiblen** que cedeu o laboratório de Virologia para realização das análises por fluorescência;

Ao **Prof. Dr Celso Pillati** e equipe do laboratório de Histologia da UDESC pelas análises histopatológicas e ao **Prof. Dr. Davi Miquelutti** pelas análises estatísticas.

Às **enfermeiras Nelci e Anita** pelo auxílio na enfermagem e organização do centro cirúrgico do bloco 5 no LACE;

Aos **funcionários do Hospital Veterinário**, pela disposição e colaboração;

Ao **CNPq** pelo suporte financeiro que viabilizou a realização dos trabalhos.

Aos **meus cães** dos experimentos;

À todos aqueles que participaram, direta ou indiretamente, para a conclusão deste trabalho.

## RESUMO

Tese de Doutorado  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária  
Universidade Federal de Santa Maria

### **TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO COM A FRAÇÃO TOTAL DE CÉLULAS MONONUCLEARES AUTÓGENAS DA MEDULA ÓSSEA NA LESÃO IATROGÊNICA AGUDA DE TENDÃO CALCÂNEO DE CÃES.**

AUTORA: DÉBORA CRISTINA OLSSON  
ORIENTADOR: NEY LUIS PIPPI  
Santa Maria, 03 de março de 2009.

A maioria das lesões tendíneas em pequenos animais está relacionada a traumas, e as lesões mais importantes envolvem secção parcial ou completa, devido à ação de objetos cortantes ou agudos, ou laceração associada com acidente de automóvel levando a uma incapacidade funcional do membro. Os efeitos como a melhora da qualidade ou rapidez da cicatrização não são confirmados por estudos controlados. Recentemente, os avanços médicos têm demonstrado crescente interesse na utilização de terapia celular em tratamentos de doenças degenerativas e também em cicatrização lenta ou ineficaz. Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do transplante autólogo de células mononucleares (CM) de medula óssea com ou sem *MEC* na cicatrização tendínea. Foram comparados tendões tratados somente com CM (GI); CM embebidos em *MEC* de colágeno (GII); somente *MEC* de colágeno (GIII) com o grupo controle (GIV), além da presença dessas células no tecido neoformado. Foi induzida lesão experimental no tendão calcâneo comum do membro pélvico direito em 36 cães, separados aleatoriamente em quatro grupos experimentais com nove animais cada, seguida por transplante autólogo de no mínimo  $0,6 \times 10^8$  e máximo  $7,4 \times 10^8$  CM.  $\text{kg}^{-1}$ , com viabilidade superior a 90%, marcadas com nanocristal Q-tracker 655. Os animais foram avaliados por parâmetros clínicos e hematológicos e, através de biópsia realizada aos 7º, 14º e 30º dias de evolução por meio de características citológicas, análises fluorescente direta e histopatológicas quanto à qualidade de cicatrização tecidual como: aumento do infiltrado inflamatório, presença de matriz extracelular, aumento da proliferação celular e presença de CM marcadas no tecido que caracterizam uma melhora discreta da regeneração do reparo tendíneo quanto ao quesito inflamação. Estatisticamente, o grupo tratado com a associação de *MEC* de colágeno embebidos com CM foi mais significativo quando comparados aos outros grupos.

Dessa forma conclui-se que após a análise dos resultados, a terapia celular tendínea com CM favoreceu a fase proliferativa do reparo tendíneo entre o 14º e 30º dias após o tratamento e novas pesquisas devem buscar sua utilização como auxílio à regeneração.

Palavras-chave: células mononucleares, medula óssea, matriz extracelular, tendão, cães.

## **ABSTRACT**

Doctor Thesis  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária

### **AUTOGENOUS MONONUCLEAR BONE MARROW CELLS TRANSPLANTATION IN ACUTE IATROGENIC INJURY IN THE REPAIR OF CALCANEOS TENDON IN DOGS**

AUTHOR: DÉBORA CRISTINA OLSSON  
ADVISER: NEY LUIS PIPPI  
Santa Maria, March, 03, 2009.  
Universidade Federal de Santa Maria

Most injuries of the tendons in small animals are linked to trauma and the most important injuries are partial or complete section due to the action of sharp or acute objects or laceration associated with automobile accident leading to a functional disability of the member. The treatments offered are different, but effects such as improving the quality and speed of healing are not confirmed by controlled studies. Recently, the medical advances have shown growing interest in the use of cell therapy in treatment of degenerative diseases and also in slow or ineffective healing. This study aimed to evaluate the effects of the transplant autogenous of mononuclear cells of bone marrow with or without MEC in tendon healing. Compared tendons were treated only with mononuclears cells (GI); mononuclears cells embedded in MEC of collagen (GII); only MEC of collagen (GIII) with the control group (GIV), besides the presence of such cells in the new tissue. It was induced Achilles tendon injury trial in common law of the pelvic member in 36 dogs, randomly separated into four groups with nine experimental animals each, and followed by autogenous transplantation of at least  $0,6 \times 10^8$  and a maximum  $7,4 \times 10^8$  mononuclear cells.  $\text{kg}^{-1}$ , with more than 90% viability, marked with nanocrystal Q-tracker 655. The animals were evaluated by clinical and hematological parameters and through biopsy cytological features. Analyses performed at 7th, 14th and 30th days of evolution through cytological features analyses and direct fluorescent histopathological about the quality of healing tissue as: increasing of the inflammatory infiltrate, presence of extracellular matrix, increased cell proliferation and marked presence of mononuclear cells in tissue that characterize the improvement of the regeneration of tendinous repair. Statistically, the group treated with the combination of MEC of collagen embedded with mononuclears cells was more significant when compared to other groups. Thus it appears that after examining the results, tendon cell therapy with mononuclear cells improved the organization of proliferative tendon repair between 14th and 30th of days after treatment.

Key words: mononuclear cells, bone marrow, MEC, tendon, dogs.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Agulha para colheita de medula óssea do tipo Steis (15 G X 3”) anatômica. Amostras obtidas por punção rotacional e aspiração introduzida na fossa trocantérica.. Local exato de introdução da agulha Steis na fossa trocantérica representada por imagem radiográfica.....	42
FIGURA 2 - MO colhida e transferida para a bolsa <i>Kit Collection Bone Marrow</i> . Pré-filtro de 500 microns e pelo filtro de 200 microns acoplados em linha. Bolsa de transporte e acondicionamento de MO.....	43
FIGURA 3 -Isolamento da FTCM por gradiente de densidade Histopaque 1.007 . Halo de células mononucleares obtidos após centrifugação. Botão celular contendo a FTCM da MO.....	46
FIGURA 4 -Leitura microscópica da viabilidade celular com corante azul de Trypan, em lâmina de Neubauer. Células claras viáveis. Células escuras inviáveis.....	47
FIGURA 5 -Tenectomia parcial do tendão calcâneo comum do MPD. Esponja hemostática de colágeno hidrolizada e liofilizada (Hemospon®). MEC de colágeno embebidos com a FTCM autógenas da MO.....	50
FIGURA 6 -Aglomerados de células mononucleares fluorescentes marcadas com nanocristal Q-tracker 655, observadas em microscopia de luz fluorescente em amostras do botão celular pré-transplante (40X).....	61
FIGURA 7-Resultados obtidos por <i>imprint</i> citológico corados por Panótico rápido: Formações alveolares similares a tecido adiposo que devido a presença de MEC. Aglomerados de células de origem fibroblástica. Células fibroblásticas que seguem a mesma orientação e presença de material similar a gordura (espaços em branco que lembram gordura). Fundo protéico e eventuais fibroblastos (40X).....	68
FIGURA 8 -Fotomicrografia de processo cicatricial das amostras do tendão calcâneo comum de cães, aos sete dias de evolução, imobilizados com pino intramedular coradas pelo HE (40X).....	70
FIGURA 9 -Microscopia óptica do tendão calcâneo comum (MPD) de cães, imobilizados com pino intramedular. Aspecto histológico das amostras dos grupos GI, GII, GII e GIV aos 14 dias de evolução cicatricial, coradas pelo HE (40X).....	72
FIGURA 10 - Aspecto microscópico das amostras de tendão do MPD dos Grupos GI, GII,GIII, GIV aos 30 dias de evolução cicatricial (HE 40X).....	73

## LISTA DE QUADROS

QUADRO-1 Agulha para colheita de medula óssea do tipo Steis (15 G X 3”) anatômica. Amostras obtidas por punção rotacional e aspiração introduzida na fossa trocantérica.. Local para introdução da agulha Steis na fossa trocantérica representada por imagem radiográfica.....	52
--	----

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -Valores das médias da morfometria sangüínea de hemáceas (He- $\mu$ l), hematócrito (Ht-%), hemoglobina (Hb- g dl <sup>-1</sup> ), leucócitos (Leu- $\mu$ l), e proteína plasmática (PP- g dl <sup>-1</sup> ), obtidas durante a colheita de medula óssea nos momentos, pré, trans, pós e 96 horas após a colheita de medula óssea em sangue periférico de cães (n=36).....	59
TABELA 2 -Número de células mononucleares (ml) e viabilidade (%) celular obtida no botão celular após processamento da medula óssea dos cães do grupo GI.....	60
TABELA 3 -Número de células mononucleares e viabilidade celular obtida no botão celular após processamento da medula óssea, dos cães do grupo GII .....	61
TABELA 4 - Resultado da avaliação das células mononucleares do botão celular por imunofluorescência, pré-transplante e pós-biópsia no tecido tendíneo marcadas com nanocrystal Q-tracker 655 encontradas no grupo GI.....	63
TABELA 5 -Resultado da avaliação das células mononucleares do botão celular por fluorescência pré-transplante e pós-biópsia no tecido tendíneo das células marcadas com nanocrystal Q-tracker 655 encontradas no grupo GII.....	64
TABELA 6 -Escore de cães submetidos ou não a transplante de células mononucleares e MEC de colágeno, conforme grau de deambulação, sob imobilização interna, do 7° ao 30° dia de pós-operatório.....	66
TABELA 7 - Contrastes de médias das notas do processo cicatricial (variáveis fibroblastos, colágeno, neoangiogênese) entre grupos, por período de avaliação, de cães submetidos ou não a transplante de células mononucleares e MEC de colágeno, sob imobilização interna, do 7 ° aos 30° dia de pós-operatório.....	74
TABELA 8 - Contrastes de médias de cicatrização (variáveis fibroblastos, colágeno, neoangiogênese) entre dias, por grupo, de cães submetidos ou não a transplante de células mononucleares e MEC de colágeno, sob imobilização interna, do 7 ° ao 30° dia de pós-operatório.....	75

TABELA 9 -Contrastes de médias das notas do processo inflamatório, entre grupos, por período de avaliação, de cães submetidos ou não a transplante de células mononucleares e MEC de colágeno, sob imobilização interna, do 7 ° ao 30° dia de pós-operatório.....76

TABELA 10 - Contrastes de médias das notas do processo inflamatório (variáveis hemácias, coágulos, fibrina, células mononucleares e polimorfonucleares) entre dias, por grupo (GI, GII, GIII, GIV), de cães submetidos a tenectomia e transplante de células mononucleares acrescidas ou não a MEC de colágeno, sob imobilização interna, dos 7 ° aos 30° dia de pós-operatório.após processamento da medula óssea dos cães do grupo DII.....77

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	19
<b>2.1 Tendão</b> .....	19
2.1.1 Anatomia.....	19
2.1.2 Fase inflamatória .....	21
2.1.3 Fase neoangiogênica.....	22
2.1.4 Fase proliferativa.....	23
2.1.5 Fase de remodelamento.....	25
2.1.6 Terapias tendíneas.....	26
<b>2.2. Marcadores fluorescentes nanocristais</b> .....	32
2.2.1 Qdots na biologia celular.....	34
<b>2.3 Comitê de Ética em Pesquisas com Animais</b> .....	38
<b>3 Material e métodos</b> .....	38
3.1. Modelo Experimental.....	38
3.1.1 Período prévio de adaptação.....	38
3.1.2 Separação dos animais.....	38
3.1.3 Colheita de sangue para autotransfusão.....	39
3.1.4 Colheita da FTTCM da MO.....	40
3.1.5 Obtenção de soro autólogo.....	44
3.1.6 Quantificação manual das células nucleadas totais e viabilidade celular do sangue da medula óssea.....	44
3.1.7 Isolamento da FTTCM da MO.....	45
3.1.8 Período trans-operatório para transplante da FTTCM e MEC de colágeno.....	45
3.1.9 Teste de viabilidade das células mononucleares da MO.....	45
3.1.10 Marcação da FTTCM da MO com nanocristal quantum dot .....	48
3.1.11 Intervenção cirúrgica.....	49
3.1.12 Imobilização da articulação tíbio-tarsiana.....	50
3.1.13 Analgesia pós-operatória.....	51
3.1.14 Estudo clínico.....	51
3.1.15 Estudo histológico e citológico.....	52

3.1.16 Análise estatística.....	53
3.1.17 Doação dos animais.....	54
<b>3.2 Resultados.....</b>	<b>55</b>
3.2.1 Modelo experimental.....	55
3.2.2 Intervenção cirúrgica.....	55
3.2.3 Imobilização articular.....	56
3.2.4 Técnica de colheita de medula óssea.....	56
3.2.5 <i>Kit bone marrow collection</i> .....	57
3.2.6 Colheita de sangue periférico nos momentos pré, trans e pós colheita de medula óssea.....	58
3.2.7 Separação da fração mononuclear, viabilidade e marcação celular.....	58
3.2.8 Transplante das células da fração mononuclear.....	64
3.2.9 Avaliação clínica.....	65
3.2.10 <i>Imprint</i> citológico.....	67
3.2.11 Histopatologia.....	69
<b>3.3 Discussão.....</b>	<b>78</b>
<b>4. CONCLUSÕES.....</b>	<b>88</b>
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>89</b>
<b>6. APÊNDICE.....</b>	<b>105</b>
6.1 Apêndice 1.....	106

## 1 INTRODUÇÃO

Na tentativa de acelerar processos regenerativos têm sido efetuadas pesquisas em diferentes tecidos como a pele (KOTTON, 2001), osso (KOSACHENCO et al., 1998), nervos (STAINKI et al., 1995), músculos e tendões (SCHMITT et al., 1993; WANDERER et al., 1994; REDDY et al., 1998). Os músculos e tendões têm significativa participação nos problemas ortopédicos de cães domésticos e a maioria das lesões encontradas principalmente nos tendões está relacionada ao trauma (RAISER, 2000), devido a ação de objetos cortantes ou agudos, causando desgastes e rupturas parcial ou completa, (KILLINGSWORTH, 1993; RAISER, 2000), contribuindo para o inevitável declínio da função do órgão ou tecido (NEURINGER ; RANDELL, 2004).

Métodos de tratamento para traumas ocorridos em tendões vêm sendo testados, porém, os resultados são frustrantes quando considerados o tempo de cicatrização e a qualidade do tecido cicatricial. Pesquisas recentes têm dado importância ao traumatismo de tendão, particularmente do calcâneo, efetuando técnicas corretivas com a utilização de membranas como enxerto autógeno de fáscia lata (HADDAD et al., 1997), tendão homólogo (RAISER 2000), peritônio bovino preservado (COSTA NETO et al., 1999) e pericárdio equino (SARTORI FILHO et al., 1997). Entretanto, mais recentemente as pesquisas têm voltado sua atenção para o potencial terapêutico da engenharia celular quando aplicadas a enfermidades complexas ou lesão de difícil cicatrização (HUANG et al., 2006).

Pesquisas com células da medula óssea tem apontado múltiplas possibilidades para a reparação tecidual e aceleração dos processos regenerativos e a principal vantagem quando utilizadas de forma autógena é o fato de que não provocam rejeição quando reinjetadas (VOLLWEILER et al., 2003). Alguns estudos em animais obtiveram resultados positivos após injeção local de células precursoras mesenquimais autólogas em diferentes concentrações para cicatrização de tecido tendíneo, melhorando significativamente a cicatrização do tendão (KRAMPERA et al., 2006).

Essas descobertas no campo da medicina regenerativa levam a crer que, além de originar as células sangüíneas, as células-tronco adultas têm potencial e plasticidade para se transformar em várias outras linhagens celulares ou simplesmente aumentar o potencial da cicatrização em diversos tipos de tecidos (NARDI; MEIRELLES, 2006).

A experimentação laboratorial envolvendo esses tipos de células está evoluindo rapidamente, porém, faltam ainda estudos bem fundamentados e controlados sobre as fontes de diferentes células-tronco e métodos de purificação para expansão em cultura que

confirmem a contribuição deste método terapêutico na qualidade da cicatrização (ZAGO; COVAS, 2004).

O presente trabalho oferece uma alternativa adjuvante para o tratamento de lesão tendínea utilizando implante de colágeno hidrolizado e liofilizado como MEC, embebidos ou não com as células mononucleares da medula óssea, marcadas com nanocristal, em lesão cirúrgica experimental de tendão calcâneo comum em cães. Diante dos aspectos considerados têm-se como objetivos:

- 1- elaborar um modelo experimental para colheita de células da medula óssea no cão;
- 2- comparar a qualidade da regeneração do tecido conjuntivo tendíneo em curto período de tempo, promovida pelas células mononucleares autógenas da medula óssea, com ou sem auxílio de MEC de colágeno, marcadas com nanocristal, por meio de histopatologia;
- 3- analisar através de fluorescência a presença de células mononucleares marcadas com nanocristal Q-tracker 655 no botão celular;
- 4- avaliar através de citologia a presença do marcador coloidal nanocristal Q-tracker 655 nos tecidos nos períodos de 7, 14 e 30 dias de evolução.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Tendão**

#### **2.1.1 Anatomia**

Os tendões são estruturas cilíndricas, densas e alongadas que unem os músculos a outras estruturas; assim, uma das extremidades está sempre ligada a um músculo, sendo um componente intermediário de inserção (ARON, 1996). Na outra extremidade, as fibras do tendão sempre se aderem com o tecido fibroso da estrutura a que se unem comumente o osso, onde elas são contínuas (PARIZOTTO, 2003) ao mesmo tempo com uma cobertura fibrosa externa, o perióstio (BENJAMIN et al., 2008). Sua função inicial é transmitir energia e estabilidade para força de contração que gera um movimento muscular (RUSSEL; MANSKLE, 1990) para os ossos, tornando possível o movimento articular, que deve ter um mínimo de gasto de energia (SOBANIA, 1992).

Os tendões normais possuem uma textura fibroelástica, densidade e superfície lisa o que demonstra uma grande resistência a cargas mecânicas (BIRK et al., 1997), sendo resistentes à tensão (KAKAR et al., 1998). São constituídos de feixes paralelos, espessos e bem compactos de fibras colágenas que têm no seu meio, núcleo de fibroblastos, que são células que sintetizam colágeno (COMARCK, 1991; EVANS; DE LAHUNTA, 1994). São orientadas de modo a oferecer o máximo de resistência, ondulação e normalmente atuam sobre o tecido tendíneo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Segundo Culaw et al. (1999) grande parte das fibras é orientada em paralelo ao eixo longitudinal do tendão, o que permite resistir e transmitir eficientemente as forças unidirecionais geradas dos músculos para os ossos (ASLAN et al., 2008). No tendão há um tecido conjuntivo frouxo que o circunda denominado paratendão ou, alternativamente, em áreas que requerem lubrificação, pelas bainhas sinoviais, compostas de camadas parietal e visceral, que continuam através do mesotendão (PAYNE ; TOMLINSOM, 1993). O paratendão tem a função de possibilitar o livre movimento do tendão contra os tecidos circunvizinhos (KAKAR et al., 1998).

Para verificar o nível de organização molecular das fibras colágenas (matriz extracelular - MEC) no tendão diversos métodos são empregados, tanto nas ocasiões onde a morfologia está preservada, como naquelas onde ocorre o processo de reparo desta estrutura corporal (REINKE ; KUS, 1992). O colágeno é o maior componente da MEC, abrangendo

cerca de 86 a 95% do peso úmido do tendão e sua composição é água, colágeno, proteoglicanos e fibrócitos arranjados de forma ordenada (ASLAN et al., 2008). Acreditava-se que a MEC dos vertebrados era simplesmente uma substância inerte que proporcionou estabilização da estrutura física dos tecidos, mas após diversas pesquisas foi demonstrado que esta é ativa e desempenha um papel complexo na regulação do comportamento das células vizinhas, influenciando seu desenvolvimento, migração, proliferação, forma e função (AWAD et al., 2003).

No tendão, as fibras colágenas possuem uma disposição que é o resultado do seu processo de maturação, sendo usualmente organizadas em fascículos de fibras que contêm unidades menores denominadas fibrilas (BIRK et al., 1997; ASLAN et al., 2008). O diâmetro das fibras colágenas, obtido em um corte transversal, apresenta-se uniforme durante a fase inicial de desenvolvimento, mas com o avançar da idade é observado um padrão bi ou trimodal (AWAD et al., 2003). Na presença de uma lesão, é observada a tendência ao aumento da quantidade de fibras de menor diâmetro (ASLAN et al., 2008).

A maioria das lesões tendíneas em pequenos animais está relacionada ao trauma, e as lesões mais importantes envolvem secção parcial ou completa do tecido, devido à ação de objetos cortantes ou agudos, ou laceração associada com acidente automobilístico (KILLINGSWORTH, 1993; RAISER, 2000), levando a uma incapacidade funcional do membro (MORAES et al., 2000).

De acordo com Soma; Mandelbaum (1995) uma sobrecarga de trabalho sobre o tecido tendíneo leva-o à fadiga, com conseqüente reação inflamatória com rupturas parciais ou totais (BENJAMIN et al., 2008). No processo de reparo tecidual ocorre uma perpetuação de acontecimentos que envolvem diversas reações de um complexo processo biológico, cujo objetivo principal é o fechamento da lesão ou o reparo dos tecidos envolvidos (PARIZOTTO, 2003) e, segue uma sucessão de eventos; a) proliferação e migração de vários tipos celulares; b) síntese de colágeno; c) angiogênese para formação do tecido de granulação; d) e por fim, orientação das células do tendão e fibras de colágeno de maneira altamente organizada na tentativa de restaurar a estrutura e função do tendão lesado (MORAES et al., 2000).

Devido a sua baixa vascularidade, oxigenação e nutrição, o tecido tendíneo possui baixa capacidade de regeneração. No entanto, diversos estudos demonstraram que quando o tendão lesado é estimulado por meios biofísicos apropriados este cicatriza adequadamente (ENWEMEKA; REDDY, 2000). Diferente da maioria dos tecidos moles que necessitam de sete a 10 dias para cicatrizar, a cicatrização primária do tendão leva em torno de seis semanas para adquirir a resistência necessária para transmitir efetivamente a força gerada por seu

músculo homônimo (AUTEFAGE, 1999) e durante esse período os tendões devem ser protegidos por métodos imobilizadores (RAISER, 2000).

Períodos longos de imobilização levam a múltiplas complicações como atrofia muscular, aderências teno-cutâneas, alterações tróficas neurais, osteoartrite, tromboflebite, necrose de pele, osteoporose e re-ruptura do tendão (KUSCHNER et al., 1991). Essas complicações prejudicam a reabilitação motora levando a um atraso da função tendinosa (HADDAD et al., 1997). Se a cicatrização puder ser acelerada, a duração da imobilização pode ser reduzida para minimizar seus efeitos deletérios (ENWEMEKA, 1998).

### **2.1.2.Fase inflamatória**

A inflamação é um pré-requisito para que o processo de reparo aconteça e a seqüência inflamatória inicia-se imediatamente após a lesão, sendo uma resposta natural do organismo ao trauma lesivo e estende-se por três dias (AUTEFAGE, 1999). O trauma lesivo provoca ruptura dos vasos sangüíneos, ocorrendo extravasamento de sangue, plasma e fluidos teciduais para a área lesada (REYNOLDS; WORRELL, 1991).

De acordo com Józsa et al. (1998), fatores quimiotáticos e vasoativos como a norepinefrina e serotonina são secretados imediatamente após a lesão, promovendo a vasoconstrição dentro dos primeiros cinco a dez minutos. Simultaneamente, as plaquetas reúnem-se ao redor do epitélio dos vasos lesados e ao colágeno exposto, liberando fosfolípídeos que estimulam o mecanismo de coagulação, iniciando a formação de coágulo e fibrina (WANG, 1998). Fibrinas e fibronectinas formam ligações transversas com o colágeno, o que resulta em uma tênue estrutura que estanca a hemorragia local e funciona como resistência a forças de tensão durante a fase inicial de reparo (REYNOLDS; WORRELL, 1991).

Independente de sua origem, os tenócitos migram para o sítio de reparo durante as duas semanas iniciais e produzem colágeno e glicosaminoglicanas (GAGs) (JÓZSA et al., 1998). Por volta do terceiro dia pós-lesão os fibroblastos iniciam a produção de fibrilas que se agregam ao acaso no espaço extracelular, isso de certa forma colabora para proteger o tecido tendíneo contra as forças aplicadas no início da cicatrização (ENWEMEKA et al., 1998).

As moléculas de colágeno formam ligações covalentes entre si, designadas ligações cruzadas, responsáveis pela estabilidade estrutural das fibrilas, determinando a força mecânica dos tendões. Tanto o tipo quanto o número de ligações se modificam com a idade e com a função do tecido (REED; ZARRO, 1990).

A vasodilatação seguida da vaconstrição transiente provoca um aumento na pressão hidrostática e no fluxo sanguíneo (McILWRAITH, 1994). Com isso, a permeabilidade vascular aumenta em resposta às reações químicas promovidas pela histamina que é liberada pelas plaquetas, mastócitos e leucócitos granulares; e pela bradicinina que, além disso, estimula a liberação de prostaglandinas (PG) nas fases mais tardias da inflamação. As PGE-1 aumentam a permeabilidade vascular, já as PGE-2 atraem leucócitos (REED; ZARRO, 1990).

Como consequência desse estágio inicial, o plasma é extravasado entrando em contato com o tecido traumatizado (HIRANUMA et al., 1996). Clinicamente observa-se ao redor da região lesada, calor, rubor, dor e edema (REED; ZARRO, 1990). As primeiras células que migram para o sítio inflamatório são os polimorfonucleares. Essas células se originam dos capilares ainda escoantes e iniciam a ingestão de contaminantes e fragmentos produzidos pelo ferimento. Esse processo de migração e ingestão permanece por 24 horas após a lesão (EARLEY, 1981).

Quando as células mononucleares penetram no sítio lesado, cerca de um a dois dias após a lesão, se transformam em macrófagos teciduais e juntos com os linfócitos dão continuidade à fagocitose (HIRANUMA et al., 1996). Nessa fase, ocorre fagocitose das células e fragmentos de colágeno, iniciando-se a síntese de novo colágeno a partir dos fibroblastos derivados do epitendão, endotendão e dos tecidos adjacentes (REED; ZARRO, 1990; WANG, 1998). Os macrófagos e fibroblastos interagem um com o outro regulando a fase inflamatória e o processo de remodelamento da MEC (KAKAR et al., 1998).

### **2.1.3 Fase neoangiogênica**

Segundo Enwemeka et al. (1998), a neoangiogênese inicia-se por anastomoses de capilares sanguíneos próximos à área lesada, esses por sua vez se projetam para o interior da lesão formando inúmeras ramificações e desenvolvendo uma rica rede vascular. Somente 25% da irrigação é de origem muscular ou óssea, tanto distal como proximal ao tendão (BENJAMIN et al., 2008). O paratendão, bem como o mesotendão contribuem de maneira significativa com a irrigação sanguínea (McILWRAITH, 1994). A neovascularização é essencial para que o processo de reparação ocorra, pois ela garante um abundante suporte de O<sub>2</sub> e nutrientes para a área lesada, removendo o CO<sub>2</sub> e outros metabólicos (KAKAR et al., 1998).

São os vários os componentes dos fluídos da lesão que promovem a angiogênese (KAKAR et al., 1998). Dentre eles inclui-se PG, fatores de crescimento macrófágico,

leucócitos polimorfonucleares (BENJAMIN et al., 2008), linfócitos T e fator de crescimento epidermal (EGF) (CHANG et al., 1998). Segundo Chan et al. (1997), o fator de crescimento fibroblástico (FGF $\beta$  e FGF2) é envolvido na cicatrização por regular a proliferação de fibroblastos e a síntese de colágeno, induzir ativadores plasmonogênicos e colagenases no modelamento do tendão e facilitar a migração e proliferação de células endoteliais na angiênese (BENJAMIN et al., 2008). Neutrófilos, plaquetas, monócitos, macrófagos e linfócitos mantêm-se durante toda a fase inflamatória, juntamente com o sistema imune. Previamente à síntese de colágeno, novos vasos sanguíneos são formados, esta neovascularização fornece um adequado suporte de O<sub>2</sub>, assim como assegura a remoção de CO<sub>2</sub> e outros metabólitos (CHAN et al., 1997).

#### **2.1.4.Fase proliferativa**

Segundo Pereira (1994) a fase proliferativa inicia-se com a chegada dos fibroblastos, miofibroblastos e células endoteliais na área lesada. A estimulação da proliferação de fibroblastos por substâncias liberadas através das plaquetas e macrófagos, que promovem seu crescimento, acompanha a retração vascular no processo de reparo tecidual e é responsável pela deposição destes fibroblastos na MEC e síntese de colágeno (MAXWELL, 1992). Os níveis aumentados de lactato estimulam a atividade da prohidroxilase, uma enzima essencial na síntese de colágeno, e sob a condição de hipóxia os fibroblastos produzem um precursor polipeptídico do colágeno (CHANG et al., 1998). Contudo a presença de oxigênio é fundamental para a hidroxilação dos aminoácidos lisina e prolina e para a liberação do colágeno (CHAN et al., 1997).

A fibroplasia e a fibrilogênese têm início poucos dias após a lesão; essas etapas da cicatrização impõem uma tensão mecânica ao tecido tendíneo favorecendo a polimerização das fibras dentro dos feixes de colágeno (PANOSSIAN et al., 1997). Durante a fase de proliferação alguns fibroblastos adquirem características ultra-estruturais, funcionais, imunológicas e químicas que os distinguem dos fibroblastos teciduais ativos; esses fibroblastos diferenciados chamam-se miofibroblastos e são capazes de se contraírem e se moverem, contribuindo para a contração da região cicatricial, além de secretarem grande variedade de moléculas como colágeno, fibronectina, elastina, ácido hialurônico, GAGs e mucopolissacarídeos (PARIZOTTO, 2003).

A combinação de novos capilares, fibroblastos, miofibroblastos e MEC formada por colágeno e outros componentes não colagenosos, dão origem a um tecido conjuntivo

ricamente vascularizado que preenche a área lesada (JÓZSA et al., 1998). Esse tecido conjuntivo frouxo, rico em capilares sanguíneos e contendo leucócitos e matriz celular formada por fibras colágenas finas (predominantemente colágeno tipo III), ácido hialurônico e moderada quantidade de proteoglicanas recebe o nome de tecido de granulação (PEREIRA, 1994).

O depósito de colágeno aumenta progressivamente com o tempo atingindo seu pico por volta do 14º dia após a lesão. Paralelamente começa a ocorrer redução da síntese de glicosaminas, especialmente de ácido hialurônico; neste período o colágeno tipo I começa a predominar sobre o colágeno tipo III. Há simultâneas degradações de colágeno, resultando em uma grande quantidade de remodelamento, com lise de algumas fibras, agregação e aumento de novas fibras (ENWEMEKA; REEDY, 2000).

Com o processo de fibrilogênese, as fibras de colágeno se tornam progressivamente mais espessas e numerosas, as células fagocitárias vão desaparecendo e o tecido de granulação passa a ser constituído por um tecido conjuntivo progressivamente mais denso e menos vascularizado (ENWEMEKA et al., 1998). O tecido cicatricial ainda é dinâmico, a contração da cicatriz é contínua aproximando ainda mais as bordas da área lesada. Segundo Papler (2001), a contração segue uma taxa uniforme aproximada de 0,6 mm a 0,75 mm ao dia e independe do tipo de ferida, mas depende da nutrição tecidual. O colágeno existente vai sendo remodelado progressivamente, há um aumento das ligações cruzadas intermoleculares, tornando o tecido mais resistente e organizado.

De acordo com Gigante et al. (1996), há um maior alinhamento das fibras de colágeno no eixo longitudinal do tendão após um período de 21 dias de reparo tecidual. A carga mecânica imposta precocemente ao tecido acelera o alinhamento paralelo e a polimerização das fibras dentro das fibras de colágeno. Com isso, o processo de alinhamento fibrilar pode-se iniciar no quarto ou quinto dias após ruptura ou incisão tendínea (CHAN et al., 1997).

Após o colágeno depositar-se na ferida, o ganho de resistência continua a aumentar devido ao entrelaçamento e reorientação das fibras colágenas já formadas, na maturação: há um ganho quase imperceptível na resistência por ao menos dois anos, entretanto, nunca alcançará a do tendão normal (GIGANTE et al., 1996). As fibras colágenas adjacentes são submetidas a menor tensão linear que aquelas no tendão e parecem desaparecer ou ser substituídas por fibras mais finas e menores (JOHNSTON, 1985).

### 2.1.5 Fase de remodelamento

O processo de remodelamento se inicia por volta da segunda semana de cicatrização e se estende por um período de um ano ou mais (JÓZSA et al, 1998), sendo este cerca de 30 semanas para uma tenotomia parcial (POSTACCHINI; DE MARTINO, 1980). JÓZSA et al (1998), acreditam que o tendão lesado leva cerca de quatro a doze meses para alcançar uma força tensil, porém os mesmos autores relatam que o tecido tendíneo lesado conseguirá a morfologia e função biomecânica de tendões normais. Na terceira e quarta semanas, quando predomina a remodelação, os fibroblastos e colágeno próximos ao tendão começam a orientar-se paralelamente ao seu eixo longitudinal.

A orientação paralela da nova cicatriz é devido ao estresse direcional colocado nos tecidos. Esse estresse afeta apenas o colágeno depositado próximo ao tendão, enquanto a cicatriz mais afastada permanece desorganizada. Essa diferença na orientação das fibras colágenas no tecido cicatricial mais novo é definida como remodelação secundária (GIGANTE et al., 1996). Aproximadamente em oito semanas, a resistência do tendão está aumentada e, eventualmente, os fibroblastos tornam-se tenócitos inativos (WANG, 1998).

Nesta fase a cicatriz contém fibras colágenas bem organizadas e o tecido geralmente muda de predominantemente celular para fibroso, com grande quantidade de fibras colágenas. Conforme a cicatriz matura a organização das fibras colágenas dentro do tendão, altera-se (MANSKLE et al., 1984). Há um aumento gradual de força própria da cicatriz e um aumento da estabilidade das ligações moleculares. Durante este período haverá um contínuo decréscimo da capacidade da cicatriz responder a tratamentos (ENWEMEKA ; SPIELHOLZ, 1992). Alterações na arquitetura da cicatriz são mais notáveis em situações em que o tendão precisa restabelecer a função deslizante (MANSKLE et al., 1984).

O aumento da resistência do tecido lesado ocorre do remodelamento do colágeno, principalmente pelo aumento do colágeno tipo I e do aumento das ligações cruzadas entre as moléculas (PEREIRA, 1994). A maturação do colágeno e o realinhamento linear são normalmente vistos por volta do quinto dia ao sexto mês após a lesão; por volta de 60 dias, as fibras de colágeno tipo I são compactas e espessas (JÓZSA et al., 1998). Quando a cicatriz se encontra completa, cerca de 3% de seus elementos são celulares (fibroblastos, miofibroblastos, macrófagos) e o restante é colágeno (ENWEMEKA; SPIELHOLZ, 1992). Portanto, é plausível afirmar que a característica funcional acelera a proliferação fibroblástica, a fibrilogênese e o remodelamento da MEC, já que existe uma forte correlação entre a força

dos tendões e o número, tamanho e arranjo das fibras de colágeno (POSTACCHINI; DE MARTINO, 1980).

A cicatrização requer imobilização do tendão por três semanas após cirurgia, para que ele receba suprimento sanguíneo; o processo cicatricial se reorganiza e forma mínima cicatriz ao redor do tendão. O movimento restrito, após três semanas, remodela o tecido peritendíneo. É importante não romper as aderências, mas remodelar a cicatriz. Quando for permitido movimento ativo após três semanas de imobilização, o ganho de resistência será, na quinta semana, três vezes maior que na terceira semana (JOHNSTON, 1985).

### **2.1.6 Terapias tendíneas**

O tratamento das tendinites pós-trauma cirúrgico busca controlar o distúrbio circulatório e a intensidade da inflamação, porém os resultados nem sempre são satisfatórios sendo freqüente a formação de aderências. Apesar do tratamento com antiinflamatórios (sistêmicos ou locais) demonstrar efeito ainda não há a oferta de um fármaco que resulte na melhora da qualidade do tecido de reparo, ou mesmo na redução do tempo de cicatrização (MACHADO, 1999).

Com a proposta de melhorar a qualidade do tecido de reparo, além da ação antiinflamatória, foi testada a utilização de injeções intralesionais de GAGs, dentre eles, o ácido hialurônico e o fumarato de beta-aminopropionitrila (FBAPN) (ASLAN et al., 2008). Entretanto, resultados de pesquisas controladas não confirmaram a eficácia utilizada de GAGs e do ácido hialurônico em lesões tendíneas (KOBAYASHI et al. 1999). As GAGs por sua vez, tem ação no remodelamento de fibras colágenas, com ação mais eficaz quando associada ao protocolo de exercício controlado (ALVES et al., 2001).

Experimentos indicam que a infiltração intralesional de fatores de crescimento (TGF- $\beta$ 1 e IGF-1) apresentou resultados promissores. Estas substâncias são citocinas liberadas durante o processo inflamatório de tendões e demais tecidos, tendo ação moduladora na migração, proliferação e síntese celular (KOBAYASHI et al. 1999).

O animal com ruptura ou avulsão do tendão calcâneo comum apresenta-se com claudicação e pode não apoiar o membro acometido por alguns dias (PIERMATTEI; FLO, 1999). Os sinais clínicos da lesão são a hiperflexão társica e a hiperflexão do joelho (BLOOMBERG, 1993). Em lesões agudas a extremidade avulsionada do tendão estará imediatamente evidente (PIERMATTEI; FLO, 1999) e, é possível identificar cada componente do complexo tendíneo e suturá-los individualmente. Entretanto, nas lesões

crônicas as extremidades tendíneas se retraem, impossibilitando a identificação de cada componente. O complexo é tratado como uma única estrutura (FOSSUM et al., 2002).

A cirurgia do tendão requer detalhado conhecimento da sua anatomia e fisiologia. Devem-se conhecer, também, as alterações patológicas básicas que ocorrem. Uma das razões para a natureza complicada da reparação tendínea é que o cirurgião está intervindo com um tipo de cicatrização especializada, onde deseja que ela ocorra entre as extremidades rompidas, mas não entre os tendões e os tecidos adjacentes (PIERMATTEI; FLO, 1999). Infelizmente, a ferida é comum a vários tipos de tecidos periféricos e a cicatriz pode causar aderências que inibem o movimento do tendão (RAISER et al., 2000). As aderências que se formam fazem parte do processo, o que resulta na cicatrização do tendão e dos tecidos circunjacentes a essa estrutura, segundo os princípios de uma ferida - uma cicatriz (BLOOMBERG, 1993).

Aoki et al (1995) constataram que na tenorrafia, sob um ponto de vista biomecânico, a resistência elástica do tendão aumentará proporcionalmente ao número de fios que cruzarem a linha de ruptura e será incrementada quando for feito apenas um nó por ponto de síntese e quando esse for posicionado fora da área de reparação. A sutura de Kessler modificada é a que melhor se apresenta para tenorrafia (BLOOMBERG, 1993; RAISER, 2001), pois atende a maioria dos requisitos indicados por Aoki et al. (1995).

A técnica mais popular para reparação de tendão inclui uma sutura passando pelo centro do tendão, com poliéster trançado 3-0 ou 4-0 e reparação do epitendão com fio monofilamentar 5-0 ou 6-0 (WANG, 1998). Killingsworth (1993) cita que na regeneração do tendão deve-se usar um fio com máximo de diâmetro que passe pelo tendão sem traumatizá-lo. Na prática, são recomendados fios monofilamentares como o náilon e o propileno, pois suturas com superfície irregular, como o material trançado, à semelhança do poliéster ou da poliglactina 910, ou ainda do ácido poliglicólico, desliza com dificuldade entre as fibras, complicando a aproximação dos segmentos rompidos, quando da tração do fio para confecção do nó.

A importância das aderências na cirurgia em tendões está ligada à restauração da função de deslizamento. A prevenção de sua formação é fundamental, mas sua importância é reduzida em pequenos animais. A abordagem mais prática para que seja minimizada a formação de aderências aos tendões é o uso de técnica cirúrgica apropriada, mobilização passiva e cuidados pós-operatórios apropriados (BLOOMBERG, 1993).

No pós-operatório de cirurgias realizadas no tendão calcâneo, o tarso deve ser imobilizado em posição semi-estendida durante três a seis semanas e posteriormente aplicam-se bandagens por mais uma a três semanas (BLOOMBERG, 1993; PIERMATTEI; FLO,

1999). Para imobilização de membro em que se procedeu tenorrafia, tem sido utilizada imobilização externa com uso de canaletas (RAISER et al., 2001) ou interna com imobilização da articulação tarso-tibial por meio de implantes metálicos (RAISER, 2000). O exercício é restrito até oito semanas de pós-operatório, e então lentamente aumentado até o normal em doze semanas (PIERMATTEI; FLO, 1999). O prognóstico para recuperação funcional é favorável em cães, exceto nos de grande porte. Pode ocorrer hiperflexão insatisfatória do tarso, devido a falta de imobilização adequada da articulação tíbiotársica, ou devido ao retorno demasiadamente precoce às atividades normais (BLOOMBERG, 1993).

Nos casos de ruptura tendínea crônica, após trinta dias da lesão, a reconstrução do tecido torna-se difícil devido à retração das extremidades tendíneas e presença de um tecido de cicatrização extenso no local da ruptura (ARON, 1996). Nesses casos, segundo Wang (1998), a reparação do tendão pode requerer o uso de enxerto. Assim, várias pesquisas têm sido desenvolvidas no sentido de encontrar um material que seja adequado para reparação de tendão lesado. As membranas biológicas, devido a sua fácil obtenção, conservação e custo reduzido, surgiram nos últimos anos como uma alternativa de material destinado a enxertos.

Raiser et al. (2001), usaram tendão de cães e Costa Neto et al. (1999) empregaram peritônio de bovino, ambos conservados em glicerina a 98%, para reparação de tendão calcâneo comum em cães. Destacam-se ainda o emprego do transplante de fâscia lata autólogo em tendão de cães por Braden (1976), pericárdio equino conservado em glicerina a 98% em coelhos por Holzchuh et al. (1990), pericárdio bovino tratado pelo glutaraldeído em ratos por Silveiras (1990) e homoenxerto de tendão extensor digital comum de equinos, conservado em glicerina a 98%, no membro pélvico esquerdo de pôneis (CARDONA, 2006)

Os vários métodos de tratamento de lesões tendinosas refletem a necessidade de uma técnica que permita o retorno morfológico e funcional do tendão (NELLAS et al., 1996). Na tentativa de contornar problemas diversos como antigenicidade, estocagem e disponibilidade de implantes têm-se desenvolvido os chamados biomateriais para substituição de tecidos. Badylak et al. (1995) avaliaram as propriedades remodelantes da submucosa de intestino delgado de suíno como biomaterial para reconstrução do tendão calcâneo em cães e concluíram que a sobrevivência de um enxerto depende de sua adequada nutrição. Como os tendões são avasculares e seu suprimento sanguíneo é oriundo do paratendão, da junção músculo-tendínea e ósteo-tendínea (PAYNE; TOMLINSOM, 1993), enxertos neste local têm sua sobrevivência dependente de tecidos adjacentes (COSTA NETO et al. 1999).

Rezende et al. (2001) indicam poliuretano de óleo de mamona como substituto temporário do tendão calcâneo comum. O desenvolvimento dos polímeros como biomateriais

tem contribuído para o sucesso de implantes nos tecidos moles, pois além da biocompatibilidade podem ser confeccionados sob medida, adaptando-se às propriedades dos tecidos (SOKOLSKY-PAPKOV et al., 2007). Adicionalmente, os polímeros podem ter forma física variada, como líquida para preencher espaço, fibras para materiais de sutura, filme (cateter inflável) e sólida para aplicações cosmética e mecânica (AWAD et al., 2003). A descoberta de novos polímeros e copolímeros tem contribuído significativamente para a evolução do campo dos biomateriais na incorporação de tecidos orgânicos (BENOIT et al., 2006).

O reparo de um tendão dilacerado ou com um defeito, é um procedimento rotineiro em cirurgia, mas ainda não há um método cirúrgico satisfatório para total reparo deste tipo de lesão (JIANG et al., 2002). O desenvolvimento de novo tecido tendíneo poderia promover uma nova estratégia para resolver este problema cirúrgico. Como os tenócitos são células altamente diferenciadas, elas têm um potencial limitado de replicação. O cultivo de tenócitos *in vitro* seria uma possibilidade de prover o desenvolvimento de células progenitoras (CP) para tecidos tendíneos (ISODA et al., 2004). Uma nova perspectiva no tratamento das lesões esportivas, ainda na fronteira do conhecimento humano, é a possibilidade da utilização da bioengenharia e das pesquisas com células-troncos (toti ou multipotentes) na reparação dos tecidos do aparelho locomotor (CAPLAN, 1991).

O crescente interesse científico está relacionado às possibilidades que as CP oferecem em terapias celulares. Ela representa uma revolução no entendimento dos mecanismos de reparo e regeneração tecidual e, mais do que isso, a esperança para o tratamento e para a cura de diversas doenças, muitas delas extremamente complexas para o entendimento da ciência biológica até os dias de hoje (DIEBOLD et al., 2000).

As lesões dos ligamentos, tendões e cartilagem articular ainda constituem desafios para a medicina. Embora já existam modelos do uso de biomateriais para implantação de cultura de condrócitos e fatores de crescimento, ainda em fase de experimentação clínica, o maior número de estudos ainda está em fase de experimentação animal (SOKOLSKY-PAPKOV et al., 2007).

O uso de células-tronco mesenquimais (CTMs) para reconstituição de tendões em equinos e coelhos já demonstra a possibilidade real de incremento nas propriedades mecânicas das estruturas estudadas. A associação de moldes de colágeno, ou biomateriais similares, às culturas de células adultas, CTMs ou fatores de crescimento são possibilidades reais (BARREIRA, 2005).

As CTMs da medula óssea (MO) são células que se renovam e possuem multilinhagens potenciais que estão presentes no estroma da MO (JIANG et al., 2002; ISODA et al., 2004) e têm a propriedade de se diferenciar em tecidos normalmente derivados das camadas germinativas mesenquimal e ectodérmica (GRONTHOS et al., 2003) e endodérmica (REYES et al., 2002). Acredita-se ser a terapia celular tendínea com CT uma esperança para a melhora da qualidade da cicatrização de tecidos como o tendão por possibilitar a diferenciação destas células em fibroblastos que permitem um aumento da proliferação celular, da produção de colágeno e de proteoglicanos que formam a MEC (ASLAN et al., 2008). Apesar destes benefícios, as pesquisas sobre o uso terapêutico das CT vêm sendo submetidas a diversos estudos para que seus resultados sejam comprovados e técnicas melhor estabelecidas (FAGOT-LARGEAULT, 2004).

Está provado que CTMs ou estroma podem se diferenciar em tenócitos (CHAMBERLAIN et al., 2007). Pacini et al. (2007) descrevem o uso clínico de células indiferenciadas CTMs em lesões tendíneas de equínos e a recuperação clínica foi significativa, principalmente no quesito habilidade para marcha. Os autores sugerem que uma aplicação de  $2 \times 10^5$  CTMs autólogas e expandidas, são suficientes e para proporcionar regeneração adequada de lesão em tendões e também é um método seguro de tratamento.

Inicialmente era previsto somente a utilização de biomateriais como adjuvante à regeneração de tecido conjuntivo, mas, o advento de técnicas de isolamento e cultura de células estromais adicionadas a MEC favoreceu a indução e condução de novas células, sendo utilizadas recentemente na engenharia de tecidos (OREFFO; TRIFFITT, 1999).

Juncosa-Melvin et al. (2006) utilizaram esponja de colágeno embebidas em CTMs ( $1,4 \times 10^4$ ) autógenas em lesão tendínea de coelhos. Por duas semanas estimularam diariamente, durante cinco minutos, por meio de método mecânico, os membros transplantados e, concluíram que as fibras tendíneas mostraram-se histologicamente mais organizadas comparadas ao grupo que não recebeu esponja de colágenos embebidas em CTMs. Também observaram que a utilização de esponja colágena com CT melhora significativamente a biomecânica do tendão além dos limites funcionais *in vivo*.

Awad et al. (2003) demonstraram que implantes de biomateriais fabricados a partir de gel de colágeno, semeados com CTMs e implantado *in vivo* no tendão patelar de coelhos, melhorou comparativamente a reparação biomecânica nos períodos entre a 16<sup>a</sup> e 26<sup>a</sup> semanas após cirurgia. Os autores sugerem que a interação entre a densidade do colágeno com as células proporcionou melhor orientação das fibras de colágeno no desenvolvimento da regeneração do tendão.

Barreira (2005) avaliou os efeitos do implante autólogo de CTMs de MO na cicatrização tendínea, comparando tendões tratados e não tratados. Concluiu que a terapia celular tendínea com CTMs acelerou o processo de cicatrização tecidual. ZUK et al. (2001) relataram a possibilidade de se extrair as precursoras mesenquimais a partir de tecido adiposo. Neste caso, o adipócito se diferenciaria em fibroblasto indiferenciado, para depois se diferenciar em células especializadas, de acordo com o estímulo exógeno. Com o anúncio do sucesso laboratorial deste método, verificou-se a possibilidade de sua aplicação na terapia tendínea, onde as CTMs seriam estimuladas a diferenciar-se em tenócitos e estes, uma vez implantados na lesão, poderia promover uma produção mais intensa de componentes da MEC, dentre eles o colágeno tipo I (GUEST et al., 2008).

A CTM, obtidas principalmente a partir da MO e tecido adiposo, é considerada a CT mais plástica encontrada em adultos (ZUK et al., 2001). Atualmente os protocolos utilizados para sua obtenção envolvem basicamente o cultivo das células aderentes da MO ou tecido adiposo em placas plásticas. Há alguns anos foi descrito um método simples de isolamento e cultivo de CTMs a partir da MO de camundongos, resultando em populações homogêneas, caracterizadas por imunofenotipagem, e com plasticidade equivalente à das CTMs convencionais (DA SILVA MEIRELLES et al., 2006). A ocorrência de CTMs em outros tecidos tem sido pouco estudada, mais recentemente, investigaram-se a distribuição destas células em tecidos de camundongos normais, verificando que as CTMs ocorrem virtualmente em todos os tecidos (KRAMPERA et al., 2006).

Segundo Bi et al (2007) aparentemente os tendões possuem células estromais capazes de reparar diversos tipos de tecidos danificados, sugerindo novas formas de regeneração. Ao invés de exibir propriedades regenerativas associadas somente com CT, os tendões regeneram de forma lenta e incompleta. Há indícios de que uma CT como população reside entre as fibrilas que formam o colágeno e que compõem o tecido muscular que se conecta com o osso. As populações de CT adultas encontradas dentro dos tendões possuem características semelhantes entre os camundongos e humanos e receberam a sigla TSPCs (células-tronco/célulasprogenitoras do tendão) que após cultivadas *in vitro*, são capazes de auto-renovarem e diferenciarem-se em células mais especializadas. Além disso, enquanto a maior parte de células estromais são suportadas em um nicho compostas em grande parte por outras células, o nicho para TSPCs que consiste da MEC.

A descoberta do tendão que pode regenerar células *in vivo* sugere um potencial caminho para terapias. Apesar de células estromais da MO mostrarem potencial para formar

ligamentos, a sua probabilidade de formar osso torna-os arriscados. Um melhor entendimento dessas células e os TSCPs podem ajudar a superar tais limitações.

## **2.2 Marcadores fluorescentes nanocristais**

A nanotecnologia é avanço e integração das fronteiras do conhecimento de um organismo para a fabricação e utilização de estruturas funcionais com dimensões de bilionésimos de metro, isto é, na escala nanométrica (nano, do grego = diminuto) (DANESHVAR et al. 2008). Um exemplo é o próprio organismo, onde cada célula animal possui tamanho típico de 10.000 nanômetros e realiza sua função por meio de mecanismos nanoscópicos (BORM, 2006). A possibilidade biológica de entender e produzir artefatos e materiais por meio de princípios similares pode mudar completamente os métodos atuais de fabricação de materiais e produtos utilizados em eletrônica, aeronáutica, agricultura, farmacologia, biotecnologia, medicina, energia, entre outros e é conhecida atualmente como nanotecnologia (CLAPP et al., 2004).

A integração destes processos pode produzir produtos criativos, chamados pontos quânticos para o benefício da medicina como próteses mais eficientes, órgãos artificiais e ferramentas para diagnósticos médicos mais precisos (DU, 2006).

Pontos quânticos são semicondutores nanocristais com raio geralmente na escala de 10 a 100 Å (MICHALET et al., 2005), cujas propriedades ópticas sofrem o efeito do confinamento quântico, capaz de mudar ou controlar completamente o comportamento óptico desses materiais, por meio de medidas de absorção (MARSH et al., 2007). Além das aplicações na área da tecnologia de informação, os pontos quânticos encontram aplicações na área de biotecnologia, que vem ganhando cada vez mais espaço no mercado tecnológico (SUKHANOVA et al. 2002). Um exemplo é a utilização dos pontos quânticos coloidais como marcadores fluorescentes capazes de localizar proteínas específicas dentro de células (WU ; BRUCHEZ, 2004).

Na geração atual, os marcadores fluorescentes são feitos de pequenas moléculas de corantes, amplamente utilizados, desde a decodificação do DNA ao auxílio no diagnóstico de infecções (MARSH et al., 2007). Os corantes orgânicos, entretanto, podem ser tóxicos e sofrer desgaste rápido. Além disso, a geração da luminescência requer o bombeio da molécula em ressonância com alguns de seus níveis eletrônicos, o que leva à situação típica em que cada corante é excitado por fótons em comprimentos de onda diferentes (SZENT-GYORGYI et al., 2008).

Os pontos quânticos coloidais, por outro lado, não são tóxicos. Sua fluorescência contínua ativa por um tempo 100 vezes maior comparado aos corantes orgânicos (MARSH et al., 2007). Todos os pontos quânticos podem ser excitados por um único laser, permitindo a observação de diferentes compostos dentro de uma célula simultaneamente. Podem se ligar às moléculas mísseis, dirigidos à alvos moleculares específicos no interior das células ou seus núcleos (WU ; BRUCHEZ, 2004).

A área de pesquisa e desenvolvimento de nanoestruturas é muito extensa e esta atividade cresceu explosivamente nos últimos anos (SZENT-GYORGVI et al., 2008). A importância dos sistemas em pontos quânticos pode ser enfatizada através das patentes produzidas: laser de quantum dot (Qdots) em cascata (AAGAARD ; ROSSI, 2007); nanocristais funcionais e seu uso em sistemas de detecção (WU ; BRUCHEZ, 2004); fibras ópticas com pontos quânticos (SUKHANOVA et al. 2002); partículas de tamanho uniforme (MARSH et al., 2007); síntese de pontos quânticos de calcogeneto de metal (MICHALET, 2005). Já o espectro de demonstrações de aplicações dos pontos quânticos é imenso na atividade com materiais biológicos fluorescentes (SZENT-GYORGVI et al., 2008).

A similaridade de escala dos nanopontos e das macromoléculas biológicas (ácidos nucleicos, proteínas) pode permitir uma integração entre a nanotecnologia e a biologia, levando os avanços sem precedentes no diagnóstico de doenças, terapêutica direcionada, biologia molecular e biologia celular (MARSH et al., 2007). Espera-se que nanocristais ultrafinos sejam amplamente empregados em biotecnologia e aplicações médicas para separar biomateriais, para identificação de substâncias através de ação antigênica, diagnósticos e transportadores de medicamentos (TSIEN, 1998).

Quando colocados sob uma fonte de luz, os pontos quânticos brilham como sinais de néon e seu brilho dura até 48 horas depois que foi aplicado o foco de luz (BORM, 2006). Isto é tempo mais do que suficiente para acompanhar um vírus ou uma mitose celular ao longo de um processo biológico (ZHANG et al., 2002). A cor emitida pelos pontos quânticos pode ser alterada controlando-se o seu tamanho. Pontos pequenos emitem luz azul, verde ou amarela e pontos maiores brilham nas cores laranja, vermelha ou cinza (ROCO, 2005).

Pesquisas que envolvem estruturas nanoscópicas podem ser utilizadas para iluminar doenças em animais, com futuras implicações para os seres humanos. Conectando um ponto quântico a uma molécula que se liga a um tipo específico de câncer, por exemplo, com o tempo os pontos irão se acumular no tumor. Quando se acumularem, poderá ver o animal brilhar naquela região particular (NEVES, 2002). No entanto, há limitações na tecnologia. Por exemplo, a luz não penetra profundamente no organismo, o que tornaria o método viável

apenas para doenças de pele ou muito superficial (ITO et al., 1999). Os pontos quânticos também têm uma natureza oleosa, o que dificulta sua interação com os organismos vivos. Esses são alguns dos desafios que o pesquisador terá de vencer antes de tornar a nova tecnologia útil na prática (GWINN; VALLYATHAN, 2006).

### **2.2.1 Quantum dots (Qdots) na biologia celular**

Ao longo dos últimos anos, Qdots tem sido testado em muitas aplicações biotecnológicas que usam fluorescência, incluindo a tecnologia de ensaios de DNA e imunofluorescência de células de origem animal. Alguns dos primeiros e mais bem-sucedidos testes têm uso de Qdots fixados em imunofluorescência para marcação de células e tecidos; imuno-coloração da membrana de proteínas (SUKHANOVA et al., 2002), microtúbulos (AKERMAN et al, 2002), actina (WU; BRUCHEZ, 2004), de antígenos nucleares (AKERMAN et al, 2002) e fluorescência para hibridização *in situ* em cromossomos (MICHALET et al., 2005).

Qdots tendem a ser mais brilhantes do que corantes devidos os efeitos compostos que possuem coeficientes de extinção que são de uma ordem de grandeza maior que as da maioria dos corantes (DANESHVAR et al., 2008), comparável rendimento quântico, saturação de níveis de emissões e similares (MEDINA et al., 2007). Mas a sua principal vantagem reside na sua resistência à luminescência durante longos períodos de tempo (minutos a horas), permitindo a aquisição de imagens que são frescas e bem contrastadas (MICHALET et al., 2005).

CTMs derivadas da MO podem se diferenciar em osteoblastos, condrócitos, adipócitos, células musculares ou células nervosas *in vitro* e *in vivo* (PARAK et al., 2005). As CTMs podem ser facilmente obtidas através da aspiração de MO e serem utilizadas para tratamento de regeneração de tecidos de origem mesenquimal (AKERMAN et al., 2002). No entanto, a aspiração de um grande volume de medula pode causar danos e dor ao doador. Assim, é difícil obter um grande número de CTMs exigidas para obter uma regeneração adequada de tecidos lesionados. Muitas vezes a expansão das CTMs *in vitro* é necessária para obter um número desejado para aplicação clínica. Apesar do grande interesse pelas CTMs, ainda não existe protocolos bem definidos de isolamento, marcação, caracterização, identificação destas células (PARAK et al., 2005). A maior parte dos experimentos têm sido realizados utilizando a identificação das CTMs isolados principalmente da MO e colhidas por aspiração e cultivadas por adesão ao plástico, como descrito por Friedenstien et al. (1976).

Pittenger et al. (1999) relataram que apenas uma porcentagem (0,0001-0,01%) das células da MO que são aspiradas e expandidas em pratos plásticos são CTMs. O volume colhido para cultura deve ser de grande quantidade, uma vez que existem inúmeras células não aderentes tais como células hematopoéticas que devem ser lavadas e removidas, pois estas alteram o meio resultando em baixa densidade de cultura de CTMs (GWINN ; VALLYATHAN, 2006). Quando ocorre baixa densidade de cultura de CTMs, as células não proliferam imediatamente, e, exigem muito tempo para se desenvolver em colônias. As culturas de baixa densidade não são eficientes para proliferação celular porque o crescimento de fatores incluindo autócrinos e parácrinos desempenham papel importante no crescimento celular (LUCCARDINI et al., 2007).

Stephens ; Allan (2003) desenvolveram um método para produzir cultura em alta densidade utilizando nanopartículas magnéticas para promover expansão das CTMs. As partículas magnéticas variam em tamanho de nanômetros a micrômetros e têm sido usadas em um número crescente de aplicações médicas e biológicas. A única característica das partículas magnéticas é a sua reação a força magnética que é atraída por alta densidade e esse recurso é utilizado para realizar a bioseparação, incluindo células de triagem. Neste estudo, as forças magnéticas foram usadas para mover as CTMs marcadas com nanopartículas e mantidas *in situ* para cultivá-los em alta densidade. Foi investigada a aplicabilidade e a proliferação celular *in vitro* durante 17 dias em média com indução osteogênica. As CTMs magneticamente marcadas por nanopartículas foram enriquecidas usando ímãs resultando em uma densidade muito mais elevada do que a utilizada em cultura (densidade cultivada, 18 cels.cm<sup>-2</sup>). Quando CTMs foram semeados em alta densidade usando nanopartículas, houve um aumento de cinco vezes o número das células, comparativamente a cultura preparada sem nanopartículas.

Fundamentalmente nanocristais fluoróforos absorvem fótons de luz e reemitem com um comprimento de onda diferente. Essas partículas provêm luminosidade e fluorescência fotoestável que podem ser observadas por horas em tecidos marcados e ainda podem ser arquivados permanentemente e, são capazes de marcar quase todos os tipos de material de interesse biológico (PARAK et al, 2005). Segundo Donaldson et al. (2007) nanocristais fluorescentes podem ser localizados por pelo menos quatro gerações celulares, e algumas células permanecem marcadas por até duas semanas.

Resultados como estes sugerem que esse novo método de cultura usando nanopartículas magnéticas pode ser utilizado de forma eficiente e segura para expandir CTMs para a aplicação clínica (GWINN ; VALLYATHAN, 2006). As CT são identificadas

principalmente através de marcadores de superfície (KIRSCHSTEIN, 2001), e essas ferramentas novas de diagnóstico celular que incluem pontos quânticos (Qdots) magnéticos caracterizados por alta fotoestabilidade (densidade) e a excitação de um único comprimento de onda poderá ser utilizado futuramente em todos os diagnósticos celulares (HASSAN et al., 2006).

A favor desta tecnologia está a promessa para a engenharia tecidual (AAGAARD; ROSSI, 2007) e esta revolução irá produzir mudanças e efeitos positivos na saúde (ROCO, 2005). O reforço da resistência, durabilidade, flexibilidade, desempenho e imitável propriedade associadas a estas matérias tem sido explorada para prognósticos e monitoração visual da terapêutica. Com estas aplicações, sem precedentes, é provável a aplicação de nanopartículas em seres humanos (BAKER; MAUCK, 2007).

As sondas fluorescentes biológicas são utilizadas devido às suas qualidades inertes e à capacidade de interagir sem perda de sensibilidade em uma variedade de reações celulares. No entanto, existem limitações intrínsecas com vários corantes orgânicos. A gama dinâmica de nanopartículas, com diâmetros inferiores a 100 nm, com sondas associadas às moléculas de peptídeos, anticorpos, ou ácidos nucleicos para detecção de reação celular os torna ferramentas ideais para exibir a quantificação de reações moleculares *in vivo* (GWINN; VALLYATHAN, 2006).

Um número crescente de estudos sobre diagnóstico de detecção molecular tem sido publicado. Em estudos sobre fibroblastos utilizando camundongos, Wu ; Bruchez (2004) mostraram que as nanopartículas foram mais fluorescentes que os marcadores fluoróforos convencionais. Wu et al. (2003) observaram que o Qdot com base imunofluorescente foi mais eficiente que marcadores de superfície celular e têm grande eficiência para marcação de citoesqueleto, núcleo e outras organelas intracelulares. Eles também demonstraram que pontos quânticos coloidais bioconjugados foram valiosos para monitoração e imagiologia do DNA *in vivo*.

No Hospital Veterinário da UFSM e em pesquisas experimentais com a fração total de células mononucleares (FTCM), da MO tem sido observado um pronunciado efeito imunofluorescente no botão celular (TOGNOLI, 2008; OLIVEIRA, 2008), após o processamento da medula, marcação e incubação destas, a uma temperatura de 37°C e em biópsias teciduais de osso, tendão e córnea, nos tempos cicatriciais de sete, quatorze, vinte um e trinta dias, através de *imprint*. Esta imunoflorescência permitiu a confirmação e a quantificação de células mononucleares, entre elas as CT, antes da aplicação no tecido desejado e após, através de microscopia fluorescente indicando a presença de células

mononucleares em mitose no tecido em fase de evolução cicatricial. Embora os estudos experimentais estejam em fase inicial, os grupos de pesquisas da UFSM indicam a utilização de marcadores fluorescentes nanocristais quantum dots para rastrear o destino das células implantadas em tecidos com diversos graus de vascularização sem comprometer a viabilidade celular e o potencial de diferenciação.

### **2.3 Comitê de Ética em Pesquisas com Animais**

Estes estudos foram submetidos à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com animais da UFSM de acordo com os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), julgado e aprovado no processo número 23081.010242/2007-39.

## **3 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1. Modelo Experimental**

#### **3.1.1 Período prévio de adaptação**

Para o experimento foram utilizados 36 cães hípidos, de ambos os sexos, sem raça definida (s.r.d.), com idades estimadas entre um e dois anos, pesando ao redor de 10 kg, provenientes do Biotério Central da UFSM. Previamente ao experimento os animais foram medicados contra endoparasitas e ectoparasitas e, submetidos aos exames físicos, clínicos, hematológicos para a certificação da obtenção de animais hípidos. Os cães passaram por um período de adaptação ao convívio humano, ambiental e alimentar de 30 dias. Foram utilizados para o experimento os animais que se encontraram em estado de normalidade em todos os parâmetros que foram avaliados. Os animais considerados aptos foram mantidos em canis climatizados apropriados, com cuidados individuais, recebendo água e ração comercial *ad libitum* até o final do experimento.

#### **3.1.2 Grupos experimentais**

Os 36 cães foram distribuídos de forma randomizada em quatro grupos experimentais com nove cães, correspondendo a um tratamento de acordo com o modo de aplicação de MEC e terapia celular. Cada grupo de nove animais foi subdividido em três grupos: a, b, c de acordo com o tempo de avaliação citológica e biópsia histológica.

Os grupos foram denominados conforme o seguinte delineamento:

Grupo I (GI) – animais que sofreram tenectomia do tendão calcâneo comum no membro pélvico direito (MPD), retirando-se 1 cm da região média do tendão, preservando-se o paratendão. No defeito cirúrgico os animais serão tratados com a FTCM autógenas colhidas da MO, marcadas com nanocristal quantum dot (Qtraker 655®) e injetadas na MEC de esponja de colágeno hidrolizada e liofilizada (Hemospon®) e envolvidas pelo paratendão do próprio membro. Grupos de três animais foram avaliados por *imprint* citológico, *imprint* fluorescente e biópsia histológica aos sete (GIa), quatorze (GIb) e trinta dias (GIc).

Grupo II (GII) – animais que sofreram tenectomia do tendão calcâneo comum do MPD, retirando-se 1 cm da região média do tendão, preservando-se o paratendão. No defeito cirúrgico os animais foram tratados com a FTCM autógenas colhidas da MO, marcadas com

nanocristal quantum dot (Qtraker 655®) e injetadas diretamente dentro do paratendão do membro, envolvendo a lesão cirúrgica. Grupos de três animais foram avaliados por *imprint* citológico, *imprint* fluorescente e biópsia histológica aos sete (GIIa), quatorze (GIIb) e trinta dias (GIIc).

Grupo III (GIII) – animais que sofreram tenectomia do tendão calcâneo comum do MPD, retirando-se 1 cm da região média do tendão, preservando-se o paratendão. No defeito cirúrgico os animais foram tratados somente com MEC de esponja de colágeno hidrolizada e liofilizada (Hemospon®), marcadas com nanocristal quantum dot (Qtraker 655®) e envolvidos pelo paratendão do próprio membro. Grupos de três animais foram avaliados por *imprint* citológico, *imprint* fluorescente e biópsia histológica aos sete (GIIIa), quatorze (GIIIb) e trinta dias (GIIIc).

Grupo IV (GIV) – animais que sofreram tenectomia do tendão calcâneo comum do MPD, retirando-se 1 cm da região média do tendão, preservando-se o paratendão. No defeito cirúrgico os animais foram tratados somente com solução salina 0,9% marcadas com nanocristal quantum dot (Qtraker 655®). Grupos de três animais foram avaliados por *imprint* citológico, *imprint* fluorescente e biópsia histológica aos sete (GIVa), quatorze (GIVb) e trinta dias (GIVc).

### **3.1.3 Colheita de sangue para autotransfusão**

Antecedendo três dias da data de colheita de células da MO e do transplante trans-operatório das células mononucleares, todos os animais (GI, GII, GIII, GIV) foram submetidos à colheita de sangue periférico pela venopunção da veia jugular do lado direito, num total de 10 ml kg<sup>-1</sup> de sangue periférico, com auxílio de agulha hipodérmica descartável (25x7mm), após tricotomia e anti-sepsia local, utilizando-se o método gravitacional, com homogeneização mecânica suave do sangue durante o procedimento. O tempo de colheita variou entre 5 a 10 minutos. O sangue colhido foi utilizado para autotransfusão peri-operatória durante a colheita de MO, em todos os animais. Esse sangue colhido ficou armazenado em bolsas de transfusão sangüínea de plástico, devidamente datada e identificada, de acordo com a numeração do próprio animal de cada grupo, contendo 14 ml de CPDA (citrato de sódio, fosfato, dextrose e adenina), e refrigerado em geladeira comum a uma temperatura de 4°C até sua utilização no trans-operatório.

### 3.1.4 Colheita da FTCM da MO

Previamente à anestesia, no momento determinado pré-colheita de MO, colheu-se da veia jugular esquerda de cada animal, 2 ml de sangue periférico para análise das variáveis hemácias (He), hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht), leucócitos (Leu) e proteína plasmática (PP). Após todos os procedimentos de tricotomia da área lombar da crista ilíaca até os coxins plantares do MPD, os animais foram anestesiados. O pré-operatório constou de jejum alimentar de 12 horas e hídrico de seis horas. A medicação pré-anestésica foi feita com acepromazina ( $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e fentanil ( $0,002 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) aplicadas por via intra-muscular (IM). A anestesia epidural foi realizada com morfina ( $0,1 \text{ mg.kg}^{-1}$ ), lidocaína 2% ( $0,25 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e bupivacaína 0,25% ( $0,25 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Realizou-se a indução anestésica com propofol ( $4 \text{ mg kg}^{-1}$ ) pela via endoflébica e, como manutenção anestésica utilizou-se anestesia geral inalatória com halotano vaporizado em oxigênio a 100%, administrado em circuito semi-fechado. Para a profilaxia antimicrobiana trans-operatória foi utilizado cefalotina ( $30 \text{ mg kg}^{-1}$ ) por via intravenosa (IV) e, para analgesia foi administrado parecoxib sódico ( $2 \text{ mg kg}^{-1}$ ) (IV).

Durante todo o procedimento, foi administrada solução fisiológica 0,9% em gotejamento venoso de 10 a  $15 \text{ ml kg}^{-1}\text{h}^{-1}$  e, com auxílio de um oxímetro de pulso foi monitorada a perfusão capilar e pressão arterial por meio de um sensor conectado à língua do paciente, enquanto um aparelho de eletrocardiograma monitorou o ritmo cardíaco.

Os animais foram colocados em decúbito lateral direito e submetidos à colheita de sangue da MO. As amostras foram obtidas por punção rotacional e aspiração com o auxílio de agulha do tipo Steis (15 G X 3") (Figura 1A). O local da punção foi realizada na fossa trocântérica do MPD (Figura 1C). A colheita foi realizada com seringas de 20 ml previamente heparinizadas com liquemine (10.000 UI) (Figura 1B). Para penetrar no espaço medular dos ossos foi aplicada uma pressão manual, moderada à agulha, girado-a e alternando os movimentos para direita e esquerda (Figura 1B). Por meio de uma pressão negativa na seringa, foi colhida a MO dos ossos na quantidade total necessária de  $10 \text{ ml kg}^{-1}$ . A medula foi colhida e transferida para a bolsa de colheita de MO, *Kit Collection Bone Marrow*® (Figura 2A), contendo 0,1 ml de liquemine e 10 ml de solução salina 0,9% para cada 100 ml de MO. No momento em que se colheu metade do volume de MO desejado, chamado de trans, foi colhido novamente 2 ml de sangue periférico da veia jugular, para análise das He, Hb, Ht, Leu, PP. Em seguida os animais receberam autotransfusão.

Finalizando a colheita, o total de sangue intramedular colhido passou pelo pré-filtro de 500 microns e pelo filtro de 200 microns acoplados em linha, no *kit collection*, para filtragem

das espículas ósseas (Figura 2B e 2C) e acondicionadas em bolsa de transporte estéril (Figura 2D).

No momento da colheita, uma alíquota de 1 ml de MO foi dividida em duas frações de 0,5 ml e encaminhadas para o LACVET para contagem manual da porcentagem de células nucleadas totais e teste de viabilidade celular com o corante vital azul de Trypan em lâmina de microscopia (Figura 4), sendo considerada aceitável uma viabilidade >90%. A outra fração de 0,5 ml foi usada para confecção de esfregaços em lâminas microscópicas para exame de mielograma (osteomiograma) e análise morfológica das células da MO. Foram confeccionadas 10 lâminas por amostra e coradas com *kit* panótico rápido (álcool fixador - corante eosinofílico – corante basofílico). Após o término da colheita de MO e da autotransusão sangüínea e, 96 horas após a colheita de MO, foram colhidos 2 ml de sangue periférico da veia jugular de cada animal para análise morfométrica de He, Hb, Ht, Leu e PP.



Figura 1- Colheita de medula óssea aspirada. A) Agulha ergonômica reutilizável do tipo Steis (15 G X 3''), de aço inoxidável, utilizada para colher grande quantidade de medula óssea com mandril interno de 2 mm e conector luer-lock para acoplar uma seringa. B) Amostras de medula óssea obtidas por punção rotacional e aspiração com auxílio de seringas de 20 ml heparinizadas. Notar a introdução da agulha anatômica na fossa trocantérica do osso femoral no MPD. C) Local exato de introdução da agulha Steis na fossa trocantérica no MPD representada por imagem radiográfica.

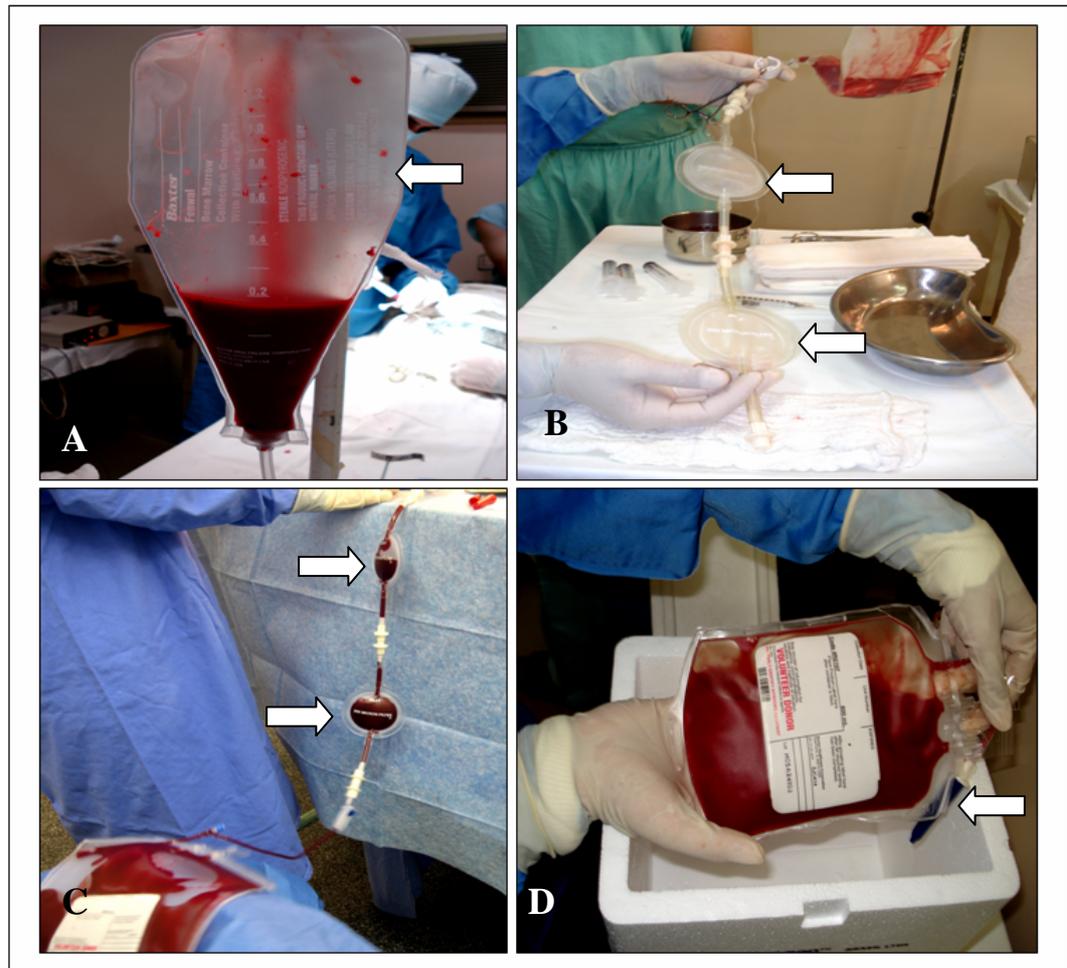


Figura 2- Descrição do Kit de medula óssea para colheita, filtração e armazenamento. A) Bolsa de colheita de MO Kit Collection Bone Marrow (seta). B e C) Pré-filtros flexíveis de 500 microns e 200 microns (seta) acoplados em linha por onde a MO é filtrada antes de ser armazenada. D) Bolsa de transporte e acondicionamento de MO, estéril e ermeticamente fechada com hemostato, forrada com protetor de extremidades (seta). Notar que o transporte da medula óssea é efetuado em caixa de isopor fechada para impedir a variação da temperatura ambiente.

### 3.1.5 Obtenção de soro autólogo

Foram colhidos 7 ml de sangue periférico da veia jugular (n=36), no momento pós da colheita de medula óssea, que foram colocados em tubos de bioquímica de vidro, sem anti-coagulante, com capacidade para 15 ml, previamente esterilizado em autoclave, a 121°C por 15 minutos, fechado de forma hermética e enviado ao LACVET, para obtenção de soro autólogo individual. O sangue colhido foi colocado em banho Maria a 37° C por 10 minutos para obter melhor retração do coágulo sangüíneo e centrifugado a 1800 rotações por minuto (rpm) (495 X G), por 6 minutos. Em seguida foi encaminhado ao laboratório de isolamento de células mononucleares.

### 3.1.6 Quantificação manual das células nucleadas (CN) totais e viabilidade celular do sangue da MO

Uma amostra de 0,5 ml do material recebido da MO após colheita foi transferido para endorfees estéreis; 0,1ml do sangue foram diluídos e contados manualmente em lâmina de Neubauer. O valor obtido foi multiplicado pela quantidade total de sangue colhido da MO (10 ml kg<sup>-1</sup>) dividido pelo peso do animal.

$$N = \frac{X \text{ (células nucleadas contadas)} \times V \text{ (volume da amostra total)}}{P \text{ (Peso do receptor)}}$$

**N**= número total de células nucleadas por kg do animal

**X**= número de células nucleadas contadas manualmente

**V**= volume da amostra total da medula colhida do animal

**P**= peso do receptor

### **3.1.7 Isolamento da FTCM da MO**

A MO colhida ( $10 \text{ ml.kg}^{-1}$ ) foi separada em tubos Falcon de 50 ml, centrifugada a 1600 rpm (440 X G) e isolada em gradiente de densidade Histopaque® 1.077, de acordo com a técnica de Boyum modificada (Figura 3A). O halo contendo a FTCM foi colhido com pipeta automática (Figura 3B), lavada em solução salina 0,9% e DMEM com glicose a 2% estéril, para novamente serem centrifugadas por cinco minutos com intuito de remover os agregados celulares e novamente lavadas em solução salina 0,9% e DMEM com glicose a 2% estéril, obtendo o produto final o botão celular padronizado em 500  $\mu\text{l}$  (Figura 3C). Uma pequena fração (70  $\mu\text{l}$ ) de CM suspensas foi colhida com pipeta automática para quantificação manual da porcentagem de células mononucleares, e teste de viabilidade celular com azul de Trypan 1% em lâmina de Neubauer, sendo considerada aceitável uma viabilidade acima de 90%. O restante do botão (430  $\mu\text{L}$ ) contendo a FTCM foi marcado com nanocristal quantum dot (Qtracker 655®) e incubado para posterior aplicação terapêutica.

### **3.1.8 Teste de viabilidade das células mononucleares da MO**

Para determinar a viabilidade celular das CM, em um tubo de hemólise individual foi colocado 50 $\mu\text{l}$  da FTCM e 50  $\mu\text{L}$  de corante azul de Trypan 1% e submetido a homogeneização. Uma gota dessa mistura foi transferida para uma lâmina de Neubauer para a leitura em microscopia de luz (Figura 4). As células de coloração azul foram descartadas da quantificação por serem consideradas inviáveis.

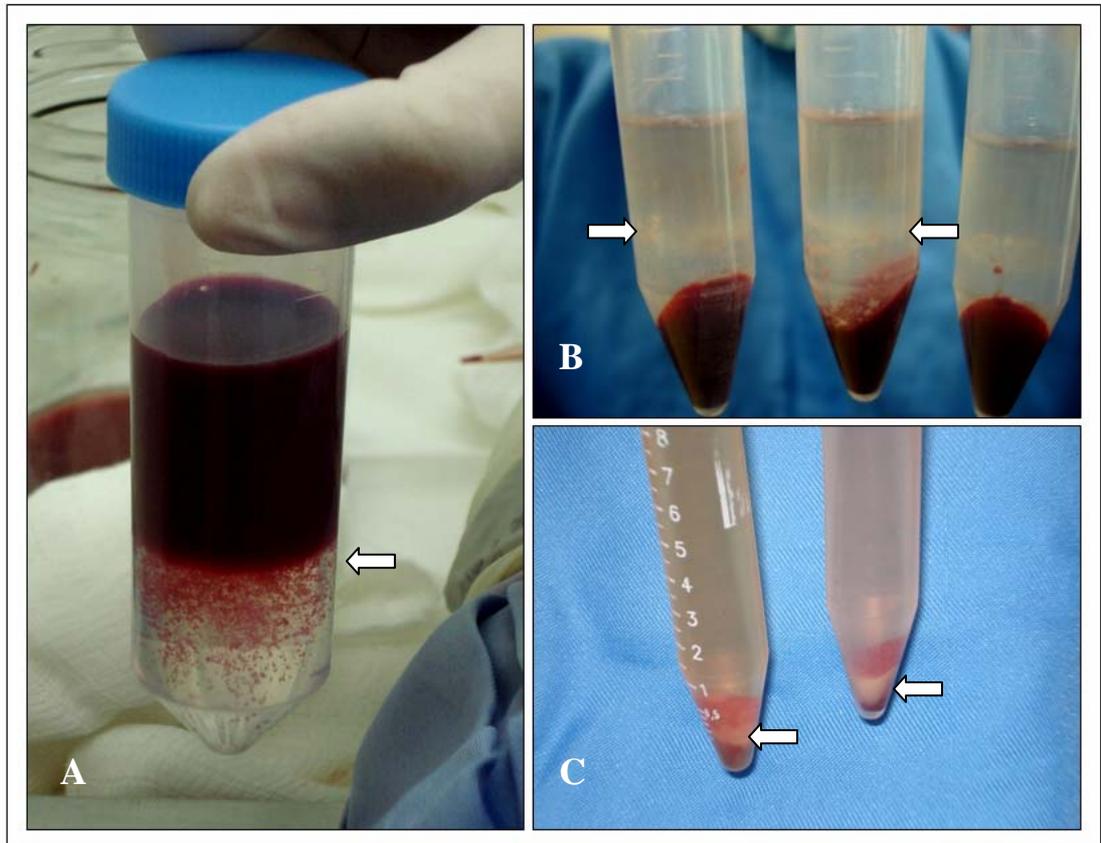


Figura 3- Técnica de isolamento da FTSCM da medula óssea. A) Isolamento das CM por gradiente de densidade Histopaque 1.007. Notar a separação dos meios por diferença de densidade (seta). B) Halo de células mononucleares (seta) obtidos após centrifugação durante 30 minutos. C) Botão celular final, de coloração esbranquiçada, contendo a FTSCM da MO (seta).

### 3.1. Período trans-operatório para transplante da FTSCM e MEC de colágeno

Após tenectomia do tendão calcâneo direito, os animais do grupo GI receberam MEC de colágeno hidrolizado e liofilizado (Hemospon®) embebidos na FTSCM autógenas (Figura 5C), marcadas com nanocrystal. Em seguida os planos abordados foram reconstituídos com pontos simples isolados utilizando fio mononáilon 4-0.

Os animais do grupo GII receberam a injeção contendo 1,5 ml da FTSCM com soro autólogo, marcadas com nanocrystal que foi injetada no interior do paratendão já suturado. Em seguida os planos abordados foram reconstituídos com pontos simples isolados utilizando fio

mononáilon 4-0.

Os animais do grupo GIII receberam MEC de colágeno hidrolizado e liofilizado embebidos com 1,5 ml de soro autólogo marcado com nanocrystal, introduzidos dentro do paratendão e posteriormente suturado. Em seguida os planos abordados foram reconstituídos com pontos simples isolados utilizando fio mononáilon 4-0.

Nos animais do GIV foi injetada 1,5 ml de solução fisiológica 0,9% marcadas com nanocrystal dentro do paratendão já suturado. Em seguida os planos abordados foram reconstituídos com pontos simples isolados utilizando fio mononáilon 4-0.

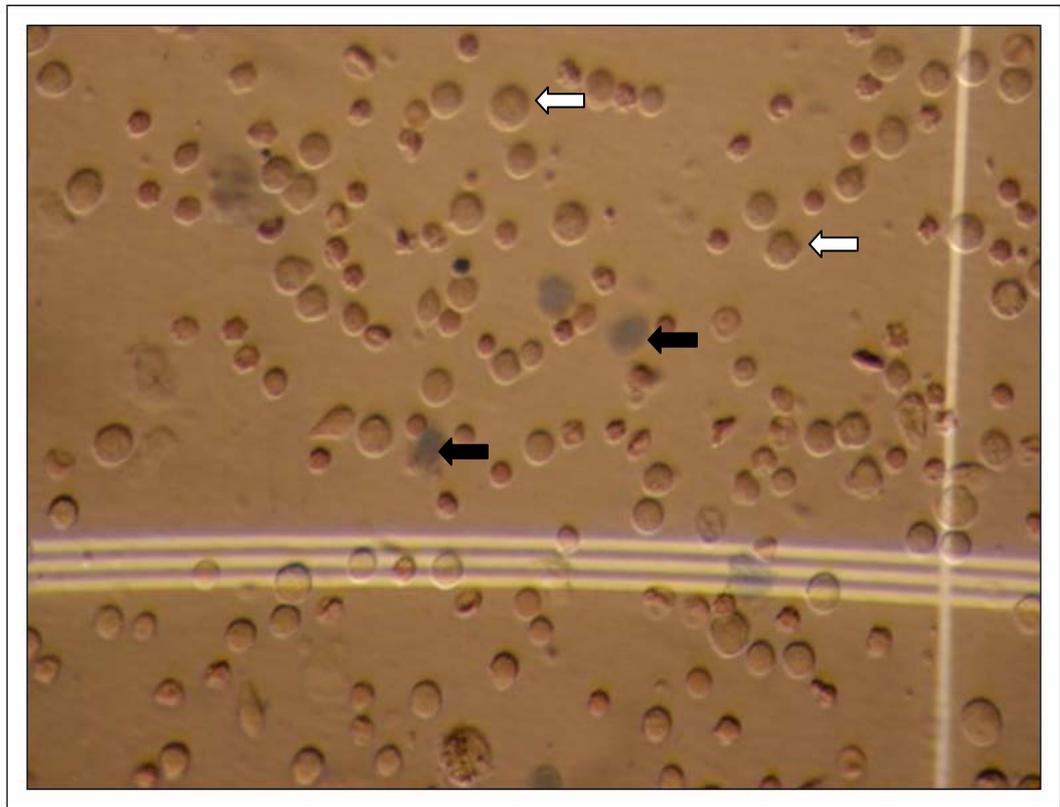


Figura 4- Leitura da viabilidade celular com corante azul de Trypan, em lâmina de Neubauer observada em microscópica óptica. Células claras - viáveis (seta clara). Células escuras - inviáveis (seta escura). (Ampliação da objetiva 40x).

### 3.1.10 Marcação da FTCM da MO com nanocrystal quantum dot

Grupos GI e GII: após o processamento e isolamento da FTCM da MO, foi colocado em um ependorf estéril o marcador fluorescente nanocrystal Qtracker 655®. Misturou-se 1µl de reagente fluorescente A (vermelho) e 1µl de reagente fluorescente B (incolor). Esta mistura ficou incubando em temperatura ambiente por cinco minutos e após, foi adicionada a FTCM da MO e submetidos à agitação em vórtex por 30 segundos. Essa mistura foi incubada por 45 minutos a 37° C para ocorrer a endocitose celular. Após a incubação, retiraram-se com uma pipeta automática 30µl do botão celular marcado que foi encaminhado ao Laboratório de Virologia para análise qualitativa da fluorescência das células mononucleares presentes no botão celular. A solução com a FTCM acondicionada no ependorf contendo o nanocrystal quantum dot foi diluída em 1,5 ml de soro autólogo e encaminhado ao LACE para ser injetado na MEC de colágeno ou no interior do paratendão, no local da lesão cirúrgica.

Grupo GIII: em um ependorf estéril foi colocado o marcador fluorescente nanocrystal Qtracker 655®: misturou-se 1µl de reagente fluorescente A (vermelho) e 1µl de reagente fluorescente B (incolor). Esta mistura ficou incubando em temperatura ambiente por cinco minutos e foi diluído em 1,5ml soro autólogo. Essa mistura foi incubada por 45 minutos a 37°C e retiraram-se com uma pipeta automática 30µl da solução marcada e encaminhada ao Laboratório de Virologia para análise qualitativa da fluorescência. O restante da solução contendo soro autólogo marcado foi encaminhado ao LACE para ser injetado, no MEC de colágeno e introduzido no local da lesão tendínea, criada experimentalmente no ato da intervenção cirúrgica.

Grupo IV: em um ependorf estéril foi colocado o marcador fluorescente nanocrystal Qtracker 655®: misturou-se 1µl de reagente fluorescente A (vermelho) e 1µl de reagente fluorescente B (incolor). Esta mistura ficou incubando em temperatura ambiente por cinco minutos e foi diluído em 1,5 ml de solução salina 0,9%. Essa mistura foi incubada por 45 minutos a 37°C e retiraram-se com uma pipeta automática 30µl da solução marcada e encaminhada ao Laboratório de Virologia para análise qualitativa da fluorescência. O restante da solução foi encaminhado ao LACE para ser injetada dentro do paratendão, no local da lesão tendínea, criada experimentalmente no ato da intervenção cirúrgica.

### **3.1.11 Procedimento Cirúrgico**

#### **3.1.11.1 Período pré e trans-operatório**

Os animais já estavam recuperados da anestesia para colheita de MO ocorrido há uma hora e meio antes e foram novamente anestesiados conforme protocolo descrito anteriormente.

Após todos os procedimentos para cirurgia asséptica, cada animal sofreu tenectomia parcial do tendão calcâneo comum direito (Figura 5A). Para acesso ao tendão foi realizada uma abordagem pela face media por incisão de pele e tecido subcutâneo, até a exposição do tendão, preservando o paratendão. O tendão calcâneo exposto, reparado com duas agulhas hipodérmicas, foi seccionado proximal e distalmente, em uma área medial à exposição e, o segmento retirado foi de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>, medido com régua calibrada estéril anteriormente a incisão.

Em seguida, a tenectomia foi realizada com auxílio de duas agulhas hipodérmicas introduzidas transversalmente para facilitar a sustentação das extremidades dos cotos remanescentes do tendão que foram alinhados para tenorrafia primária. As suturas do tendão foram feitas com fio de mononáilon 3-0, pela técnica de Kessler modificada (KESSLER ; NISSIM, 1969). Suas extremidades não foram aproximadas, ficando um espaço entre elas de 1 cm preenchida pelo fio mononáilon 3-0 e por um fragmento de esponja hemostática de colágeno hidrolisado liofilizada (Hemospon®), medindo 1x1x1 cm, nos grupos GI e GIII (5B), fazendo a ponte de união entre os cotos das extremidades que foi envolvido pelo paratendão preservado. Nos grupos GII e GIV, após a tenectomia, os cotos remanescentes foram alinhados para tenorrafia primária somente pelo fio mononáilon 3-0 e envolvidos pelo paratendão preservado. A síntese do paratendão em todos os grupos foi realizada com pontos simples contínuos e fio absorvível sintético Vicryl® (poliglactina 910) número 4-0.

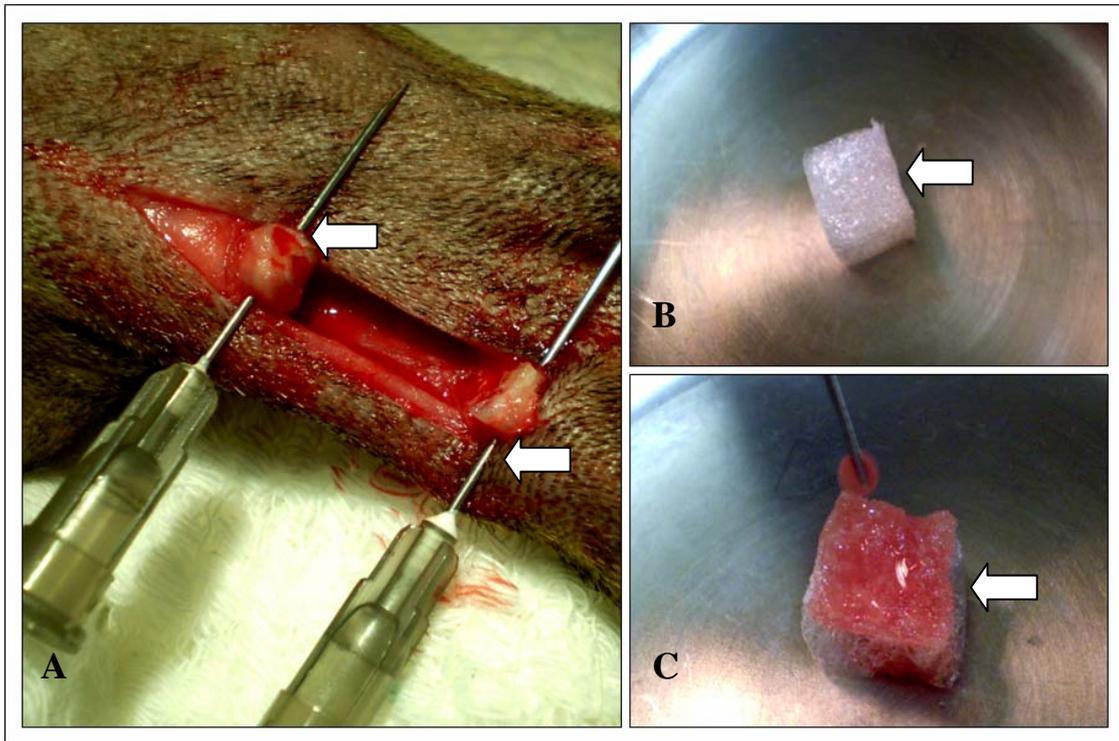


Figura 5- Intervenção cirúrgica do tendão calcâneo do MPD de cães para implante de esponja de colágeno (MEC), embebida com células mononucleares da medula óssea. A) Tenectomia parcial do tendão calcâneo comum do MPD, com extremidades ancoradas com agulhas hipodérmicas (seta). B) Esponja hemostática de colágeno hidrolizada e liofilizada (Hemospon®) medindo 1x1x1 cm, pesando 10 mg (seta). C) Esponja hemostática de colágeno hidrolizada e liofilizada embebidas na FTCM autógena da MO (seta) antes de ser implantado na falha cirúrgica.

### 3.1.12 Imobilização da articulação tíbio-tarsiana

A articulação tíbio-tarsiana (GI, GII, GIII, GIV) foi imobilizada com um pino de Steinmann de diâmetro 2 mm (SCHMITT et al., 1993). Este pino foi introduzido de forma normógrada fechada, intra-articular, por meio do calcâneo e alojado no canal medular da tíbia. Ao final da introdução (dois terços do canal medular da tíbia), o pino foi dobrado e cortado. Esta dobra foi acomodada no tecido subcutâneo para minimizar a contaminação e a articulação permaneceu imobilizada pelo período determinado a cada grupo entre 7, 14 e 30 dias e foram submetidos à caminhadas com guia três vezes ao dia em terreno plano.

### **3.1.13 Analgesia pós-operatória**

No pós-operatório imediato foi administrada morfina ( $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ ) por via epidural entre L7 e S1 para potencializar a analgesia. Após a intervenção todos os animais receberam analgesia com parecoxib sódico ( $2 \text{ mg kg}^{-1}$ ) SID, durante três dias consecutivos

### **3.1.14 Estudo clínico**

A avaliação clínica iniciou no pós-operatório imediato e continuou diariamente até o final do experimento e, semanalmente receberam notas graduadas de acordo com o grau de deambulação. Foi estimada a recuperação do uso funcional do membro pélvico direito, mediante cinco graus, de acordo com as características de deambulação, em graus correspondentes pela tabela modificada de Tudury ; Raiser (1985) conforme. Quadro 1.

Quadro 1 – Características da deambulação, em graus correspondentes, para avaliação clínica pós-operatória de cães submetidos à terapia da tenectomia aguda com MEC de colágeno liofilizada e hidrolizada e transplante de células mononucleares da medula óssea.

<b>GRAU</b>	<b>DESCRIÇÃO</b>
I	não usa nem apóia os membros
II	uso e apoio infreqüentes dos membros durante estação e ao caminhar deitando-se com freqüência. Não sustenta o peso no (s) membros(s) afetados(s) elevando-os ao correr (carrinho anterior)
III	uso claudicante do(s) membros(s) na estação e ao caminhar. sustentação parcial do peso, elevando o(s) membro(s) ao correr
IV	caminha sem claudicar e posiciona-se normal em estação. claudica ao correr sem elevar o(s) membro(s)
V	uso funcional do membro

Tudury; Raiser (2000)

### **3.1.15 Estudo histológico e citológico**

Para a obtenção das amostras para *imprints* e biópsia tecidual, os animais foram anestesiados conforme o protocolo descrito inicialmente e submetidos à cirurgia asséptica. No momento da exposição do tendão, foi retirado um fragmento que acolhesse ambos os cotos tenectomizados de cada animal. O fragmento colhido foi colocado em placa de Petri e com uma lâmina de bisturi número 10, foi seccionado em quatro outros fragmentos no sentido longitudinal e transversal. Com uma pinça anatômica, estes fragmentos foram pressionados contra as lâminas, perfazendo um total de 10 lâminas por amostra e encaminhados para

coloração com *kit* panótico rápido e submetidos à leitura em microscopia óptica. Em seguida, foram colocados 5 ml de solução fisiológica 0,9% na placa de Petri onde os fragmentos ficaram hidratando por 20 minutos. Após, todos os fragmentos foram novamente seccionados em duas extremidades no sentido longitudinal e foram pressionados manualmente em novas lâminas de vidro estéreis.

De todas as amostras colhidas foram confeccionadas cinco lâminas e observadas em microscopia de luz fluorescente de iluminação contínua para visibilizar a presença de células mononucleares refletidas. As células que emitiram luz fluorescente foram avaliadas por estudos qualitativos.

As amostras fragmentadas colhidas foram identificadas e fixadas em formalina a 10%, pH 7,2, por 24 horas, processadas segundo as técnicas rotineiras de laboratório pelo método Hematoxilina e Eosina (HE). Os cortes histológicos foram feitos com espessura de 5  $\mu$ , com cortes distanciados entre si no mínimo a cada 50  $\mu$ , e examinadas ao microscópio óptico nos aumentos 100X, 200X e 400X (LUNA, 1968; PROPHET et al., 1994) para observar a evolução do processo cicatricial, guiadas pela presença de células fibroblásticas, colagenosas, neoangiogênese e, a presença de inflamação, guiados pela presença de hemácias, coágulos, fibrina, células polimorfonucleares- PMN e mononucleares ).

Após a obtenção das amostras dos tendões, os cotos remanescentes foram alinhados para tenorrafia primária, permanecendo um espaço entre os cotos proximal e distal. As anastomoses foram realizadas com fio de mononáilon 3-0, pela técnica de Kessler modificada preenchendo os espaços entre as extremidades dos cotos proximal e distal. Os planos abordados foram reconstituídos com mononáilon 3-0. A articulação tíbio-tarsiana (GI, GII, GIII, GIV) permaneceu imobilizada com pino Steinmann de diâmetro 2 mm até completarem 30 dias de avaliação do pós operatório, tempo previsto para retirada do pino e doação dos animais.

### **3.1.17 Análise estatística**

Os resultados obtidos neste estudo são apresentados em anexo no formato de média e desvio-padrão. As análises estatísticas foram conduzidas a partir dos dados de todos os animais incluídos nos grupos estudados. A comparação entre as leituras nos diferentes tempos para as variáveis: número de hemácias, número de leucócitos, hematócrito, concentração de proteína plasmática e concentração de hemoglobina, foi efetuada pelo teste  $T^2$  de Hotelling (LITTEL et al., 1991), usando-se o procedimento GLM (General Linear

Models) do software computacional estatístico SAS<sup>®</sup> (Statistical Analysis System, 2003). Para atenderem-se as pressuposições teóricas implícitas do referido teste, houve necessidade de se transformar as variáveis número de hemácias e número de leucócitos elevando-se os seus valores à potência  $\frac{1}{2}$  (transformação raiz quadrada), conforme sugerido pela análise descritiva dos dados. Porém, os resultados são apresentados na escala original destas variáveis. As comparações entre grupos, dentro de cada tempo (7, 14 e 30 dias) referente aos escores de deambulação foram testadas por meio de contrastes de médias por meio de um modelo linear generalizado para dados multinomiais (DOBSON, 2002), com função de ligação *cumlogit* utilizando-se o procedimento GENMOD (Generalized Linear Models) do SAS<sup>®</sup>. As variáveis cicatrização (fibroblastos, colágeno, vasos sanguíneos) e inflamação (hemácias, coágulos, fibrina, células PMN e mononucleares), foram avaliadas por meio das médias das notas graduadas de três observadores independentes e analisadas por meio de contrastes de médias utilizando-se um modelo misto implementado no procedimento MIXED do SAS<sup>®</sup>. Para todos os testes efetuados foi considerado o nível mínimo de significância de 5% .

### **3.1.18 Doação dos animais do experimento**

Após o término do experimento e período de avaliação pós-cirúrgica de 30 dias, todos os animais foram doados.

## **3.2 RESULTADOS**

### **3.2.1 Modelo experimental**

Os cães submetidos ao experimento permaneceram em ambiente climatizado e rigorosamente higienizado, favorecendo a recuperação anestésica e pós-cirúrgica e o controle do estado da saúde animal durante o tempo do experimento. Todos os animais apresentaram rápida recuperação pós-cirúrgica sem qualquer anormalidade clínica ou laboratorial observadas durante todo o seguimento experimental, não ocorrendo óbito em nenhuma das etapas cirúrgicas.

### **3.2.2 Intervenção cirúrgica**

O protocolo anestésico cirúrgico empregado nos momentos da colheita de MO e durante o procedimento cirúrgico de tenectomia, mostrou-se satisfatório e garantiu a manutenção dos sinais vitais e a oximetria manteve-se sempre acima de 90%.

Na técnica cirúrgica empregada optou-se por um único acesso, obtido por meio de uma incisão de aproximadamente 7 cm de comprimento na face medial da tíbia, desde seu terço médio até a porção proximal do tarso, expondo-se assim as estruturas que envolvem o tendão calcâneo. A realização de uma ampla incisão proporcionou boa exposição e manipulação do tendão, facilitando a abordagem para o transplante das células e introdução de MEC. Na abordagem cirúrgica verificou-se presença de vascularização proveniente do tecido subcutâneo que, macroscopicamente, circundava o tendão estendendo-se ao paratendão.

Ocorreram pequenos sangramentos quando da incisão do paratendão, tecidos adjacentes e tenectomia. O sangramento dos tecidos abordados, ou mais raramente a partir do paratendão, foi controlado por meio de hemostasia cuidadosa. Após secção do tendão calcâneo comum foram facilmente identificados os feixes dos cotos das extremidades, facilitando a realização da sutura de sustentação.

A falha criada cirurgicamente, de aproximadamente 1 cm, foi suficiente para a função requerida, ou seja, avaliar a capacidade do transplante de CM em orientar a cicatrização tendínea, uma vez que, neste caso, havia ausência de contração muscular e a falha foi realizada na região média do tendão.

A colocação das agulhas hipodérmicas foi de fundamental ajuda na confecção da sutura, servindo como anteparo contra a retração tendínea e suporte para manipulação do tendão. O uso de técnica atraumática permitiu sutura adequada. Apesar de serem os animais de pequeno porte, o diâmetro tendíneo destes permitiu adequada sustentação da tenorrafia pelo modelo de Kessler modificado com fio 3-0 e síntese do paratendão com o modelo simples isolado 4-0 com mononáilon. Essa técnica assegurou a manutenção dos cotos em posição anatômica nos locais de ancoragem durante o trans e pós-operatório, mantendo aproximadas as bordas do tendão nas duas extremidades sem comprometimento da circulação intrínseca e extrínseca. A irrigação com solução salina durante o ato operatório manteve o leito tendíneo umedecido e livre da presença de sangue e coágulos.

### **3.2.3 Imobilização da articulação**

A imobilização da articulação com pino Steinman, introduzido de maneira normógrada, mostrou-se adequada para imobilização e sustentação do peso dos animais e não necessitou de reajuste. Como a extremidade distal do pino ficou acomodada no tecido subcutâneo não foi observada contaminação em nenhum dos grupos e nas observações do pós-operatório foi verificado que os animais se adaptaram facilmente e não apresentaram dificuldade de marcha. Essa imobilização permitiu o apoio do membro desde a primeira semana de pós-operatório.

Não se observou, em nenhum dos animais, deiscência de sutura e presença de secreção nem edema na área seccionada o que permitiu fácil divulsão na exposição do calcâneo comum no momento das biópsias.

### **3.2.4 Técnica de colheita de medula óssea**

A agulha tipo Steis, anatômica favoreceu a colheita de volume sangüíneo necessário, em menor espaço de tempo, sem danificar a viabilidade celular. Verificou-se a necessidade de treinamento do responsável pela colheita, uma vez que nas primeiras punções percebeu-se certa dificuldade de perfuração óssea. A partir do treinamento, essa dificuldade foi completamente sanada. O método de colheita com a introdução da agulha anatômica na fossa trocântérica demonstrou ser adequado para a punção de medula óssea de forma rápida, não deixando seqüelas de dor ao animal durante o pós-operatório.

Inicialmente houve dificuldade na distinção macroscópica entre medula óssea e sangue periférico, porém após o período de ajuste da técnica de punção, tornou-se possível a identificação das amostras em microscopia óptica. Características como consistência gelatinosa, presença de agregados celulares, grânulos (espículas) e glóbulos de gordura foram observados em MO, características bem diferentes do sangue periférico.

Apesar da possibilidade de definição macroscópica da origem da amostra, esta foi sistematicamente confirmada pela microscopia óptica em coloração com panótico rápido a qual se revelou adequada para a análise da morfologia celular da medula. Em todas as lâminas confeccionadas para leitura da morfologia da medula óssea, durante a colheita, não foi verificada nenhuma alteração celular que chamasse atenção.

A classificação da amostra foi especialmente útil na fase de treinamento para a punção, onde se percebeu que a obtenção de maior número de células mononucleares ocorreu nas primeiras quatro punções ósseas. O número de células foi diminuindo à medida que se colhia a medula, dessa forma, a agulha era introduzida para um nível mais profundo do osso e novamente conseguia-se colher uma grande quantidade de conteúdo medular, mas com números de células mononucleares inferior às das primeiras punções.

Em média, obteve-se 10 ml kg<sup>-1</sup> de medula de cada animal, sendo este volume obtido no máximo por três punções na fossa trocantérica. Inicialmente foi utilizada seringa de 20 ml heparinizada para promover pressão negativa, sendo esta posteriormente substituída por seringas de 10 ml igualmente lavadas com heparina.

### **3.2.5 Kit bone marrow collection**

O equipamento foi ideal para filtrar a quantidade de 10 ml kg<sup>-1</sup> de sangue da medula óssea sendo que este tem capacidade para colher até 1 litro de sangue da medula. O material de armazenamento sempre foi mantido em posição vertical com a tampa protetora e o lacre da bolsa fechados durante a aquisição da medula e abertos somente quando os filtros e bolsa coletora foram conectados. Não ocorreu nenhum caso de perda de sangue por desconexão dos filtros.

O *kit collection* vem acompanhado de um suporte metálico para bolsa de colheita e uma haste suporte que deve ser esterilizada em vapor ou óxido de etileno. No entanto, os *kits* deste experimento não vieram acompanhados desta haste e para manter a bolsa no sentido vertical foi utilizado um suporte para fluido, envolvido por capa de tecido protetora devidamente esterilizada também em autoclave.

Após a utilização, o equipamento foi detalhadamente lavado em água quente até obter sua limpeza integral e em seguida, ficou mergulhado em água deionizada por 30 minutos e mais uma vez lavado dez vezes, secado em ar comprimido e encaminhado à esterilização. O uso desta metodologia de limpeza permitiu segurança e eficiência no reaproveitamento total de todos os itens que acompanham o *kit collection*.

### **3.2.6 Colheita de sangue periférico nos momentos pré, trans e pós colheita de medula óssea**

Os resultados das análises das médias da morfometria sangüínea de hemáceas (He- $\mu$ l), hematócrito (Ht-%), hemoglobina (Hb-g dl<sup>-1</sup>), leucócitos (Leu- $\mu$ l), e proteína plasmática (PP-g dl<sup>-1</sup>), obtidos durante a colheita de medula óssea nos momentos, pré, trans, pós e 96 horas, de todos os animais dos grupos GI, GII, GIII e GIV, estão expostos na tabela 1.

### **3.2.7 Separação da fração mononuclear, viabilidade e marcação celular**

Todos os procedimentos de separação e marcação de células mononucleares mencionados no material e métodos foram passíveis de serem realizados. As amostras de MO foram divididas em quatro tubos falcon de 50 ml e a centrifugação com o gradiente de densidade foi realizada somente em uma etapa facilitando a obtenção do botão celular em espaço de tempo não superior a 30 minutos. No teste de viabilidade celular com azul de tripan 1% nos grupos GI e GII observou-se obtenção de um número viável de células acima de 90% (Tabela 2 e 3).

Tabela - 1 Valores das médias da morfometria sanguínea de hemáceas (He- $\mu\text{l}$ ), hematócrito (Ht-%), hemoglobina (Hb-  $\text{g dl}^{-1}$ ), leucócitos (Leu- $\mu\text{l}$ ), e proteína plasmática (PP-  $\text{g dl}^{-1}$ ), obtidas durante a colheita de medula óssea nos momentos, pré, trans, pós e 96 horas após a colheita de medula óssea em sangue periférico de cães (n=36).

	PRÉ	TRANS	DIF	EP	PÓS	DIF	EP	96H	DIF	EP
	(1)	(2)	(2)-(1)		(3)	(3)-(2)		(4)	(4)-(3)	
<b>He-<math>\mu\text{l}</math></b>	5,34	4,12	1,22**	0,0945	4,11	0,01 <sup>NS</sup>	0,1135	5,29	1,13**	0,1903
<b>Ht - %</b>	39,2	29,77	9,95**	0,9710	32,16	2,39*	0,8676	39,77	7,61**	1,1050
<b>Hb - <math>\text{g dl}^{-1}</math></b>	13,76	10,92	2,84**	0,2964	10,59	0,33 <sup>NS</sup>	0,3865	12,67	2,08**	0,4689
<b>Leuc - <math>\mu\text{l}</math></b>	12481	10.079	2403**	770,216	7728	2.350**	437,795	10573	2.845**	711,0243
<b>PP<sup>-1</sup>-<math>\text{g dl}^{-1}</math></b>	8,11	6,96	1,15**	0,1717	7,21	0,25 <sup>NS</sup>	0,1985	8,16	0,95**	0,2402

\*Nível de significância 5%; \*\* Nível de significância 1%; NS não significativos.

EP = erro padrão.

Tabela 2- Número de células mononucleares (ml) e viabilidade (%) celular obtidas no botão celular após processamento da medula óssea dos cães do grupo GI.

Animal	Grupo	Amostra	
		Número de células mononucleares totais por mililitro	Viabilidade (%)
Ca	GIa	$6,4 \times 10^8$	93% (3)
Ca	GIa	$0,6 \times 10^8$ (2)	96%
Ca	GIa	$7,4 \times 10^8$ (1)	94%
Cb	GIb	$4,4 \times 10^8$	99% (4)
Cb	GIb	$1,7 \times 10^8$	95%
Cb	GIb	$3,7 \times 10^8$	97%
Cc	GIc	$4,4 \times 10^8$	97%
Cc	GIc	$4,1 \times 10^8$	95%
Cc	GIc	$5,3 \times 10^8$	96%

(1) Maior número de células mononucleares transplantadas; (2) Menor número de células mononucleares transplantadas; (3) Maior viabilidade celular; (4) Menor viabilidade celular.

Tabela 3- Número de células mononucleares e viabilidade celular obtida no botão celular após processamento da medula óssea, dos cães do grupo GII.

Animal	Grupo	Amostra	
		Número de células mononucleares totais por mililitro	Viabilidade (%)
Ca	GIIa	$7,4 \times 10^8$ (1)	99% (3)
Ca	GIIa	$6,6 \times 10^8$	98%
Ca	GIIa	$3,0 \times 10^8$	96%
Cb	GIIb	$4,1 \times 10^8$	97%
Cb	GIIb	$4,1 \times 10^8$	95% (4)
Cb	GIIb	$1,3 \times 10^8$ (2)	97%
Cc	GIIc	$3,0 \times 10^8$	96%
Cc	GIIc	$3,3 \times 10^8$	98%
Cc	GIIc	$4,4 \times 10^8$	97%

(1) Maior número de células mononucleares transplantadas; (2) Menor número de células mononucleares transplantadas; (3) Maior viabilidade celular; (4) Menor viabilidade celular.

As amostras analisadas para identificação de células mononucleares por meio de marcação com nanocristal Qtracker 655 no grupo controle e no grupo que recebeu somente MEC de colágeno não apresentaram fluorescência quando examinadas por meio do microscópio fluorescente na análise pré-transplante do botão celular e nas análises do *imprint* celular, realizadas durante as biópsias tendíneas. No grupo GI, somente uma análise (11%) revelou-se negativa no botão celular pré-transplante, mas positiva na análise tecidual. Das lâminas confeccionadas durante o *imprint* de cada tendão, três (33%) apresentaram fluorescência positiva e no grupo GII (Figura 6A e Tabela 4), das nove lâminas analisadas, três também se apresentaram positivas (33%) na luz fluorescente (Tabela 5).

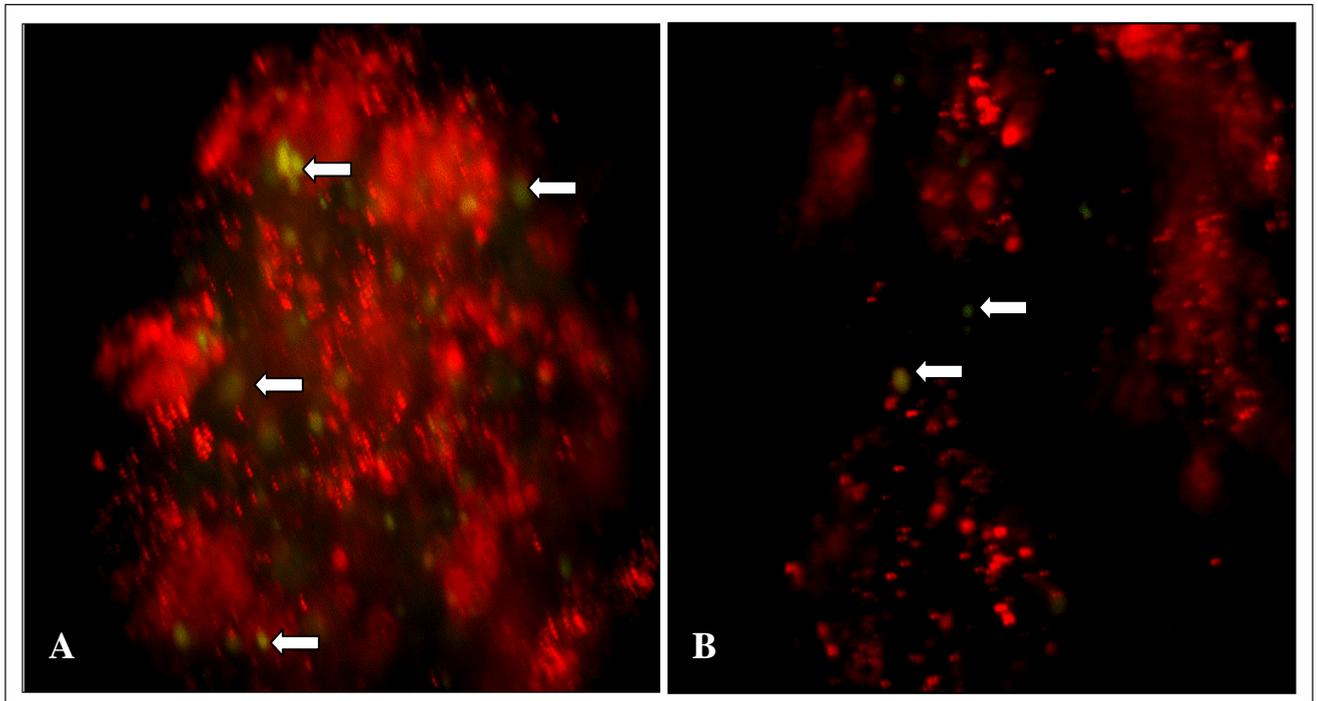


Figura 6- Identificação de células mononucleares por meio de marcador biocelular fluorescente nanocristal Qtracker 655. A e B) Aglomerados de células mononucleares fluorescentes (setas) marcadas com nanocristal Q-tracker 655 (coloração esverdeada), observadas em microscopia de luz fluorescente em amostras do botão celular pré-transplante (Ampliação da objetiva 40x).

Tabela 4- Resultado da avaliação das células mononucleares do botão celular por imunofluorescência, pré-transplante e pós-biópsia no tecido tendíneo marcadas com nanocristal Q-tracker 655 encontradas no grupo GI.

Animal	Grupo	Amostra	
		Botão celular	Imprint tendão
Ca	G1a	++++	- (1)
Ca	G1a	++	- (1)
Ca	G1a	++	+ (2)
Cb	G1b	+++	- (1)
Cb	G1b	++++	- (1)
Cb	G1b	- (1)	+ (2)
Cc	G1c	++	- (1)
Cc	G1c	++++	- (1)
Cc	G1c	++	+ (2)

(1) Não foram encontradas células fluorescentes; (2) Poucas células positivas (raras células positivas, inferior a 5% do total); ++ Número médio de células positivas para IFA (aprox. 10-20%); +++ ou ++++ Grande número de células fluorescentes (aprox. 30-50%).

Tabela 5- Resultado da avaliação das células mononucleares do botão celular por imunofluorescência pré-transplante e pós-biópsia no tecido tendíneo das células marcadas com nanocristal Q-tracker 655 encontradas no grupo GII.

Animal	Grupo	Amostra	
		Botão celular	Imprint tendão
Ca	GIIa	+++	– (1)
Ca	GIIa	+ (2)	+ (2)
Ca	GIIa	+++	+ (2)
Cb	GIIb	+ (2)	– (1)
Cb	GIIb	++++	– (1)
Cb	GIIb	++	– (1)
Cc	GIIc	++	+ (2)
Cc	GIIc	+ (2)	– (1)
Cc	GIIc	+ (2)	– (1)

(1) Não foram encontradas células fluorescentes; (2) Poucas células positivas (raras células positivas, inferior a 5% do total); ++ Número médio de células positivas para IFA (aprox. 10-20%); +++ ou ++++ Grande número de células fluorescentes (aprox. 30-50%).

### 3.2.8 Transplante das células da fração mononuclear

O transplante celular revelou ser uma técnica simples. Verificou-se que na aplicação do transplante das células, deve-se primeiramente suturar o paratendão que servirá de proteção para a permanência destas junto à lesão e, em seguida, introduzir a solução com uma seringa e agulha 25 x 7, estéril entre os espaços das suturas. Assim as células permanecerão dentro do túnel e este evitará a saída para os outros tecidos.

### 3.2.9 Avaliação clínica

Todos os animais apresentaram evolução clínica satisfatória durante todo o período de observação para cada grupo. Achados clínicos como discreto aumento de volume local foi observado em todos os animais dos grupos GI e GII. Este aumento de volume iniciou 24 horas após o implante, permanecendo em média até o sétimo dia do experimento, porém, não foi observada dor à palpação local. As observações relacionadas com formação de edema e espessura tendínea não mostraram diferenças clínicas entre os membros dos grupos observados, estando todos os tendões dos MPD ligeiramente espessados, e a maioria (33%) sem apresentar edema considerável, porém, três animais do grupo GIV apresentaram edema com maior intensidade.

Achados como claudicação esteve presente no pós-operatório com evolução para melhora, de acordo com a tabela 6, variando em intensidades de leve a moderado. Durante os primeiros sete dias de avaliação todos os animais apresentaram certo grau de claudicação com diferença significativa na comparação entre os contrastes do grupo controle com os demais (Tabela 6), permanecendo com dificuldade para apoiar o MPD até a ocasião das biópsias. Quando comparadas as médias do grupo GI em relação ao GII, GIII e GIV, a diferença significativa para evolução de melhora da marcha permaneceu entre o período de quatorze e trinta dias de avaliação clínica, em que todos os animais já apoiavam o membro com grau moderado de claudicação e mantiveram uniformidade de classificação para a deambulação, apresentando melhora acentuada no decorrer das avaliações.

Ao exame radiográfico, não foi observada nenhuma alteração significativa que pudesse comprometer a articulação tibiotársica. A administração de Parecoxib® surtiu ação antiinflamatória efetiva, já que ao término da terapia, a partir do primeiro dia do experimento, não foi observada sensibilidade dolorosa à palpação local por quatro dias.

Tabela 6- Escores de cães submetidos ou não a transplante de células mononucleares e MEC de colágeno, conforme grau de deambulação, sob imobilização interna, do 7º ao 30º dia de pós-operatório.

Contrastes	Dias de avaliação / grau de deambulação					
	7	EP	14	EP	30	EP
<b>C1</b>	4,46 <sup>NS</sup>	3,7734	85,7192**	1,7400	83,80**	0,9203
<b>C2</b>	2,70 <sup>NS</sup>	2,7215	4,63**	1,6271	-3,28**	0,9819
<b>C3</b>	2,08 <sup>NS</sup>	1,7284	1,99*	0,9505	0,000 <sup>NS</sup>	0,5190

C1: 3GII – GI – GIII-GIV; C2: 2GI – GII - GIII; C3: 1GII – GIII.

\*Nível de significância 5%; \*\* Nível de significância 1%; NS não significativos.

### 3.2.10 *Imprint* citológico

#### Evolução aos 7 dias

No grupo GI observou-se presença de eventuais neutrófilos e grande quantidade de hemácias e formações alveolares similares a tecido adiposo. No grupo GII, as amostras revelaram presença de hemácias e raros leucócitos, e pequena quantidade de fibrina com presença de fibroblastos degenerados. No grupo GIII encontrou-se presença de fundo protéico, eventuais fibroblastos (a maioria degenerada) (Figura 7A), ocorreram pequenos focos de hemácias e formações alveolares remanescentes similares a tecido adiposo que poderia ser pela presença da MEC (Figura 7B). No grupo GIV, encontrou-se na leitura das lâminas muitas hemácias e células degeneradas.

#### Evolução aos 14 dias

No grupo GI observou-se aglomerados de células de origem fibroblástica (Figura 7C). No grupo GII verificou-se discreto fundo protéico, presença discreta de leucócitos, em sua maioria neutrófilos. No grupo GIII, encontrou-se células de origem desconhecida, discreta matriz colágenosa, células degeneradas semelhantes a fibroblastos e material com aparência alveolar similar a tecido adiposo. No grupo GIV as amostras apresentaram presença de grande quantidade de hemácias e células degeneradas.

#### Evolução aos 30 dias

No grupo GI as amostras apresentaram fundo protéico, presença de leucócitos e discretas células reativas de origem indeterminada. No grupo GII verificou-se aglomerados de células de origem fibroblástica e colágenosa que seguem a mesma orientação do tendão, presença discreta de hemácias e material similar a gordura (espaços em branco que lembram gordura) entre as células (Figura 7D). No grupo GIII encontrou-se raros aglomerados de células de origem colágenosa, alguns fibroblastos isolados (porém raros e íntegros), fundo protéico, presença de hemácias e raros leucócitos. No grupo GIV observou-se matriz composta por pequenas fibras de colágeno com alguns fibroblastos íntegros e reativos e presença de grande quantidade de hemácias e células degeneradas.

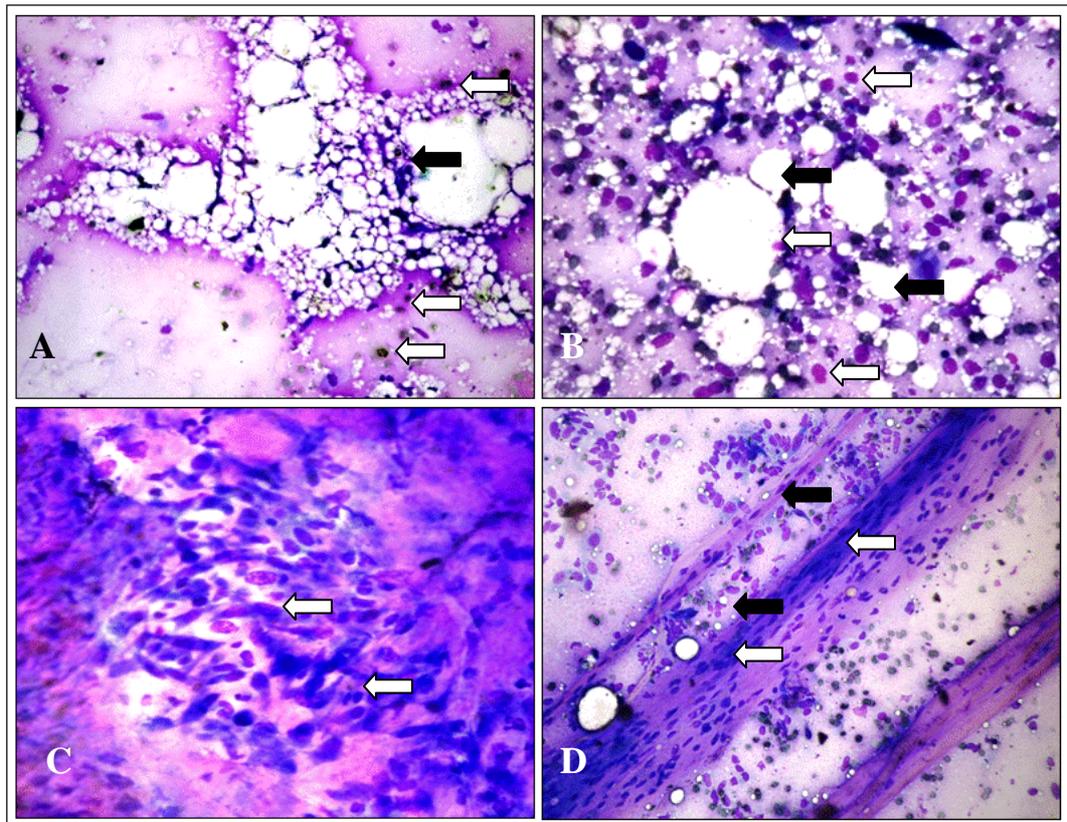


Figura 7 - Resultados obtidos por *imprint* citológico longitudinal e transversal corados por Panótico rápido: A) Grupo II, aos 7 dias de evolução cicatricial observa-se presença de raros leucócitos (seta clara) e pequena quantidade de fibroblastos degenerados (seta escura); B) No Grupo III, observa-se formações alveolares similares a tecido adiposo (seta escura) e presença de grande quantidade de hemácias (seta clara); C) Grupo 1: aglomerados de células desorganizadas de origem fibroblástica (seta clara) (14 dias de evolução). D) Células fibroblásticas (seta clara) que seguem a mesma orientação e grande presença de colágeno. Observa-se entre as células collagenosas a existência de material similar a gordura (espaços em branco que lembram gordura) (seta escura). (Ampliação da objetiva 40x).

### 3.2.11 Histopatologia

#### Evolução histológica aos 7 dias

Os achados predominantes das análises histopatológicas coradas pelo HE foram de eventos pertinentes às fases iniciais do processo inflamatório como infiltrados de células PMN e mononucleares, presença de fibrina e pequena proliferação de fibroblastos. Nas amostras analisadas do grupo GI, aos sete dias de evolução, observou-se microscopicamente uma neovascularização intensa, envolvidos por componentes de tecido conjuntivo, exsudação fibrosa na superfície celular, material basofílico amorfo de coloração amarelada, localizadas principalmente na superfície celular, hemorragia leve e multifocal, pequenas áreas de necrose e reação granulomatosa intensa (Figura 8A).

Nas amostras do grupo GII o exame microscópico revelou presença de fibrina e de material eosinofílico e predominância de tecido desorganizado e fibrogranulomatoso (Figura 8B).

No grupo GIII a observação dos cortes histológicos revelou presença de novos vasos sanguíneos, tecido de granulação moderada, infiltrado inflamatório com células PMN e mononucleares, presença de grande quantidade de fibrina na superfície celular e presença de fibras de tecido amorfo (Figura 8C).

No grupo GIV, as amostras apresentaram área com intensa hemorragia e fibrina por todo o corte (Figura 8D), neovascularização, infiltrados perivasculares mononucleares intensos, tecido de granulação desorganizado e presença de células gigantes multinucleadas com material fagocitado no seu citoplasma.

Quando comparados todos os grupos entre si quanto à evolução regenerativa do processo cicatricial das variáveis: proliferação de fibroblastos, colágeno e neoangiogênese, se percebem que o grupo GI foi mais significativo que os demais, durante toda a fase evolutiva, acompanhada por análises histológicas (Tabela 7).

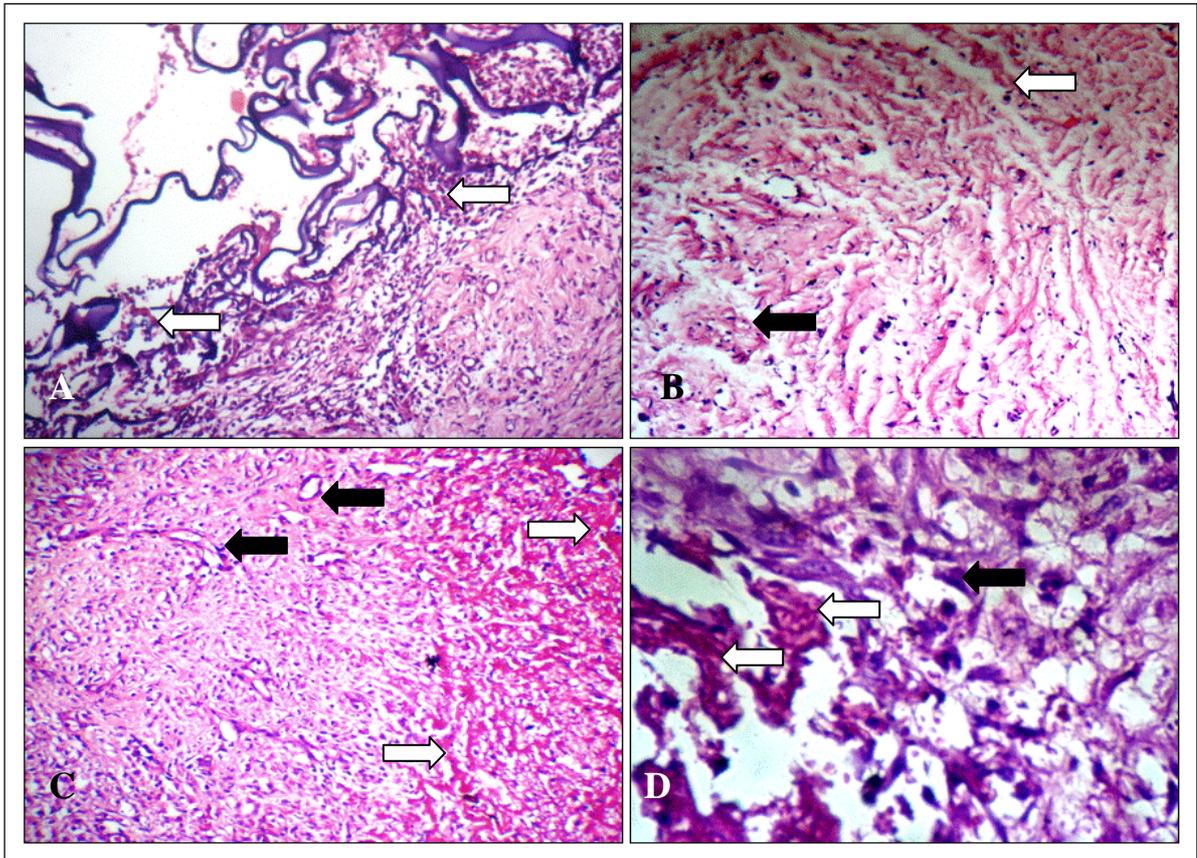


Figura 8 - Fotomicrografia do processo cicatricial das amostras do tendão calcâneo comum de cães, aos sete dias de evolução, imobilizados com pino intra-articular observadas em corte longitudinal. A) Grupo GI, observar hemorragia leve e multifocal (seta clara), neovascularização (seta escura) e infiltrados de células PMN (40X). B) Grupo GII, notar presença de células PMN e tecido fibrogranulomatoso (seta) (100X). C) Grupo GIII: processo de evolução com presença de tecido fibrogranulomatoso com presença de neovascularização (seta) e presença de focos hemorrágicos (seta clara) (40X). Observar aglomerado de fibrina localizada na porção periférica. D) Grupo GIV: notar área com abundante presença de fibrina (seta clara) e fibroblastos desorganizados (seta escura). Coloração HE (100X).

#### Evolução histológica aos 14 dias

Nos cortes realizados nos fragmentos das amostras GI, GII, GIII e GIV e corados por HE observou-se falta de orientação das células fibroblásticas, principalmente no grupo GIV. No grupo GI foram encontrados poucas células PMN e reação granulomatosa diminuída. Ainda observaram-se neovascularização intensa com discretos focos hemorrágicos e também presença de material amorfo basofílico com discreta reação granulomatosa (Figura 9A). No grupo GII, presença de neovascularização moderada, discreto infiltrado inflamatório e pouco tecido de granulação, porém observou-se um aumento do número de células fibroblásticas e colágeno em fase de organização transversal variável (Figura 9B).

Verificou-se que em todas as amostras do grupo GIII ocorreram focos de neovascularização moderada, presença de células gigantes e tecido de granulação exuberante em estágio de organização (Figura 9C). No grupo GIV a neovascularização também se revelou moderada, porém, com infiltrados inflamatórios difusos e tecido de granulação desorganizado (Figura 9D). Estatisticamente, quando comparados a proliferação das variáveis fibroblastos, colágeno e neoangiogênese somente por períodos de tempo (7 e 14 dias), entre si, os grupos GII, GIII e GIV obtiveram uma melhora significativa na qualidade proliferativa destas variáveis durante os primeiros 14 dias de evolução (Tabela 8).

#### Evolução histológica aos 30 dias

Superfície celular com pequeno foco de reação granulomatosa e formação de tecido de granulação moderado. Verificou-se presença de células gigantes e material amorfo amarelado e discreto infiltrado mononuclear foram observadas nas amostras do grupo GI (Figura 10A). No grupo GII as amostras revelaram tecido de granulação em avançado estado de organização com estratos múltiplos de fibrilas de colágeno arranjadas entre fibroblastos e ocorreram pequenos focos inflamatórios (Figura 10B). No grupo GIII verificou-se a presença de grande quantidade de fibroblastos e a intensificação da matriz extracelular e presença de tecido amorfo de coloração esbranquiçada à amarelada difundidas entre tecido fibrogranulomatoso (Figura 10C). O grupo GIV apresentou neovascularização moderada, reação inflamatória difusa e foi observada a predominância de áreas de intensa presença de matriz extracelular ainda em desarranjo (Figura 10D).

De acordo com a tabela 9, quando comparados o grupo GIV com os demais, o processo inflamatório foi mais intenso, principalmente nos primeiros 7 dias de análise histológica. No entanto, todos os grupos (GI, GII, GIII, GIV) apresentaram intensificação das

variáveis presença de células inflamatórias, hemácias, coágulo e fibrina nos períodos de evolução regenerativa do processo cicatricial que compreendem 7 e 14 dias (Tabela 10).

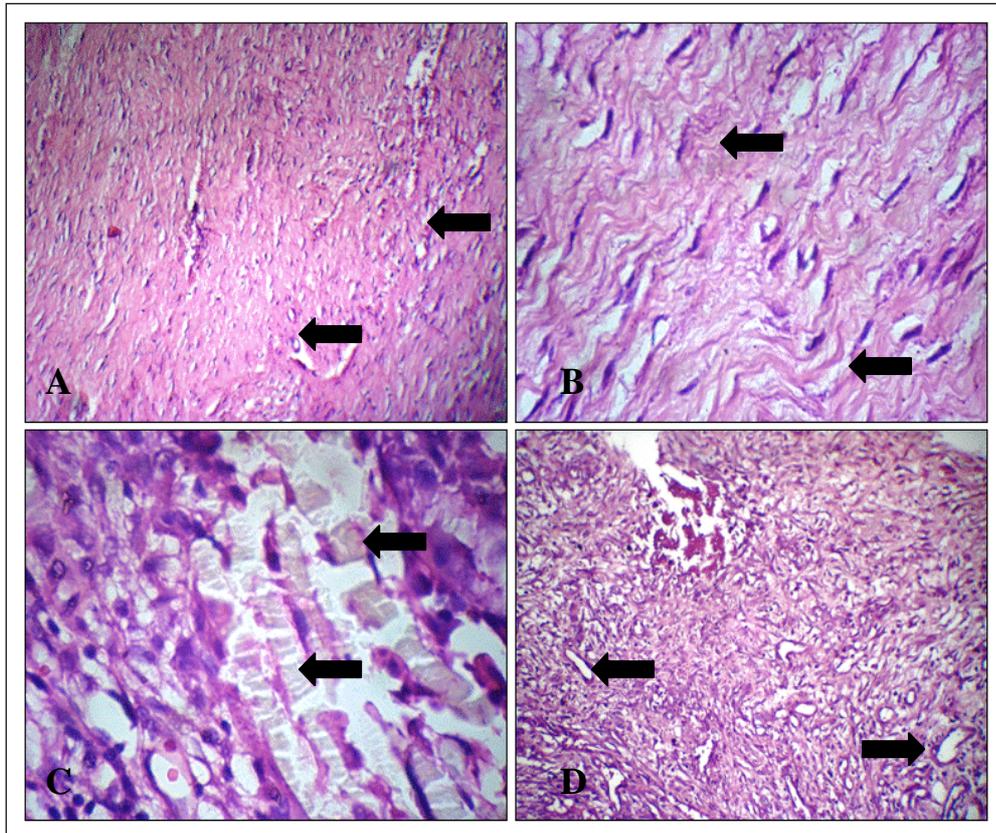


Figura 9 - Microscopia óptica do tendão calcâneo comum de cães. Aspecto histológico das amostras dos grupos GI, GII, GII e GIV aos 14 dias de evolução cicatricial, coradas pelo HE em corte longitudinal. A) Grupo GI: notar discreta organização de fibras interpostas por pequenos vasos sanguíneos (seta) (40X). B) Grupo GII: notar múltiplas fibrilas e colágeno entrelaçado entre fibroblastos (seta) (100X). C) Aspecto da evolução cicatricial do grupo GIII que recebeu MEC de colágeno, notar presença orgânica de material amorfo de coloração esbranquiçado (seta) (100X). D) Grupo GIV: notar desorientação variável dos fibroblastos e neovascularização moderada (seta) (40X).

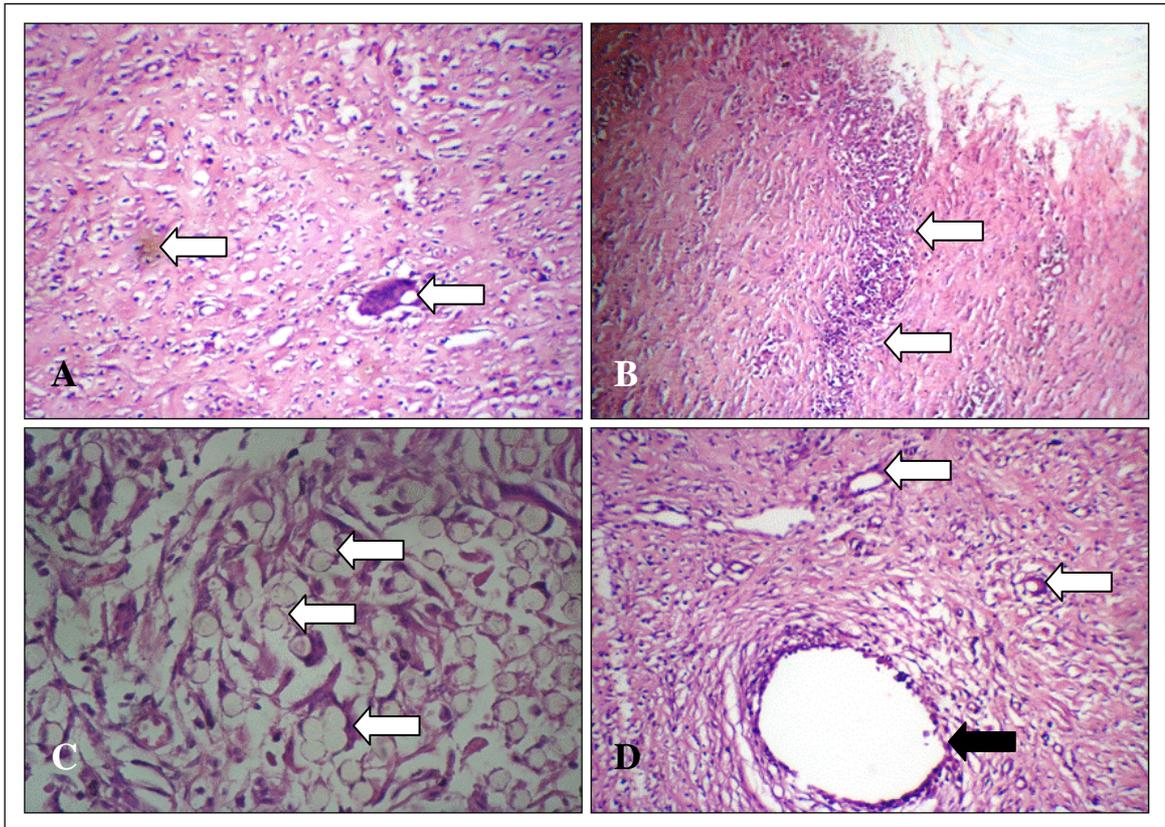


Figura 10- Aspecto microscópico das amostras de tendão dos Grupos GI, GII, GIII, GIV aos 30 dias de evolução regenerativa. A) Grupo GI: fotomicrografia de superfície celular com leve reação granulomatosa e presença célula gigante (seta clara) e material amorfo de coloração amarelada (seta escura) (40X). B) Nas amostra do Grupo GII, notar tecido de granulação em fase de organização (seta) e pequena quantidade de células PMN (40X). C) Observar na amostra do Grupo GIII a abundante presença de tecido amorfo de coloração amarelado difundido entre tecido fibrogranulomatoso (seta) com fibras desorganizadas (100X). D) Grupo GIV: aspecto histológico de corte longitudinal mostrando a reação cicatricial ao fio de sutura (seta escura), proliferação de tecido granulomatoso e neovascularização (seta clara). (HE 100X).

Tabela 7- Contrastes de médias do processo cicatricial (variáveis fibroblastos, colágeno, neoangiogênese) entre grupos, por período de avaliação, de cães submetidos ou não a transplante de células mononucleares e MEC de colágeno, sob imobilização interna, do 7<sup>o</sup> aos 30<sup>o</sup> dia de pós-operatório.

Contrastes	Dias de avaliação					
	7	EP	14	EP	30	EP
<b>C1</b>	5,15**	1,5644	-3,97*	1,5644	-4,29*	1,5644
<b>C2</b>	-0,62 <sup>NS</sup>	1,1062	-1,75 <sup>NS</sup>	1,1062	-1,35 <sup>NS</sup>	1,1062
<b>C3</b>	0,44 <sup>NS</sup>	0,6387	0,10 <sup>NS</sup>	0,6387	0,18 <sup>NS</sup>	0,6387

C<sub>1</sub>: 3GIV – GI – GII – GIII; C<sub>2</sub>: 2GI – GII – GIII; C<sub>3</sub>: 1GII – GIII.

\*Nível de significância 5%; \*\* Nível de significância 1%; NS não significativos.

Tabela 8- Contrastes de médias de cicatrização (variáveis fibroblastos, colágeno, neoangiogênese) entre dias, por grupo, de cães submetidos ou não a transplante de células mononucleares e MEC de colágeno, sob imobilização interna, do 7 ° ao 30° dia de pós-operatório.

Grupos	Contrastes			
	C <sub>1</sub>	EP	C <sub>2</sub>	EP
<b>GI</b>	1,20 <sup>NS</sup>	0,6387	-0,46 <sup>NS</sup>	0,6387
<b>GII</b>	1,59*	0,6387	-0,62 <sup>NS</sup>	0,6387
<b>GIII</b>	1,23**	0,6387	-0,70 <sup>NS</sup>	0,6387
<b>GIV</b>	-1,46*	0,6387	-0,70 <sup>NS</sup>	0,6387

C<sub>1</sub>: 1Dia14 – 1 Dia7; C<sub>2</sub>: 1Dia30 – 1Dia14.

\*Nível de significância 5%; \*\* Nível de significância 1%; NS não significativos.

EP: erro padrão

Tabela 9 - Contrastes de médias do processo inflamatório (variáveis hemácias, coágulos, fibrina, células mononucleares e polimorfonucleares) entre grupos, por período de avaliação, de cães submetidos ou não a transplante de células mononucleares e MEC de colágeno, sob imobilização interna, do 7 ° ao 30° dia de pós-operatório.

Contrastes	Dias de avaliação					
	7	EP	14	EP	30	EP
<b>C1</b>	-8,09**	1,4792	-0,49 <sup>NS</sup>	1,4792	0,83 <sup>NS</sup>	1,4792
<b>C2</b>	2,41**	1,0460	4,75**	1,0460	3,99**	1,0460
<b>C3</b>	-0,92 <sup>NS</sup>	0,6039	0,59 <sup>NS</sup>	0,6039	-0,08 <sup>NS</sup>	0,6039

C<sub>1</sub>: 3.GIV – 1GI – 1GII – 1GIII; C<sub>2</sub>: 2.GI – 1GII – 1GIII; C<sub>3</sub>: 1.GII – 1GIII.

\*Nível de significância 5%; \*\* Nível de significância 1%; NS não significativos.

EP: erro padrão

Tabela 10 - Contrastes de médias do processo inflamatório (variáveis hemácias, coágulos, fibrina, células mononucleares e polimorfonucleares) entre dias, por grupo (GI, GII, GIII, GIV), de cães submetidos a tenectomia e transplante de células mononucleares acrescidas ou não a MEC de colágeno, sob imobilização interna, dos 7 ° aos 30° dia de pós-operatório.

Grupos	Contrastes			
	C <sub>1</sub>	EP	C <sub>2</sub>	EP
<b>GI</b>	-0,86*	0,6039	-0,01 <sup>NS</sup>	0,6039
<b>II</b>	-1,87**	0,6039	0,62 <sup>NS</sup>	0,6039
<b>III</b>	-2,20**	0,6039	0,11 <sup>NS</sup>	0,6039
<b>GIV</b>	0,89*	0,6039	0,68 <sup>NS</sup>	0,6039

C<sub>1</sub>: 1Dia14 – 1 Dia7; C<sub>2</sub>: 1Dia30 – 1Dia14.

\*Nível de significância 5%; \*\* Nível de significância 1%; NS não significativos.

EP: erro padrão

### 3.3 DISCUSSÃO

O presente trabalho foi delineado para estabelecer uma metodologia de colheita de medula óssea seguida de autotransfusão sangüínea e transplante de células mononucleares em lesão cirúrgica do tendão calcâneo com um modelo animal adequado para viabilizar e facilitar as várias etapas do procedimento experimental e disponibilizar principalmente a técnica para ser aplicada à outras espécies. O cão foi escolhido como modelo experimental baseado em argumentos científicos por apresentar estas características e por demonstrar uma grande importância no desenvolvimento de pesquisas principalmente na Medicina Veterinária.

A transfusão sangüínea em cães, segundo Callan (2000), está indicada quando os níveis de Ht encontram-se abaixo de 15%. Outros autores referem 21% (HARREL et al., 1997). Neste estudo percebeu-se uma leve diminuição do Ht no momento trans e pós-colheita de MO (Tabela 1), permanecendo diminuído 96 horas após a infusão de sangue autólogo, ocorrendo diferença significativa entre a comparação das médias entre todos os tempos avaliados, resultado similar aos estudos de Cohen ; Brecher (1995), Tognoli (2008) e Oliveira (2008) os quais afirmam que os níveis de Ht em pacientes submetidos à transfusão sangüínea após colheita de MO decrescem no período pós-operatório. A porcentagem de hematócrito diminuída, neste experimento, foi estatisticamente significativa e, estes resultados podem levar a uma condição de hipóxia tecidual (LOPES et al., 2006), interferindo na regeneração de uma lesão dependendo do tempo de permanência à falta e oxigênio tecidual. Porém, a hipóxia instiga a medula óssea a produzir novas células hematopoéticas (CHOW et al., 2001), evidenciando a estimulação e diferenciação de células progenitoras para formação de complexo granulocítico-monocítico (FINK et al., 2004).

Uma queda na concentração de Hb em doadores de MO é verificada no período pós-operatório em humanos (MIJOVIC et al., 2006) e em cães (TOGNOLI et al., 2007; TOGNOLI 2008) em cerca de 2 a 2,4 g dl<sup>-1</sup>, entretanto, neste estudo, verificou-se que os animais apresentaram níveis de Hb diminuídos em média diferencial significativa entre o momento pré e trans de 2,84 g dl<sup>-1</sup> (P≤0,05), não sendo significativa nos momentos avaliados entre o trans e pós do procedimento (Tabela 1). Mijovic et al. (2006) afirmam que a transfusão de sangue é necessária somente em pacientes que apresentarem os níveis de Hb inferiores a 12,5 g dl<sup>-1</sup> em humanos, e Oliveira (2008) relata essa necessidade quando os níveis de Hb apresentam os níveis de 10, 2 g dl<sup>-1</sup> durante o trans-operatório. Nas análises realizadas no tempo de 96 horas após os animais receberem autotransfusão foi verificado que ocorreu um aumento significativo dos níveis de Hb em até 2,08 g dl<sup>-1</sup>.

Parkkali et al. (2005) concluíram que não é necessária colheita autóloga de sangue para doadores sadios de MO, pois a concentração de Hb não decresce em níveis constantes e permanentes, dessa forma, os autores afirmam que a autotransfusão pré-operatória ou trans-operatória é prática dispendiosa e desnecessária em doadores de pequenos volumes de MO. Todavia, neste estudo, verificou-se que os níveis de Hb diminuíram ( $P \leq 0,05$ ) no momento imediato pós-transfusão (Tabela 1) e em  $0,33 \text{ g dl}^{-1}$ , mesmo após receberem sangue autólogo, sendo que os níveis normais retornaram após as 96 horas de avaliação. Essa prática segue a conclusão da pesquisa de Tognoli et al. (2007) os quais observaram que em condições experimentais, é necessária a realização de autotransfusão sangüínea no período trans-operatório em cães submetidos à doação de  $10 \text{ ml. kg}^{-1}$  de MO, fato este justificado pela queda de Hb apresentada pelos animais durante o ato da colheita e a elevação imediata após a transfusão observada neste estudo.

A média da queda de hemácias observada no momento trans da colheita também foi significativa acompanhando a queda dos níveis de hemoglobina, em cerca de  $1,22 \mu\text{l}$ , permanecendo sem diferença significativa no momento pós, porém, o aumento dos níveis percebidos às 96 horas foi significativa. Se a queda de eritrócitos permanecer ou for acentuada o cão poderá desenvolver uma anemia macrocítica hipocrômica que é tipicamente observada durante remissão em perda aguda de sangue ou hemólise aguda. O grau de macrocitose e hipocromia depende da gravidade da anemia, associada à intensidade da resposta eritropoiética medular, o que poderá levar à reticulocitose sangüínea (MORRISEY; COTTER, 2000).

Os achados laboratoriais nas anemias por perda de sangue incluem: resposta regenerativa, a qual ocorre após dois a três dias; redução na concentração de proteína plasmática (PP) total (WILLER; RIEDESEL, 1985). Na observação dos níveis de PP, ocorreu queda significativa nos momentos entre pré e trans ( $1,15 \text{ g. dl}^{-1}$ ), porém não foi significativa no momento pós. Todavia, 96 horas após a autotransfusão, os valores crescentes dos níveis de PP totais foram significativos na diferença entre as médias ( $0,95 \text{ g. dl}^{-1}$ ) (Tabela 1). Durante o procedimento todos os animais receberam fluidoterapia seguida de autotransfusão impedindo a hemoconcentração plasmática. Dessa forma, os níveis de PP não tiveram aumento e conseqüentemente não foi verificada desidratação devido o grande volume de medula retirada dos animais. De acordo com Perez et al. (2005) a PP total não sofre alterações após estímulo da depressão medular. Neste estudo os resultados foram semelhantes achados desses autores, pois, se observou que a PP total não teve diferença significativa após depressão medula por colheita de MO (Tabela 1).

A depressão medular, analisada pelo hemograma, caracterizou-se por leucopenia durante os momentos trans e pós colheita de MO, pois os níveis de leucócitos tiveram aumento significativo logo após a autotransfusão, caracterizando que durante a colheita de grande quantidade de MO ocorre uma queda dos níveis de leucócitos deixando o paciente susceptível à queda de imunidade.

Antes da aspiração as seringas foram lavadas com solução salina 0,9%, associado com liqemine (heparina 10.000UI), essa combinação impede a coagulação e evita a formação de bolhas permanentes dentro da bolsa de armazenamento desenvolvida no momento da colheita. Se utilizados anticoagulantes com menor concentração, ocorre coagulação da MO em tempos muito curtos impedindo o uso terapêutico (BACIPALUGO et al., 1992).

A escolha do osso femoral para a introdução da agulha Steis está de acordo com Tognoli et al. (2007) pela facilidade de encontrar grande quantidade de células mononucleares e o fato de que em uma única introdução da agulha no osso femoral, consegue-se a quantidade desejada, aspirando-se 5 a 7 ml de cada vez. De acordo Bacipalugo et al. (1992), a MO com maior número de células progenitoras encontra-se na crista ilíaca e necessita-se de quatro a cinco perfurações na pele que são realizadas acompanhando a curvatura das cristas ilíaca superior e inferior em ambos os lados com a agulha. No interior da crista são realizadas mais de 20 perfurações e o pós-operatório torna-se mais doloroso e dispendioso. Devido ao fato dos animais terem sofrido punções na fossa trocantérica não foi observado claudicação ou dores, muito menos apatia durante o pós-operatório.

Apesar do tamanho da agulha utilizada apresentar diâmetro aparentemente elevado, sabe-se que através dos métodos de estabilização de fraturas, que o canal medular pode ser preenchido em 60 a 70% com pinos de Steinmann, sem que isso acarrete prejuízo vascular ao córtex ósseo (EL-WARRACK ; SCHOSSLER, 1998).

Clinicamente de acordo com a tabela Tudury; Raiser (1985) não foram observados manifestação de dor durante a marcha e apresentaram rapidamente o grau V de recuperação deambular, 24 horas após o procedimento cirúrgico. A viabilidade da realização desta técnica deve ser ressaltada neste estudo, uma vez que os demais artigos publicados (FERNANDEZ; GRINDEM, 2000) sobre a punção de MO em crista ilíaca de cães relatam a grande dificuldade de introdução de outros tipos de agulhas e também a dificuldade de se conseguir um volume adequado. A prática de colheita de MO na crista ilíaca de cães é de difícil manejo devido o formato anatômico do osso e dificuldade de introdução da agulha, aumentando o tempo da permanência do animal anestesiado e tempo de colheita do sangue (CAR; BLUE, 1999). Na técnica que foi utilizada neste trabalho, o tempo total de colheita de MO em todos

os cães foi de 20 minutos e máximo de 30 minutos. De acordo com a técnica de punção de MO para colheita de células mononucleares realizada por Samoto (2006), Vaz (2006) e Barros et al. (2001), a quantidade de sangue obtida por punções na crista ilíaca foi inferior a 50ml e a quantidade de células mononucleares foi inferior a  $2 \times 10^5$ , no entanto, a viabilidade celular foi superior a 90%.

Para este trabalho foi escolhido o Kit bone marrow collection, que é um produto hospitalar utilizado para colheita de medula óssea e acondicionamento sanguíneo em tratamento de leucemia em humanos. O equipamento de colheita de MO que foi utilizado é provido de um recipiente que armazena a medula e possui um filtro de 850 microns acoplada à bolsa e dois outros filtros externos, de 500 e 200 microns respectivamente que tem a finalidade de reter as espículas ósseas (DENNEHEY et al., 2008). Admitindo-se que um número mínimo de  $2,5 \times 10^6$  células hematopoéticas  $\text{kg}^{-1}$  do paciente ou  $2,0 - 4,0 \times 10^8$  células totais nucleadas ou ainda  $2 \times 10^6$  células mononucleares (GUARITA-SOUZA et al., 2005) é necessária para obter uma recuperação eficaz e sustentada da hematopoese, esses valores são obtidos quando colhidos entre 10 a 15 ml  $\text{kg}^{-1}$  de sangue da MO do doador (MASSUMOTO ; MIZUKAMI, 2000).

Neste estudo verificou-se que no volume colhido de 10ml  $\text{kg}^{-1}$  de MO de cada animal (n=18) conseguiu-se obter a média de  $4,22 \times 10^8$  valores de células mononucleares totais no Grupo GI e  $4,13 \times 10^8$  no Grupo GII. Com viabilidade superior a 90% em ambos os grupos (Tabela 5) garantindo a qualidade da suspensão, resultados muito próximos à pesquisa de Guarita-Souza et al. (2005), realizada em animais de laboratório, que obtiveram as células mononucleares ( $3 \times 10^6$ ) pela técnica de Boyum (1968) em que a suspensão de MO foi diluída e centrifugada a  $440 \times g$  por 40 minutos com alta viabilidade do botão celular.

Neste experimento, os Kits foram reutilizados e sofreram esterilização em autoclave, a  $120^\circ$  por período de 10 minutos. Testes microbiológicos descartaram presença de contaminação após a esterilização e durante todo o experimento não foi verificado contaminação da medula óssea e infecção de origem bacteriana nos animais.

Nenhuma falha da hematopoese foi observada e a mobilização das células mononucleares da MO foi superior ao mínimo sugerido por Suter et al. (2004). Em condições na qual o número de células requisitadas estiver inferior ao desejado, um aumento significativo de células mononucleares poderia ser resgatado se no manejo pré-colheita de MO, os animais forem estimulados através da mobilização tanto medular como periféricos com fatores de crescimento como Filgrastima (granulokine  $0,6 \text{ ml min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$  em uma ou até

três aplicações) ou ainda combinações com citocinas hematopoéticas (G-CSK ou GM-CSF) (LUCIDI ; TAKAHIRA, 2007).

As amostras de medula colhidas na primeira punção para análise morfológica e estrutural de todos os cães tiveram como objetivo avaliar a presença de células hematopoéticas maduras, ancoradas na MO para caracterizar a colheita e também para diagnóstico de doenças hematológicas, se houvessem, assim como estudo do tecido medular. De acordo com Dielbold et al. (2000) o mielograma é superior à citologia pois fornece dados importantes com maior precisão, como, por exemplo, o grau de atividade da celularidade medular e o diagnóstico de mielofibrose e mieloesclerose. Na análise microscópica de todas as amostras deste estudo, coradas com panótico rápido confirmou-se a origem medular das células. Uma vez confirmada a origem, considerou-se a presença de células sangüíneas e não se observou alteração da estrutura e morfologia destas células nas leituras das lâminas.

O maior desafio da manipulação celular é a manutenção das características funcionais das células colhidas e a manutenção da vitalidade. Os protocolos existentes para lavagem, nutrição e manutenção celular possuem uma mistura enriquecida com sais minerais, aminoácidos e componentes essenciais e proteínas de soro fetal bovino. Para reduzir os custos deste estudo, utilizou-se para cada animal o soro autólogo estéril que contém água (92%), proteínas (7%) e outras substâncias como hormônios e enzimas (1%) ao qual foi acrescido de DMEM com intuito de fornecer energia às células mononucleares durante a lavagem e obtenção do botão celular. Percebeu-se que a viabilidade celular manteve-se > 90% mas necessita-se aprofundar os estudos para verificar a expressão do núcleo celular quanto a mitoses. O sucesso do transplante de medula utilizando a fração total de células mononucleares da medula depende em parte da quantidade de células precursoras empregadas por quilo de peso do receptor. Esse fator é limitante, e uma maneira de tentar contorná-lo é amplificar ainda mais a população de células precursoras resgatadas antes da transfusão.

O estudo experimental sobre a regeneração de tendão calcâneo comum, após tenectomia, segue os mesmos parâmetros descritos por Reddy et al. (1998), promovendo na porção média do tendão de cães, que proporcionou boa exposição e manipulação do tendão.

Neste estudo sugere-se examinar as propriedades regenerativas estruturais celulares e tissulares do tecido tendíneo por meio de métodos adjuvantes pela introdução de células mesenquimais contidas entre as células mononucleares da MO em esponjas de colágeno, após intervenção cirúrgica, com objetivo de melhorar a qualidade de regeneração tecidual em menor espaço de tempo. Foi possível verificar que o MEC deve ser embebido com as células

mononucleares antes de ser introduzido na falha cirúrgica, pois dessa forma assegura-se a aderência e permanência de um maior número de células junto ao colágeno.

As médias entre os grupos, referentes ao sétimo, décimo quarto e trigésimos dias de avaliação cicatricial foram significativas em todos os animais que receberam células e/ou MEC (GI, GII e GIII) quando comparados ao grupo controle (Tabela 7 e 8). Por volta do terceiro dia pós-lesão os fibroblastos iniciam a produção de fibrilas que as segregam ao acaso no espaço extracelular, isso de certa forma colabora para proteger o tecido tendinoso contra as forças aplicadas no início da cicatrização (ENWEMEKA et al., 1998). Os animais analisados apresentaram proliferação fibroblástica, porém de forma rudimentar, desde a primeira colheita e evidente já no sétimo dia, juntamente com a neovascularização. Estes resultados são semelhantes aos de resultados de Gelberman et al. (1985) que observou o aparecimento de novos vasos sanguíneos em tendões lesados por volta do sétimo dia após a lesão. A proliferação de tecido fibroblástico que caracterizou a formação de tecido de granulação típico do processo de reparação tecidual que foi menos evidente no grupo controle.

Nirmalanandhan et al. (2006) e Awad et al. (2000) verificaram por meio de análises da morfologia celular de fibroblastos e colágeno, observados em cultivo celular e enxertados em tendões de ratos, que a utilização de MECs e células mesenquimais auxiliam principalmente no ganho de resistência do tendão durante a primeira fase de regeneração tecidual. Reforçando a teoria, Pacini et al (2007) relatam que na avaliação da tensão mecânica da fibra tendínea, esta pode aumentar em até 30% após regeneração cirúrgica com apenas uma aplicação de no mínimo  $5 \times 10^3$  células mesenquimais.  $\text{cm}^{-2}$ .

Em todos os contrastes comparativos entre os grupos que receberam células mononucleares e/ou MEC, nos tempos de sete, quatorze e trinta dias não foram evidenciados histologicamente variação na regeneração, apesar de apresentarem fibras mais alinhadas, porém de pequeno tamanho, neoformação vascular, e diminuição dos infiltrados celulares. O processo de evolução foi mais acentuado nos primeiros sete dias e após, essa evolução foi mais lenta (Tabela 7 e 9). Aslan et al. (2008) observaram que durante a cicatrização de uma lesão no tecido tendíneo há uma tendência ao aumento da quantidade de fibras de menor diâmetro.

Quando comparadas as médias das variáveis, quantidade de fibroblastos, colágeno e neoangiogênese presentes no processo evolutivo de cicatrização entre dias, por grupo, observa-se que os animais que receberam MEC embebidos em células e os que receberam somente MEC, a organização de fibroblastos foi intensa e mais significativa até o 14º dia (Tabela 8). Uma preocupação pertinente sobre o uso terapêutico de células-tronco é a

possibilidade de que a injeção das células no local da lesão possa se diferenciar para uma linha inesperada de tenócitos e ocorrer evolução celular inespecífica, causando o aparecimento assim de tecidos ectópicos. Na realidade, MECs podem induzir uma reatividade celular no receptor e interferir tanto na regeneração quanto na elasticidade, assim como, produzir reações indesejadas (HARRIS et al., 2004). Esta possibilidade foi provada quando células suspensas em MECs apropriados à base de colágeno como adjuvantes da regeneração foram utilizadas em reparos de tendão em coelhos (AWAD et al., 2000; AWAD et al., 2003), podendo constituir um problema devido a resistência reduzida e possível reatividade de tecido conseqüente (HARRIS et al., 2004).

No entanto, neste estudo, apesar das avaliações terem sido realizadas somente por trinta dias, nas leituras histológicas não foi observada alteração de linhagem celular e a utilização de esponja de colágeno proporcionou incremento de fibroblastos alinhados, indicando fase ativa de colágeno nos dois grupos que os receberam como adjuvantes. Esses dados corroboram com os encontrados por Juncosa-Melvin et al. (2006) que transplantaram esponja de colágeno com células-tronco autógenas para recuperação tendínea e observaram manifestações de melhora mecânica e histopatológica dos tendões até doze dias após cirurgia.

Pool (1996) relatou que a diminuição da celularidade e neovascularização é indicativa de progressiva maturação do tecido de granulação, pois a deposição de colágeno exerce pressão mecânica sobre as delicadas paredes de capilares neoformados, levando à diminuição da vascularização. Este fato foi observado a partir do 14º dia de avaliação e no 30º dia quase não se observou neovascularização e proliferação de colágeno nos grupos ao quais receberam o MEC, resultados que corroboram aos de Enwemeka; Reedy (2000) que citam que por volta do 14º dia após a lesão é o tempo em que a proliferação de colágeno atinge seu pico. Os mecanismos de diferenciação da célula precursora mesenquimal em tenócitos ainda estão sendo pesquisados, no entanto há dificuldade no reconhecimento das fases deste processo, quando analisadas as células por sua morfologia. Portanto, Richardson (2005) relata a necessidade de marcações para o colágeno tipo I, sintetizado pelos tenócitos para identificar a célula por sua função, além de sua diferenciação através de marcadores superficiais.

Considera-se que o efeito do tratamento com células da fração mononuclear de MO, em especial as células precursoras mesenquimais, aplicadas a lesões tendíneas induzidas neste experimento, possibilitou melhora significativa na aceleração do reparo tendíneo, sob análise histopatológica. Esta consideração está de acordo com dados divulgados por Herthel (2002) que sugeriu este efeito, porém baseados em análise clínica, ultra-sonográfica e funcional das estruturas tendíneas em resposta à terapia celular com células da MO.

Em alguns experimentos foi confirmada a hipótese de que a infusão direta de células mesenquimais poderia representar uma aproximação terapêutica segura à regeneração do tendão sugerindo que o tecido pode orientar as células para uma diferenciação correta permitindo, uma melhor organização celular e mais rápida, em paralelo, mas para isso seria necessária a expansão das células *in situ* (JUNCOSA-MELVIN et al., 2005). No atual experimento verificou-se que no grupo que recebeu somente o transplante de células diretamente na lesão, os feixes de fibras se apresentaram alinhados com fibroblastos de conformação arredondada, porém, nos grupos que receberam células e MEC os fibroblastos já se apresentavam mais organizados e com muitos filamentos, já com deposição de colágeno davam início ao processo de remodelamento nos décimo quarto dia de análise. Estes resultados diferem daqueles observados por Pacini et al. (2007), segundo os quais relatam que a utilização de MEC é desnecessária e os resultados de uma cicatriz tendínea podem ser favorecidos somente com a injeção de uma solução rica em células da MO diretamente na lesão.

O microambiente determina orientação das fibras e a morfologia do tecido lesionado induz uma diferenciação de células e produção de fibras organizadas. Esta habilidade do microambiente pode ser necessária para uma diferenciação *in vivo*. Esta orientação e melhor reconhecimento do microambiente podem ser providos por um MEC que impeça ou diminua a contaminação das células depositadas na lesão e parece ser um útil método por manter o potencial de crescimento de células (BAKSH et al., 2004).

A infiltração celular observada nos primeiros sete dias de evolução, principalmente no grupo controle, foi provavelmente parte da resposta inflamatória à própria injúria. De acordo com Autefage (1999) a inflamação é um pré-requisito para que o processo de reparo aconteça e a seqüência inflamatória inicia-se imediatamente após a lesão, sendo uma resposta natural do organismo ao trauma lesivo e estende-se por três dias.

Neste experimento, a partir dos quatorze dias de pós-operatório o grupo que recebeu somente células permaneceu com processo inflamatório acentuado até o 7º dia de avaliação. Esse quadro não foi observado entre os grupos GII e GIII. O aumento da sensibilidade na área lesada só foi observado à palpação, na primeira semana sendo atribuído ao processo inflamatório que se instalou no local, permanecendo em média até o 30º dia no grupo que recebeu somente aplicação de células mononucleares da medula óssea. Barreira (2005), Gift et al (1992) e Williams (1984) perceberam aumento de volume na região da lesão tendínea após administração de colágeno, interpretado por edema decorrente de processo inflamatório instalado, que permaneceu por até 30 dias de avaliação. Ao contrário, neste estudo não foi

observado edema e processo inflamatório (Tabela 10) por tempo maior que sete dias nos grupos que receberam colágeno. Possivelmente por não terem sido injetados colágeno líquido no tecido, mas sim envolvidos por pequenas fibras em forma de esponja. O carreador de colágeno selecionado, apesar de não possuir todas as características de um MEC ideal (POTIER; PETIT, 2005), mostrou-se maleável, biocompatível, poroso e reabsorvível, além de se acomodar com facilidade no tecido conjuntivo.

Os pontos quânticos coloidais nanocristais implantados no botão celular marcaram com eficiência as células mononucleares da medula óssea na avaliação fluorescente pré-transplante, porém, nas análises das biópsias dos tendões, conseguiu-se obter fluorescência reduzida em um número pequeno de amostras no sétimo, quatorze e trinta dias de análise (Tabela 5), sendo considerada a possibilidade do ciclo celular até a sexta geração de mitose acontecer em período de tempo menor que sete dias ou ainda o número de células mononucleares ter sido insuficiente para gerar a emissão de luz. Possivelmente a impossibilidade de se verificar essa fluorescência em todas as amostras pode seguir o conceito de que o tempo de permanência dessa fluorescência em tecido conjuntivo seja menor que sete dias (Tabela 4 e 5). Fundamentalmente esses pontos quânticos nanocristais fluoróforos absorvem fótons de luz e reemitem-na com um comprimento de onda diferente. Essas partículas provêm luminosidade e fluorescência fotoestável que podem ser observadas por horas em tecidos marcados com nanocristais podem ser arquivados por longo período e são capazes de marcar quase todos os tipos de material de interesse (INVITROGEN, 2008).

A fluorescência refletida depende do comprimento de onda das partículas celulares em que são introduzidas (PARAK et al., 2005). De acordo com a pesquisa de Hanaki et al. (2003) as moléculas biológicas possuem tamanhos nanométricos e são partículas covalentes que se une por meio de sua superfície com os pontos quânticos se estes estiverem em solução hidrófila. Neste estudo, o botão celular permaneceu em suspensão com soro autólogo tanto nas avaliações pré-transplante quanto no momento do transplante na lesão aguda. De um modo mais específico as moléculas podem ser adsorvidas através de interação eletrostática entre os diferentes meios e os pontos quânticos mais coloidais são negativamente carregados e as moléculas positivamente. Se a ligação covalente não ocorrer, a fluorescência desaparecerá. (INVITROGEN, 2008). Isso pode explicar a redução de fluorescência nas análises das biópsias ou o fator número de células transplantadas não permanecerem no local da lesão apesar da quimiotaxia da inflamação aguda.

Segundo Borm (2006) os nanocristais fluorescentes podem ser localizados por pelo menos quatro gerações celulares, e algumas células permanecem marcadas por até duas

semanas. O tempo de sete, quatorze e trinta dias definidos para obter a amostra para identificação de células marcadas com nanocristais foi determinado com base no comportamento celular em relação à mitose do tecido conjuntivo. Junqueira; Carneiro (2004) referem que uma mitose celular pode durar horas, meses ou anos. Nos tecidos de rápida renovação como epitélio e MO as células se renovam a cada três dias. Todos os outros tecidos apresentam proliferação mais lenta, em média 20 a 64 dias.

A imobilização interna da articulação tíbio-tarsiana manteve a articulação do tarso estável impedindo o movimento articular e não prejudicou a anastomose permitindo uma melhor organização da proliferação tecidual e um alinhamento mais precoce dos feixes de fibras que já foi observado aos quatorze dias de evolução nos grupos GII e GIII. Foi verificado também, melhor desempenho funcional, melhor vascularização e menor aderência em todos os animais destes grupos.

Nas avaliações clínicas entre os escores contrastes das médias dos cães de todos os grupos em relação à regeneração e adaptação da deambulação nos tempos de sete, quatorze e trinta dias, foram observados que a imobilização aplicada favoreceu a recuperação precoce dos animais até os quatorze dias de evolução nos grupos GII GIII, sendo também significativo aos trinta dias quando comparados com o grupo controle (Tabela 6). Na avaliação desses parâmetros os animais tiveram desenvolvimento clínico de deambulação mais rápida que o grupo controle até os 14 dias e após, a evolução foi mais lenta, porém clinicamente evolutiva, até completarem 30 dias, sendo significativa estatisticamente nos grupos GI, GII e GIII. Esses resultados são contrários aos encontrados por Freitas et al. (2006) que não observaram diferença significativa entre os grupos que foram imobilizados com pino intra-articular com avaliação até 30 dias de evolução.

Segundo Kushner et al. (1991), períodos longos de imobilização levam a múltiplas complicações como atrofia muscular, aderências teno-cutâneas, alterações tróficas neurais, osteoartrite, tromboflebite, necrose de pele, osteoporose e re-rupturas. Neste experimento, até o período de avaliação de 30 dias não foram observadas alterações semelhantes ao citado pelo autor, talvez pelo método de imobilização utilizado que minimizou aos animais de todos os grupos (GI, GII, GIII, GIV) seus efeitos deletérios.

#### 4. CONCLUSÕES

Nas condições em que foram realizados os experimentos e com base nos resultados obtidos é possível concluir que:

1- a técnica de colheita de medula óssea com *Kit collection Bone marrow* e agulha Steis é um método rápido e eficaz e proporciona a obtenção de um botão celular com alta viabilidade,

2- os nanocristais coloidais Q-tracker 655 são eficientes como marcadores celulares para identificação de células mononucleares da medula óssea *in natura*,

3- os nanocristais coloidais Q-tracker 655 são eficientes como marcadores celulares para identificação de células mononucleares da medula óssea em processo regenerativo do tendão calcâneo no período de até 7 dias pós lesão,

4- as células mononucleares da medula óssea não influenciaram na qualidade do processo regenerativo do tecido tendíneo no período de até 30 dias de avaliação pós-cirúrgica.

5- sugerem-se novos estudos sobre o efeito da aplicação das células mononucleares por um tempo maior de avaliação com a mesma matriz extracelular apresentada.

## 5. REFERÊNCIAS

AAGAARD, L.; ROSSI, J. J. RNAi Therapeutics: Principles, Prospects and Challenges. **Advances Drug Delivery Reviews**, v. 30, n. 59, p. 75–86, Mar., 2007.

AKERMAN, M. E. et al. Nanocrystal targeting in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 332, p. 12617-12621, Apr., 2002.

ALVES, A. L. G. et al. Influência do fumarato de beta-aminopropionitrila associada ao exercício na cicatrização tendínea equina – avaliação clínica e ultra-sonográfica. **Revista Educação Continuada. CRMV-SP**, São Paulo, v. 4, n. 1, p. 19-27, 2001b.

AOKI, M. et al. Effect of suture knots on tensile strenght of repaired canine flexor tendons. **Journal of Hand Surgery**, Edinburgh, v. 20B, n. 1, p. 72-75, Jan./Feb., 1995.

ARON, D. N. Técnicas de reparo de tendões. In: BOJRAB, M. J. **Técnicas atuais em cirurgia de pequenos animais**. 3. ed. São Paulo: Roca, 1996. 516 p.

ASLAN, H. et al., Molecular targets for tendon neofornation. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 2, p. 439-444, Feb., 2008.

AUTEFAGE, A. La cicatrizzazione dei tendini e dei ligamenti. **Summa Italia**, v. 16, n.1, p. 29-34, 1999.

AWAD H. A. et al. *In vitro* characterization of mesenchymal stem cells seeded collagen MECs for tendon repair: effects of initial seeding density on contraction kinetics. **Journal of Biomedical Materials Research**, Hoboken, v. 51, n. 3, p. 229-233, May/June., 2000.

AWAD H. A. et al. Repair of patellar tendon injuries using a cell–collagen composite. **Journal of Orthopaedic Research**, New York, v. 21, n. 5, p. 420-431, Sept./Oct., 2003.

BACIPALUGO, A. et al. Bone marrow harvest for marrow transplantation: effect of multiple small (2 ml) or large (20) ml aspirates. **Bone Marrow Transplantation**, Basingstoke, v. 9, n. 1, p. 467-470, Jan./Feb., 1992.

BADYLAK, S. T. et al. The use of xenogenic small intestinal submucosa as a biomaterial for Achilles tendon repair in a dog model, **Journal Biomedical Materials Research**., Hoboken, v. 29, n. 5, p. 977-985, Sept./Oct., 1995.

BAKER, B. M.; MAUCK, R. L. The Effect of Nanofiber Alignment on the Maturation of Engineered Meniscus Constructs. **Biomaterials**, Surrey, v. 28, n. 11, p. 1967–1977, Jun., 2007.

BAKSH D, et al. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. **Journal of Cell Molecular Medicine**, v .8, p. 297-301, 2004.

BARREIRA, A. N. B. **Implante autólogo de células mesenquimais no tratamento de tendinites induzidas em eqüinos: avaliação clínica, ultra-sonográfica, histopatológica e imunoistoquímica**. 2005. 98 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

BARROS, S. V. S. G. et al. Autoenxerto percutâneo de medula óssea em coelhos. I coleta, preparo e aplicação. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 6, p. 1013-1018, Nov./Dez., 2001.

BENJAMIN, M., et al. Where tendons and ligaments meet bone: attachment sites (‘entheses’) in relation to exercise and/or mechanical load. **Journal of the Anatomy**, v. 208, p. 471-490, Mar., 2008.

BENOIT, D. S. W. et al. Manipulations in hydrogel degradation behavior enhance osteoblast function and mineralized tissue formation, **Tissue Engineering**, New York, v. 12, n. 6, p. 1663–1673, Jun., 2006.

BI, Y. et al. Identification of tendon stem/progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche. **Nature Medicine**, New York, v. 13, p. 1219-1227, Sept., 2007.

BIRK, D.E. et al. Collagen fibrillogenesis in situ: fibril segments become long fibrils as the developing tendon matures. **Developmental Dynamics**, New York, v. 208, n. 2, p. 291-298, Feb., 1997.

BLOOMBERG, M. Muscle and tendon In: SLATTER, D.H. **Textbook of Small Animal Surgery**. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: Saunders, 1993. Cap. 146. p. 1996-2000. v. 2.

BORM, P. J .A. The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 3, n. 11, p. 1-35, Nov., 2006.

BOYUM, A. Separation of leukocytes rom blood and bone marrow. Introduction. **Scand. Journal Clinical Laboratory Investigation Supplement**, v. 97, p. 7, Jan., 1968.

BRADEN, T. D, Fascia lata transplant for repair of chronic Achilles tendon defects. **Journal of the American Animal Hospital Association**, Lakewood, v. 12, n. 5, p. 800-805, Sept./Oct., 1976.

CALLAN, M. B. Red blood cell transfusions in the dog and cat. In: FELDMAN, B. F. et al. **Schalm's veterinary hematology**. Philadelphia: Lippincott Williams ; Wilkins, 2000. Cap. 123. p. 833-837.

CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells. **Journal Orthopaedic Research**, New York, v. 9, n. 5, p. 641-650, Sept./Oct., 1991.

CAR, B. D.; BLUE, J. T. Approaches to evaluation of bone marrow function. In: FELDMAN, B.F. et al. **Schalm's veterinary hematology**. 5th ed. Philadelphia : Lea ; Febiger; 1999. Cap. 2, p. 33-35.

CARDONA, R. O. **Tendão extensor digital comum homólogo conservado em glicerina 98% na ráfia tendínea em pôneis**. Santa Maria, 2006. 14 p. Disponível em: [coralx.ufsm.br/eventos/evento.php?id=777](http://coralx.ufsm.br/eventos/evento.php?id=777). Acesso em: 18 nov 2006.

CHAMBERLAIN, G. et al. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. **Stem Cells**, Durham, v. 25, p. 2739-2749, Apr., 2007.

CHAN, B.P. et al. Effect of basic fibroblast growth factor. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Philadelphia, n. 342, p. 239-247, Dec., 1997.

CHANG, J. et al. Molecular studies in flexor tendon wound healing: The pole of basic fibroblast growth factor gene expression. **Journal of Hand Surgery**, Edinburgh, v. 23A, n. 6, p. 1052-1058, Nov./Dec., 1998.

CHOW, D.C. et al. Modeling pO(2) distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. **Journal Biophysical**, Utah, v. 81, p. 675-684, Jun., 2001.

CLAPP, A. R. et al. Fluorescence resonance energy transfer between quantum dot donors and dye-labeled protein acceptors. **Journal of the American Chemical Society**, Utah, v. 126, p. 301-310, May., 2004.

COHEN, J.A.; BRECHER, M.E. Preoperative autologous blood donation: benefit or detriment? A mathematical analysis. **Transfusion**, Baltimore, v. 35, n. 8, p. 640-644, Feb., 1995.

COMARCK, D. H. **Histologia**. 9. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.p. 209-210.

COSTA NETO, et al. Tenoplastia experimental do calcâneo em cães com peritônio bovino conservado em glicerina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, n. 4, p. 697-703, Dez., 1999.

CULAW, E.M. et al. Connective tissues: Matrix composition and its relevance therapy. **Physical Therapy**, Saltimore, v. 79, n. 3, p. 308-319, Dec.,1999.

DANESHVAR, H. et al. Imaging characteristics of zinc sulfide shell, cadmium, telluride core quantum dots. **Nanomedicine**, New York, v. 3, p. 21-29, Aug., 2008.

DA SILVA MEIRELLES, L. et al. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 119, n. 11, p. 204-2213, Aug., 2006.

DENNEHEY, T. et al. **Bone marrow kit**. Capturado em 08 dezembro 2008. On line. Disponível na Internet <http://www.freepatentsonline.com/6523698.html>.

DIEBOLD, J. M. et al. Bone marrow manifestations of infections and systemic diseases observed in bone marrow trephine biopsy. **Histopathology**, London, v. 37, p. 199-211,Sept., 2000.

DOBSON, A. J. **An introduction to generalized linear models**. 2nd ed. Boca Raton: Chapman e Hall, 2002, 225 p.

DONALDSON, K., et al. Nanotoxicology. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**, Chicago, v. 61, n. 9, p. 727-728, Jun., 2004.

DU, W. Optical molecular imaging for systems biology: from molecule to organism. **Anal Bioanal Chemical**, v. 386, p. 444-457, Oct.,2006.

EARLEY, T. D. Tendon disorders. In: BOJRAB, M. J. (Ed.). **Pathophysiology in small animal surgery**. Philadelphia : Lea ; Febiger, 1981. cap. 99. p.851-866.

EL-WARRACK, A. O.; SCHOSSLER, J. E. Osteossíntese diafisária de tíbia em cães mediante inserção intramedular de pinos de Steinmann pela crista tibial. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 28, n. 1, p.77-82, Jan./Mar., 1998.

ENWEMEKA, C. S.; SPIELHOLZ, N. L. Modulation of tendon growth and regeneration by electrical fields and currents. In: CURRIER, D. P.; NELSON, R. M. **Dynamics of human biological tissue**, Philadelphia: F.A. Davis Company, Cap. 3. p. 231-254, 1992.

ENWEMEKA, C.S. et al. Laser photostimulation of collagen production in healing rabbit achilles tendons. **Lasers in Surgery and Medicine**, New York, v. 22, p. 281-287, Nov., 1998.

ENWEMEKA, C. S.; REDDY, K. The biological effects of laser therapy and other physical modalities on connective tissue repair process. **Laser Therapy**, Los Angeles, v. 12, p. 22-30, Sept., 2000.

ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária**. 4. ed São Paulo: Manole, 1995. Cap. 133, v. 2, p. 2374-2393.

EVANS, H. E., DE LAHUNTA, A. **Miller guia para dissecação do cão**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. 206 p.

FAGOT-LARGEAULT, Anne. Embriões, células-tronco e terapias celulares: questões filosóficas e antropológicas. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 18, n. 51, Mar., 2004.

FERNANDEZ, F. R.; GRINDEM, C. B. Reticulocyte response. In: FELDMAN, B. F. et al. **Schalm's veterinary hematology**. Philadelphia: Lippincott Williams ; Wilkins, 2000. Cap. 19. p. 110-116.

FINK, T. et al. Induction of adipocyte-like phenotype in human mesenchymal stem cells by hypoxia. **Stem Cells**, New Orleans, v. 22, n. 7, p. 1346-1355, 2004.

FOSSUM, T. W. et al. **Cirurgia de Pequenos Animais**. São Paulo: Roca, 2002. 1335 p

FREITAS, P. M. C. et al. Eletroacupuntura aplicada nas fases precoce da cicatrização do tendão calcâneo comum de coelhos após reparo tardio com peritônio após reparo tardio com peritônio bovino conservado em solução supersaturada de sal: aspectos clínicos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 6, p. 1830-1836, Nov./Dez., 2006.

FRIEDENSTEIN, A.J. et al. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. **Experience Hematology**, New York, v. 4, p. 267-274, Jan., 1976.  
GELBERMAN, R. H. et al. The early stages of flexor tendon healing: a morphologic study of the fist fourteen days. **Journal of Hand Surgery**, Edinburgh, v. 10a, n. 6, p. 776-784, Nov./Dec., 1985.

GIFT, L. J. et al. The Influence of intratendinous sodium hyaluronate on tendon healing in horses. **Veterinary and Comparative Orthopaedic Traumatology**, Sydney, v. 5, p. 151-7, Feb., 1992.

GIGANTE, A. et al. Fibrillogenesis in tendon healing on healing on experimental study. **Journal Biology Research**, Thessaloniki, v. 7, n. 8, p. 2003-210, Oct.,1996.

GRONTHOS, S. et al. Molecular and cellular characterization of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. **Journal Cell Science**, Cambridge, v.116, p. 1827-1835, Mar., 2003.

GUARITA-SOUZA, L.C. et al. Comparision of mononuclear and mesenchymal stem cell transplantation in myocardium infaction. **Brazilian Journal Cardiovascular Surgery**, São José do Rio Preto, v. 20, n.3, p. 270-278, 2005.

GUEST, D. J. et al. Monitoring the fate of autologous and allogeneic mesenchymal progenitor cells injected into the superficial digital flexor tendon of horses: preliminary study. **Equine Veterinary Journal**, Cambridge, v. 40, p.178-181, Apr.,2008.

GWINN, M. R.; VALLYATHAN, V. Nanoparticles: Health Effects—Pros and Cons. **Environmental Health Perspectives**, New York, v. 114, n. 12, Jun., 2006.

HADDAD, J. L. et al., Microsurgical reconstruction of the Achilles tendon with a fascia lata flap. **Journal Reconstructive Microsurgery**, Washington, v. 13, n.5, p. 309-312, Jan.,1997.

HANAKI, K. et al. Semiconductor quantum dot/albumin complex is a long-life and highly photostable endosome marker. **Biochemical Biophysical Research Communications**, Japan, v. 302 p. 496–501, Sept., 2003.

HARREL, K. et al.. Canine transfusion reactions. Part II. Prevention and treatment. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, New, York, v.19, n.2, p.193-200, May.,1997.

HARRIS, M. T, et al Mesenchymal stem cells used for rabbit tendon repair can form ectopic bone and express alkaline phosphatase activity in constructs. **Journal of Orthopaedic Research**, New York, v. 22, n. 6, p.991- 998, Nov./Dec., 2004.

HASSAN, M.E. et al. Nanodiagnostics: A new frontier for clinical laboratory medicine. **Clinical Chemistry**, Boston, v. 52, p. 1238-1246, 2006.

HERTHEL, D. J. Suspensory desmitis therapies equine In: ACVS VETERINARY SYMPOSIUM, 2002, **Proceedings of ACVS...**, San Diego, 2002, p.165-167.

HIRANUMA, K. et al. Extracelular matrices in peritendineous connective tissue after surgical injury to the chicken flexor tendon. **Archives of Orthopaedic Traumatology and Surgery**, Heidelberg , v. 115, p.63-67, Sept.,1996.

HOLZCHUH, M. P. et al. Emprego experimental do pericárdio de equino conservado em glicerina, na substituição do tendão de Aquiles em coelhos. Aspectos histológicos. **Comunicação Científica Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 14, n 1, p. 57, 1990.

HUANG, H. et al. Differentiation of human embryonic stem cells into smooth muscle cells in adherent monolayer culture. **Biochemical Biophysical Research Communication**, New York, v. 17, Jan., 2006.

INVITROGEN. Molecular probes. Qdot® nanocrystal technology. Catálogo de produto. Disponível em: probes invitrogen.com. Acesso em 12 de dezembro de 2008.

ISODA, K. et al. Maintenance of hepatocyte functions by coculture with bone marrow stromal cells. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Japan, v. 97, p. 343-346, Oct., 2004.

ITO, Y. et al.. A novel mutant of green fluorescent protein with enhanced sensitivity for microanalysis at 488 nm excitation. **Biochemical Biophysical Research Communications**. New York, v. 264, p. 556–560, 1999.

JIANG, Y. et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. **Nature**, New York, v. 418, p. 41-49, Jul.,2002.

JOHNSTON, D. E. Tendons, skeletal muscles, and ligaments in health and disease. In: NEWTON, C. D.; NUNAMAKER, D. M. **Textbook of small animal orthopaedics**. Philadelphia: Lippincott, 1985. Cap. 4, p. 65-76.

JÓZSA, L. et al. Blood Flow in Rat Gastrocnemius Muscle and Achilles Tendon after Achilles Tenotomy. **European Surgery Research**, Springer Wien, v.30, n.2, Feb., 1998.

JUNCOSA-MELVIN, N. et al.. Effects of cell to collagen ratio in mesenchymal stem cell-seeded implants on tendon repair biomechanics and histology. **Tissue Engineering**, New York, v. 11, n. 2, p. 441- 448, Mar./Apr., 2005.

JUNCOSA-MELVIN, N. et al.. The effect of autologous mesenchymal stem cells on the biomechanics and histology of gelcollagen sponge constructs used for rabbit patellar tendon repair. **Tissue Engineering**, New York, v. 12, n. 2, p. 365-369, Feb., 2006.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 487 p.

KAKAR, S. et al. Differential cellular response within the rabbit tendon unit following tendon injury. **Journal of Hand Surgery**, New Jersey, v. 23B, n. 5, p. 627-632, Sept./Oct., 1998.

KESSLER, I.; NISSIM, F.: Primary repair without immobilization of flexor tendon division within the digital sheath. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, London, v. 40, p. 587-601, May., 1969.

KILLINGSWORTH, C. R. **Repair of injured peripheral nerves, tendons and muscles: Surgical complications and wound healing in the small animal practice**. Philadelphia: Saunders, 1993. Cap. 7. p. 169-202.

KIRSCHSTEIN, R. Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions [online]. **Department of Health and Human Services**. Jun. 2001. Disponível em: <<http://stemcells.nih.gov/info/scireport/2001report>>. Acesso em 11 de junho de 2008.

KOBAYASHI, A. et al. Morphological and Histochemical Analysis of a Case of Superficial Digital Flexor Tendon Injury in the Horse. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v. 120, n. 4, p. 403-414, May., 1999.

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.

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

KRAMPERA, M. et al. Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair. **Bone**, Boston, v. 39, n. 4, p. 678-683, Oct., 2006.

KUSCHNER, S. H. et al. A comparison of the healing properties of rabbit achilles tendon injuries at different levels. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, New York, n. 272, p. 268-273, May., 1991.

LITTEL, R. C. et al. **SAS System for Linear Models** 3rd ed. SAS Institute Inc.: Cary, NC, USA. , 1991, 329 p.

LOPES et al. Reticulócitos e hematócrito de cães pré e pós esplenectomia parcial. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 3, p.1000-1003, Maio/Jun., 2006.

LUCCARDINI, C. et al., Getting Across the Plasma Membrane and Beyond: Intracellular Uses of Colloidal Semiconductor Nanocrystals. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, New York, v. 1, p. 1-9, Nov., 2007.

LUCIDI, C. A.; TAKAHIRA, R. K. Granulocyte colony-stimulating factor use in neutropenias in dogs and cats. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 915-920, Maio/Jun., 2007.

LUNA, L.G. **Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology**. 3rd ed. New York: McGraw-Hill, 1968. 258 p.

MACHADO, V. M. V. **Efeito do laser terapia em tendinite induzida experimental no tendão flexor digital superficial em equinos: estudos histológico e ultrasonográfico**.1999.53 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

MANSKLE, P.R., et al. Intrinsic flexor-tendon repair: a morphological study *in vitro*. **The Journal Bone and Joint Surgery**, v. 66-A, n. 3, p. 385-389, Mar., 1984.

MARSH, J. N. et al. Molecular imaging with targeted perfluorocarbon nanoparticles: Quantification of the concentration dependence of contrast enhancement for binding to sparse cellular epitopes. **Ultrasound Medicine Biological**, New York, v. 33, n. 6, 950–958, Oct., 2007.

MASSUMOTO, C.; MIZUKAMI, S. Autologous bone marrow transplantation and posttransplant immunotherapy. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 33, p. 405-414, May., 2000.

MAXWELL, L. Therapeutic Ultrasound: Its Effects on the cellular and molecular mechanisms of inflammation and repair. **Physiotherapy**, New York, v. 78, n. 6, p. 421-425, Feb.,1992.

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

MEDINA, C. et al. Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance. **British Journal of Pharmacology**, New York, v. 150, 552–558, Mar., 2007.

MICHALET, X. et al. Quantum Dots for Live Cells, in Vivo Imaging, and Diagnostics. **Science**, New York, v. 307, n. 5709, p. 538–544, Jan., 2005.

MIJOVIC, A. et al. Preoperative autologous blood donation for bone marrow harvests: are we wasting donors time and blood? **Transfusion Medicine**, Cambridge, v.16, p.57-62, Feb., 2006.

MORAES, J. R. E. et al. Efeito da localização do nó de sutura na recuperação morfofuncional do tendão flexor digital profundo do membro torácico do cão após tenorrafia experimental. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 37, n.1, p. 6, Set., 2000.

MORRISEY, P.; COTTER, S. I need blood stat! Canine transfusion medicine. **Veterinary Technician**, Yardley, v.21, n.5, p. 273-278, 2000.

NARDI, N. B.; MEIRELLES, L. S. Mesenchymal stem cells: Isolation in vitro expansion and characterization. **Handbook Experimental Pharmacology**. New York, v. 174, p. 249-282, 2006.

NELLAS, Z. J. et al. Reconstruction of an Achilles tendon defect utilizing an Achilles tendon allograft. **Journal Foot Ankle Surgery**, Baltimore, v.35, n. 2, p. 144-148, 1996.

NEURINGER, I. P.; RANDELL, S.H. Stem cells and repair of lung injuries. **Respiratory Research**, New York, v. 5, n.6, 2004.

NEVES, A. A. R. **Nanocristais Coloidais de Semicondutores II-VI e IV-VI**. 2002.113 f. Tese (Doutorado em Física) – Instituto de Física Gleb Wataghin, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

NIRMALANANDHAN, V. S. et al. Effects of cell seeding and collagen concentration on contraction kinetics of mesenchymal stem cell-seeded collagen constructs. **Tissue Engineering**, New York, v.12, n. 7, p. 1865-1870, Jul., 2006.

OLIVEIRA, G. K. **Células-tronco mononucleares autólogas na cicatrização de defeitos tíbiais agudos experimentais de cão**. 2008. 50 f. Dissertação (Mestrado em Medicina veterinária) – Universidade federal de Santa Maria, Santa Maria.

OREFFO, R. O. C.; TRIFFITT, J. T. Future potentials for using osteogenic stem cells and biomaterials in orthopedics. **Bone**, New York, v. 25, n. 2, p. 5S–9S, Aug., 1999.

PACINI, S. et al. Suspension of bone marrow–derived undifferentiated mesenchymal stromal cells for repair of superficial digital flexor tendon in race horses. **Tissue Engineering**, New York, v. 13, n. 12, p. 2949-2955, Dec., 2007.

PANOSSIAN, V. et al. Fibroblast growth factor and epidermal growth factor receptors in ligament healing. **Clinical Orthopaedic**, New York, v. 342, p. 173-80, Dec., 1997.

PAPLER, P. G. Avaliação numérica das ondulações das fibras colágenas em ligamento patelar humano (tendão patelar). **Revista Brasileira de Ortopedia**, São Paulo, v. 36, n. 8, p. 317-321, Ago., 2001.

PARAK, W. J. et al. Labelling of cells with quantum dots. **Nanotechnology**, New Haven, v. 16, p. 9-25, Jun., 2005.

PARKKALI, T. et al. Collection of autologous blood for bone marrow donation: how useful is it? **Bone Marrow Transplantation**, Basingstoke, v. 35, p. 1035-1039, Nov., 2005.

PARIZOTTO, N. A. Utilização da fonoforese em distúrbios músculo-esqueléticos: uma meta-análise. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, São Paulo, v. 7, n. 1, p. 40-55, Out. 2003.

PAYNE, J. T., TOMLINSOM, J. L. Composition, structure, and function of muscle, tendon and ligament. In: BOJRAB, M.J. **Disease mechanisms in small animal surgery**. 2nd ed. Philadelphia: Lea ; Febiger, 1993. Cap. 95. p. 656-662.

PEREIRA, F. E. L. Degenerações. Morte Celular. Alterações do interstício. In: BOGLIOLO, **Patologia**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. p. 47-81.

PEREZ, R. R. et al. A ação do decanoato de nandrolona (Deca-durabolin®) sobre parâmetros hematológicos e proteína total plasmática de ratos (*Rattus rattus*) com depressão medular induzida após administração de sulfato de vincristina (Oncovin®). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 2, p. 589-595, Mar./Abr., 2005.

PIERMATTEI, D. L.; FLO, G. L. **Manual de ortopedia e tratamento das fraturas de pequenos animais**. 3. ed. São Paulo: Manole, 1999. 649 p.

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

POOL, R. R. Pathologic changes in tendinitis of athletic horses. In: DUBAI INTERNATIONAL EQUINE SIMPOSIUM, Dubai. 1996, **Proceedings...** Dubai, Neyenesch Printers., 1996, p.107- 17.

POSTACCHINI, F.; DE MARTINO, C. Regeneration of rabbit calcaneal tendon: maturation of collagen and elastic fibers following partial tenotomy. **Connective Tissue Research**, New York, v. 8, p. 41-47, Jan., 1980.

POTIER, E.; PETITE, H. Utilisation thérapeutique des cellules souches en orthopédie. **Pathologie Biologie**, Paris, v. 53, p. 142-148, Mar., 2005.

PROPHET, E. B. et al. **Laboratory methods in histotechnology**, Washington: American Registry of Pathology, 1994. 278 p.

RAISER, A. G. **Homoimplante ortotópico de tendão calcâneo comum, conservado em glicerina a 98%, e tratado com radiação laser Arseneto de Gálio, sob dois métodos de imobilização, em cães**. 2000. 88 f. Tese (Doutorado em Cirurgia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

RAISER, A. G. et al. Homoimplante ortotópico de tendão calcâneo em cães: conservação, assepsia e implantação. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 1, p. 89-94, Jan./Fev., 2001

REED, B.; ZARRO, V. Inflammation and repair in the use of thermal agents. In: MICHLOVITZ, S. L. **Thermal agents in rehabilitation**. 2nd ed. Philadelphia: F.A. Davis Company, p. 3-17, 1990.

REDDY, G. K. et al.. Laser photostimulation of collagen production in healing rabbit Achilles tendons. **Lasers in Surgery and Medicine**, New York, v. 22, p. 281-287, May., 1998.

REINKE, J. D., KUS, S. P. Achilles mechanism injury in the dog. **Compendium Continuing Education for the Practicing Veterinary**, Trenton, NJ, v. 4, n. 8, p. 639-646, Aug., 1992.

REYNOLDS, N. L.; WORRELL, T. W. Chronic Achilles peritendinitis: etiology pathophysiology and treatment. **Journal of Orthopaedic; Sports Therapy**, Alexandria, v. 13, n. 4, p. 171-176, Apr., 1991.

REYES, M. et al. Origin endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. **The Journal of Clinical Investigation**, Michigan, v. 109, p. 227-346, Nov., 2002.

REZENDE, C. M. F. et al. Estudo experimental do poliuretano de óleo de mamona (*Ricinus communis*) como substituto parcial do tendão calcâneo comum em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 53, n. 6, p. 695-700, Nov./Dez., 2001.

RICHARDSON, L. The use of mesenchymal stem cells in the treatment of equine tendon injuries. Department of Veterinary Clinical Sciences, **The Royal Veterinary College**, 2005. (apostila).

ROCO M. C. Environmentally responsible development of nanotechnology. **Environment Science Technology**, Iowa, v. 39, n.5, p.106–112, Mar., 2005.

RUSSEL, J. E.; MANSKLE, P. R. Collagen synthesis during primate flexor tendon repair in vitro. **Journal of Orthopaedic Research**, New York, v. 8, n. 1, p. 13-20, Jan./Feb., 1990.

SAMOTO, V. Y. **Terapia celular cardíaca: vias de infusão de células mononucleares em cães s.r.d.** 2006. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

SARTORI FILHO, R. et al. Emprego de membrana biológica (centro frênico) na reparação das lesões tendíneas em coelhos. **Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, v. 9, p. 69-77, Jan/Feb., 1997.

SAS Institute Inc<sup>®</sup> 2003 **SAS Ver. 9.1** . SAS Institute Inc.: Cary, NC, USA. Lic. UDESC.

SCHMITT, I. et al., Os efeitos da radiação laser arseneto de gálio (AsGa) sobre a regeneração de tendões em cães. **Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 145-149, 1993.

SILVARES, P. R. A. **Enxerto de pericárdio bovino tratado pelo glutaraldeído em tendão calcâneo - Estudo experimental em ratos.** 1990. 91 f., Dissertação (Mestrado em cirurgia experimental) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu.

SILVEIRA, P. A. A. Hematopoese:alguns aspectos. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, São Paulo, v. 22, n. 5, p. 5-6, Mar./Abr., 2000.

SNEDECOR, G. W.; COCHRAN, W. G. **Statistical methods**. 8th.ed. Ames: Iowa State University, 1994. 503 p.

SOBANIA, L. C, Lesões dos tendões flexores. In: PARDINI, A.G. J. R. **Traumatismos da Mão**. 2. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1992, 600 p.

SOKOLSKY-PAPKOV, M. et al. Polymer carriers for drug delivery in tissue engineering. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 4, p. 187-206, May., 2007.

SOMA, C. A.; MANDELBAUM, B. R. Repair of acute achilles tendon ruptures. **Orthopedic Clinics of North America**, Philadelphia, v. 26, n. 2, p. 239-247, Apr./Jun., 1995.

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.

STEPHENS, D. J.; ALLAN, V. J. Light microscopy techniques for live cell imaging. **Science**, New York, v. 300, p. 82–86, 2003.

SUTER, S.E. et al. Isolation and characterization of pediatric canine bone marrow CD34+ cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 101, n.1-2, p.31-47, Sept., 2004.

SUKHANOVA, A. et al. Higly stable fluorescent nanocrystals as a novel class of labels for immunohistochemical analysis of paraffin-embeded tissue sections. **Laboratory Investigation**, Hagerstown v. 82, n. 9, p. 1259-1261, Sept., 2002.

SZENT-GYORGVI, C. et al. Fluorogen-activating single-chain antibodies for imaging cell surface proteins. **Nature Biotechnology**, New York, v. 26, n., 2, p. 235-240, Feb., 2008.

TOGNOLI, G. K. **Autotransplante da fração mononuclear da medula óssea em úlcera corneana por hidróxido de sódio experimental em cães**. 2008. 51 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

TOGNOLI, G. K. et al. Autotransfusão sangüínea na colheita de medula óssea em cães. In: SIMPÓSIO MULTIDISCIPLINAR SOBRE CÉLULAS-TRONCO, 2., 2007, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, 2007. v. 2. 60 p. p. 31-32.

TSIEN, R. Y. The green fluorescent protein. **Annual Reviews Biochemical**, San Diego, v. 67, p. 509-544, 1998.

TUDURY, E. A.; RAISER, A. G. Redução de fraturas distais do fêmur de cães, empregando dois pinos de Steinmann em substituição aos de Rush. **Revista Centro de Ciências Rurais**, Santa Maria, v. 15, n. 2, p. 141-155, Abr./Jun., 1985.

VAZ, C. E. S. **Avaliação do efeito de centrifugado osteogênico de medula óssea na consolidação de fratura: estudo experimental em coelhos**. 2006. 109 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

VOLLWEILER, J. L. et al. Hematopoietic stem cell gene therapy: progress toward therapeutic targets. **Bone Marrow Transplantation**. Basingstoke, v. 32, p. 1-7, 2003.

WANDERER, C. et al. Use of lecithins to evaluate the effects of GaAs softlaser on dog tendon. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Research**, São Paulo, v. 27, n. 29, p. 2241-2251, Sep., 1994.

WANG, D. E. Tendon repair. **Journal of Hand Therapy**, New Jersey, v. 11, n. 2, p. 105-110, Mar./Apr., 1998.

WILLER, R. L.; RIEDESEL, D. H. Transfusion therapy and blood banking in the dog and cat. **Iowa State University Veterinary**, v. 47, p. 102-109, Mar/Apr., 1985.

WILLIAMS, I. F. Studies on the pathogenesis of equine tendonitis following collagenase injury. **Research in Veterinary Science**. London, v. 36, n. 3, p. 326-328, May/Jun., 1984.

WU, X. et al. Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots. **Nature Biotechnology**, New York, v. 21, n.1, p. 41-46, Jan., 2003.

WU, X.; BRUCHEZ, M. P. Labeling cellular targets with semiconductor quantum dot conjugates. **Methods in Cell Biology**, New York, v. 75, p.171-183, 2004.

ZAGO, M. A.; COVAS, D. T. Pesquisas com células-tronco: aspectos científicos, éticos e sociais. In. SEMINÁRIO DO INSTITUTO FERNANDO HENRIQUE CARDOSO, 2004, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Instituto Fernando Henrique Cardoso, 2004. 32 p.

ZHANG Y et al.. Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake. **Biomaterials**, Surrey, v. 23, n. 7, p.1553–1561, Apr., 2002.

ZUK, P.A. et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Engineering**, New York, v. 7, n. 2, p. 211-228, Mar./Apr., 2001.

## APÊNDICE

Apêndice 1- Médias e desvios-padrão para a deambulação, cicatrização (variáveis fibroblasto, colágeno e neoangiogênese), inflamação (variáveis hemácias, coágulos, fibrina, células mononucleares e polimorfonucleares), de acordo com o período de avaliação (7, 14 e 30 dias), de cães submetidos ou não a transplante de células mononucleares e matriz extracelular, sob imobilização interna após tenectomia do tendão calcâneo.

Dia	Grupo	Deambulação	Cicatrização (Fibroblastos, colágeno, neoangiogênese)	Inflamação (Hemácias, coágulos, fibrina, células mononucleares e polimorfonucleares)
		X±s	X±s	X±s
7	Ia	3,0±1,0	5,0±1,14	5,40±0,63
	IIb	3,33±1,52	5,54±0,97	3,74±0,90
	IIIc	4,33±1,15	5,09±0,29	4,66±0,42
	IVd	2,66±0,57	6,93±1,40	1,90±0,65
14	Ia	3,0±1,0	6,20±0,20	4,54±0,05
	IIb	3,66±1,52	7,13±0,83	1,87±0,73
	IIIc	4,66±1,57	7,03±1,01	2,46±1,05
	IVd	1,33±0,57	5,46±0,55	2,79±0,33
30	Ia	4,66±0,57	5,74±0,23	4,53±1,28
	IIb	4,0±1,0	6,50±0,35	2,49±0,62
	IIIc	4,0±1,0	6,33±0,78	2,57±0,83
	IVd	2,66±0,57	4,76±0,39	3,47±0,50

X= média

s = desvio-padrão