

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**MEMBRANA AMNIÓTICA E CÉLULAS-TRONCO MELHORAM O PERFIL
IMUHISTOQUÍMICO EM TENDÕES DE AQUILES LESIONADOS DE RATOS**

Doutoranda: Rosangela Alquieri Fedato Develis

Orientador: Prof. Dr. Luiz Cesar Guarita Souza

Co-orientador: Prof. Dr. Júlio César Francisco

Curitiba, fevereiro de 2024

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**MEMBRANA AMNIÓTICA E CÉLULAS-TRONCO MELHORAM O PERFIL
IMUHISTOQUÍMICO EM TENDÕES DE AQUILES LESIONADOS DE RATOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde como parte
da Qualificação para obtenção do Título de
Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Cesar Guarita Souza

Co-orientador: Prof. Dr. Júlio César Francisco

Curitiba, agosto de 2024

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, à anterior e à presente.

Agradeço à família anterior (Mãe Lúcia *in memoriam*, Madrinha Vilma e padrinho Rubens, *in memoriam*), pelos valores ensinados, que me norteiam até hoje, e por terem feito crescer em mim o desejo de estar no meio acadêmico, ensinando e aprendendo.

À família atual, marido Rodrigo e filho Rubens, que souberam entender as horas de ausência. Sem o meu principal incentivador, Rodrigo, meu sonho de mestrado e doutorado não teria se realizado, pois sem suas palavras, eu haveria desistido antes de começar. O amor mais lindo é o que abdica de si para ajudar o outro a encontrar seu caminho.

Agradeço a todos os funcionários que estiveram envolvidos em todas as fases do projeto, as secretárias de laboratórios e comitês, aos funcionários do biotério TecPar e dos laboratórios de Técnica Operatória e Patologia Experimental, principalmente Misael, fundamental na execução dos experimentos.

Aos co-autores do artigo originado deste estudo, Guilherme Vieira Cavalcante da Silva, Lúcia de Noronha, Seigo Nagashima, Ana Paula Camargo Martins, Márcia Olandoski, Aline Luri Takejima e Rossana Simeoni, cada um imprescindível a tornar meu projeto uma realidade de frutos.

Aos meus orientadores, Júlio César Francisco e Luiz Cesar Guarita-Souza, por acreditarem em mim, minha idéia, e me guiarem até o fim – que é o começo.

Ao Dr Jamil, deixo registrado todo o carinho, que guardo desde a carta de recomendação à residência que recebi de suas mãos quando doutoranda, e espero que minha trajetória lhe seja motivo de orgulho.

Aos membros da Banca, por disporem de seu tempo e conhecimento.

MEMBROS DA BANCA

PRESIDENTE

Prof. Dr. Luiz César Guarita-Souza

MEMBROS INTERNOS

Prof. Dr. Jamil Faissal Soni

Prof. Dr. Sérgio Luiz Rocha

MEMBROS EXTERNOS

Prof. Dr. Edmar Stieven Filho

Prof. Dr. Ricardo Correa da Cunha

FOLHA INFORMATIVA

A tese foi elaborada segundo a normatização estabelecida pela ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas).

Para a realização dos experimentos deste trabalho foram utilizados o biotério da TECPAR (Faculdade Tecnológica do Paraná), onde os animais ficaram acomodados até a eutanásia, o Laboratório de Técnica Operatória da PUC-PR (Pontifícia Universidade Católica do Paraná), onde foram realizados os procedimentos nos animais, e o laboratório de Patologia Experimental da PUC-Pr, onde foram realizadas as análises histológicas.

Para a citação das referências bibliográficas utilizamos as Normas de Vancouver.

Declaramos não haver conflito de interesses na realização da presente tese.

LISTA DE ABREVIATURAS

CT	CÉLULAS TRONCO.....	16
MA	MEMBRANA AMNIÓTICA.....	16
TNFA	FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA.....	22
IFN	INTERFERON.....	22
IL-6	INTERLEUCINA-6.....	24
IL-4	INTERLEUCINA-4.....	25
IL-13	INTERLEUCINA-1.....	25
MMPS	METALOPROTEINASES DE MATRIZ EXTRACELULAR.....	25
MEC	MATRIX EXTRA-CELULAR.....	25
TGF-B	FATOR DE CRESCIMENTO TUMORAL BETA.....	26
IMDM	ISCOVE'S MODIFIED DUBECCO'S MEDIA.....	31
TCLE	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	32
MAHD	MATRIZ AMNIÓTICA HUMANA DESCELULARIZADA.....	32
PBS	SOLUÇÃO SALINA TAMPONATA COM FOSFATO.....	32
CEUA	COMITE DE ETICA NO USO DE ANIMAIS.....	35
HE	HEMATOXILINA-EOSINA.....	36
SR	SIRIUS RED.....	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Ratos acomodados no biotério	33
Figura 2 Animal anestesiado e preparado para o procedimento.....	35
Figura 3 Analgesia percutânea dos animais no biotério.	35
Figura 4 Imagem per-operatória do tendão	36
Figura 5 Imagem do tendão após sua ressecção	
Figura 6 Imagem de lâmina demonstrando fibras colágenas lineares	40
Figura 7 Quadro demonstrando variação nuclear dos tenócitos, desde lineares até arredondados.....	40
Figura 8 Quadro demonstrando a variação da densidade de tenócitos.....	40
Figura 9 Fotos demonstrando ausência de infiltrado inflamatório e aumento significativo dele.....	40
Figura 10 Fotos demonstrando a ausência de neovascularização e neovascularização predominante	40
Figura 11 Quadro com Lâminas demonstrando o epitendão (seta), corado em eosina, em uma camada de células (normal) até fibrose maciça	40
Figura 12 Lâminas coradas por Sirius Red, demonstrando fibras colágenas tipo I (verde) e III (vermelho).....	42
Figura 13 Lâmina com fraca reação para IL-4 e com forte reação.....	44
Figura 14 Lâmina com fraca reação para IL-6 e com forte reação.....	44
Figura 15 Lâmina com fraca reação para IL-13 e com forte reação.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Teste de Kruskal-Wallis para análise estatística do score histológico nos grupos	37
Tabela 2 Teste de Kruskal-Wallis para análise estatística percentual de colágeno tipo I e III nos grupos	41
Tabela 3 Resultado da análise imunohistoquímica entre os grupos - % marcado pelo anticorpo	42
Tabela 4 *Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$) para análise estatística do percentual de IL-4,6,13 e IFNg nos grupos	45
*Tabela 5 *Teste de Dunn, $p < 0,05$	47

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 TCLE para doação placentária, Paciente 1	62
Anexo 2 TCLE para doação placentária, Paciente 2	63
Anexo 3 Aprovação do CEUA da Pontifícia Universidade Católica do Paraná	64
Anexo 4 Ficha de avaliação de bem estar animal.....	65
Anexo 5 Resultado da análise histológica por HE	66
Anexo 6 Dados da análise histológica por SR.....	67
Anexo 7 Resultado da análise imunohistoquímica entre os grupos - % marcado pelo anticorpo	68
Anexo 8 Coeficiente de relação de Spearman	71
Anexo 9 Submission letter do artigo gerado a partir dos dados desta tese.....	72

RESUMO: Distúrbios tendíneos são comuns na prática clínica e geram grande impacto sócio-econômico devido ao tempo de afastamento de atividades laborais e recreacionais, pois os tratamentos atuais, conservadores (fisioterapia, medicações) ou cirúrgicos (tenoplastias), tem alta taxa de insucesso, fazendo com que essas patologias sejam crônicas e recorrentes. Neste contexto, avançam os estudos relacionados à regeneração tecidual, como o uso de células-tronco, plasma rico em plaquetas e membranas sintéticas ou naturais, alternativas que têm se mostrado promissoras em levar tendões acometidos a uma estrutura mais próxima do tendão normal. Este estudo avalia a resposta do uso de células-tronco mononucleares de medula óssea em associação ao uso de membrana amniótica humana descelularizada no tratamento de lesão de tendão de Aquiles de ratos. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Foram utilizados 40 ratos wistar machos, acomodados em biotério e submetidos aos procedimentos e analgesia de acordo e com aprovação do comitê local de Ética no uso de animais. Os ratos permaneceram com água e ração ad libitum, exceto nas 8 horas antecedentes ao procedimento cirúrgico, em ambiente com umidade e temperatura controlados e jornadas de 12 hs de luz e 12 hs de escuro. Os animais foram randomizados em quatro grupos de tratamento: CT (células-tronco), MA (membrana amniótica), CT + MA (célula-tronco + membrana amniótica) e C (controle, solução salina a 0,9%). Foram submetidos à anestesia com xilazina e quetamina, e à hemisseção de seu tendão de Aquiles direito e sua tenorrafia com fio prolene 4,0. Para os animais do grupo MA e CT + MA, após sutura do tendão, foi suturada membrana amniótica sobre a lesão, também com fio prolene 4,0. Para os animais dos grupos CT e CT + MA ainda foram aplicados ao redor da lesão 2 ml de preparado de sangue autólogo, retirado de suas cristas ilíacas, contendo células-tronco, preparado conforme técnica descrita por Boyum. Os animais do grupo C receberam ao redor da lesão 2 ml de solução salina 0,9%. Todos os animais foram submetidos a rafia de pele, analgesia pós-operatória. Três animais foram a óbito logo após o procedimento e após quatro semanas os demais foram eutanasiados, resultando em 37 tendões disponíveis para análise. Os tendões foram ressecados e encaminhados para análise histológica por hematoxilina-eosina e *sirius-red* e análise imunohistoquímica de IL-6, IFN- γ , IL-4 e IL-13. A análise histológica por hematoxilina-eosina foi feita por patologista cego aos grupos de tratamento através de pontuação de um (máximo desarranjo) a quatro (normal) a cada um destes fatores: forma do tenócito, densidade de tenócitos, espessura de epitendão, presença de infiltrado inflamatório, presença de infiltrado hemorrágico e linearidade da fibra colágena. A avaliação de percentual de colágeno tipo I e III e avaliação imunohistoquímica foram feitas por método semiautomatizado por cores. A análise estatística foi feita pelo IBM SPSS Statistics v.29.9. As variáveis quantitativas foram avaliadas por Kruskal-Wallis e o teste *post-hoc* de Dunn. A correlação entre duas variáveis quantitativas foi analisada pelo coeficiente de correlação de Spearman e a condição de normalidade das variáveis contínuas foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística. Para as comparações múltiplas os valores de p foram corrigidos por Bonferroni. **RESULTADOS:** Não houve diferenças entre os grupos para a análise histológica e de fibras colágenas tipo I e III, porém os grupos tratados com CT + MA apresentaram melhor perfil imunohistoquímico, com maior presença de IL-4 e IL-13, citocinas relacionadas a reparo e organização tecidual. **CONCLUSÃO:** Animais tratados com membrana amniótica e células-tronco em associação apresentam melhor perfil imunohistoquímico em relação ao grupo controle, com tendência a melhor organização tecidual.

PALAVRAS-CHAVES: Tendão de Aquiles, membrana amniótica, células tronco, tendinite

ABSTRACT: Tendon disorders are common in medical practice and cause large socioeconomical impact due to long period of treatment and suspension of labour and recreational activities. Actual treatments (medications, physiotherapy, surgery) fail to promote permanent relief, leading these pathologies to chronicity and recurrence. In this context, studies related to tissue regeneration as stem cells, platelet rich plasma and natural and synthetic membranes, have shown promising results in the treatment of tendinopathies. The current study analyses tissue response to the use of mononuclear bone marrow stem cells in association to human decellularized amniotic membrane in the treatment of Achilles tendon lesion in rats. **METHODS:** This study was authorized by the local committee of ethics in animal use. Forty male Wistar rats were used, accommodated in humidity and temperature controlled environment, with cycles of 12 hours of light and 12 hours of darkness. The animals were randomized in four treatment groups: ST (stem cells), AM (amniotic membrane), ST + AM (stem cells + amniotic membrane) and C (control, 0.9% saline solution). They were anesthetized with xilazine and ketamine and the right Achilles hemitendon sectioned and sutured. To the animals of groups AM and ST + AM, human decellularized amniotic membranes were sutured to the tendon and for the animals of ST and ST + AM 2 ml of autologous blood from their iliac crests, containing ST, prepared as described by Boyum were applied peritendon. Group C animals received peritendon 2 ml of 0.9% saline solution. All animals had their skin sutured and received post-operative analgesics. Three animals died just after procedure. After four weeks the remaining animals were euthanized, resulting in 37 tendons available for analysis. The tendons were removed to histological assessment with hematoxylin-eosin and *sirius red* and immunohistochemical assay for IL-6, IFN- γ , IL-4 and IL-13. Hematoxylin-eosin analysis was made by a pathologist blind to the groups of treatment by pontuating each of these factors from one (maximum derangement) to four (normal): linearity of the fiber structure, shape of the tendon cells, density of the tendon cells, inflammation, hemorrhage and thickness of the epitenon. Evaluation of collagen type I and III, by *sirius red*, and immunohistochemical analysis were made by semiautomatized method by colours. Statistical analysis was run by IBM SPSS Statistics v.29.9. Quantitative variables were analysed by Kruskal-Wallis and Dunn *post-hoc* test. Correlation between variables was analysed by Spearman and normality assessed by Shapiro-Wilk test. P values < 0.05 demonstrated statistical significance. For multiple comparisons p values were corrected by Bonferroni. **RESULTS:** Although there weren't differences between groups in the histological and collagen types I and III analysis, groups treated with ST + AM showed higher levels of IL-4 and IL-13 in comparison to the control group. **CONCLUSION:** As IL-4 and IL-13 cytokines are related to damage control and tissue organization, animals treated with ST + AM in association perform a better immunohistochemical panel in relation to the control group, tending to better tissue organization.

KEY-WORDS: Achilles tendon, amniotic membrane, stem cells, tendinitis

RESUMO POPULAR: As tendinites, conhecidas como doenças por movimentos repetitivos, são muito comuns e difíceis de tratar. Atualmente, o tratamento é baseado em medicações anti-inflamatórias e fisioterapia, mas são comuns as recorrências ou ausência de melhora total. Por isso, estão sendo estudados os mecanismos celulares e moleculares envolvidos nesta inflamação, para buscar uma alternativa de tratamento mais eficiente. Neste estudo, submetemos 40 ratos a lesão de tendão de Aquiles e os dividimos em quatro grupos de tratamento: os que receberam somente células-tronco, os que receberam membrana amniótica, os que receberam células-tronco + membrana amniótica e o grupo controle, ratos que não receberam tratamento algum. Depois de quatro semanas os ratos foram mortos, e seus tendões de Aquiles removidos para análises microscópicas, que demonstraram que os ratos que receberam a associação de células-tronco e membrana amniótica apresentaram menos inflamação que os demais.

Sumário

1	INTRODUÇÃO	15
2	JUSTIFICATIVA.....	17
3	REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1	Tendinite de Aquiles.....	18
3.2	Terapia celular - Células-Tronco (CT)	20
3.3	MEMBRANA AMNIÓTICA	21
3.4	citocinas e tendinopatia.....	23
3.4.1	Interleucina-6 (IL-6).....	24
3.4.2	INTERLEUCINA-4 (IL-4).....	25
3.4.3	INTERLEUCINA-13 (iL-13).....	25
3.4.4	Metaloproteinases (MMPs)	26
3.4.5	Interferon gama.....	27
3.5	REPARO TECIDUAL	27
4	OBJETIVOS.....	29
4.1	Objetivo Geral.....	29
4.2	Objetivos Específicos.....	29
5	HIPÓTESE	30
6	MATERIAL E MÉTODO	31
6.1	preparo e isolamento das células-tronco.....	31
6.2	Obtenção da membrana amniótica.....	31
6.2.1	Preparação da matriz amniótica humana descelularizada (MAHD)	32

	14
6.3 Amostra.....	33
6.4 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA.....	36
6.5 Avaliação estatística.....	38
7 RESULTADOS.....	39
7.1 Avaliação histológica por Hematoxilina-Eosina	39
7.1 Avaliação histológica de fibras colágenas por Sirius-Red.....	41
7.1 avaliação imunohistoquímica de il 4, 6, 13 e IFN-g.....	43
7.2 Avaliação de correlação entre variáveis	48
8 DISCUSSÃO.....	52
9 CONCLUSÃO	56
10 REFERÊNCIAS.....	57
11 ANEXOS.....	62
11.1 Termos de Consentimento Livres e esclarecidos das parturientes, autorizando doação de material placentário / cordão umbilical.	62
11.2 Liberação do Comitê de Ética em Pesquisa EM ANIMAIS da Pontifícia Universidade Católica do Paraná	64
11.3 ficha de avaliação individual de bem estar animal após procedimento cirúrgico 65	
11.4 ARTIGO ORIGINADO À PARTIR DO PRESENTE ESTUDO E SUBMISSION LETTER.....	72

1 INTRODUÇÃO

Distúrbios tendíneos são comuns na prática clínica e podem desencadear morbidade significativa devido à redução da mobilidade e da prática de atividades físicas ocasionadas pelos sintomas dolorosos¹.

Anatomicamente, os tendões são estruturas que conectam os músculos aos ossos, transmitindo forças para produzir o movimento articular, sendo assim particularmente susceptíveis a lesões por estresse. Por serem pouco vascularizados têm baixo potencial de cicatrização tanto em lesões agudas quanto em crônicas, e neste contexto as tendinopatias de Aquiles são especialmente prevalentes e sintomáticas¹⁻².

Tendões de Aquiles normais têm grande resistência tênsil por serem compostos de 90% de fibras de colágeno tipo I dispostas linearmente. Porém, quando há uma lesão, o processo cicatricial do tendão, que dura em média 10 semanas, repara o tecido através da formação de cicatriz fibrosa, sendo seu principal componente o colágeno tipo III. Este é caracterizado por maior fragilidade e fibras aleatoriamente dispostas, fazendo com que propriedades mecânicas e bioquímicas como elasticidade e resistência não sejam iguais às do tendão intacto, resultando em um processo patológico com repercussão clínica¹⁻².

O tratamento da tendinopatia de Aquiles pode ser conservador ou cirúrgico. As medidas conservadoras mais adotadas na prática clínica incluem fisioterapia, uso de anti-inflamatórios, repouso, órteses, aplicação local de corticóides ou derivados do hialuronato. Porém, existem evidências de que injeções de betametasona em tendões de Aquiles de ratos aumentam sua fragilidade e predisposição à ruptura. Tanto o tratamento conservador quanto o cirúrgico apresentam resultados insatisfatórios e altas taxas de complicações, incluindo recidiva³⁻⁶.

Devido a estes resultados insatisfatórios, são utilizados modelos animais para um melhor entendimento da fisiopatologia e tratamento das tendinopatias. Neste contexto, coelhos e ratos são os modelos preferidos, uma vez que já foi demonstrado que sua anatomia e fisiologia são semelhantes à humana. Nestas pesquisas a tendinopatia de Aquiles pode ser induzida através de contrações repetitivas do tríceps sural, citocinas inflamatórias, corticosteróides intratendíneos ou trauma penetrante ou contuso⁷.

Em tais modelos, aparece como uma nova opção de tratamento a aplicação de células-tronco (CTs) oriundas de tecido adiposo ou da medula óssea. Elas estão naturalmente presentes nos tendões intactos e já foi demonstrado que seu uso no tratamento de tendões patelares lesados, em associação a compostos de colágeno, resultou em maior resistência tênsil⁷⁻¹⁰.

Estudos pré-clínicos em coelhos também demonstraram recuperação histológica e biomecânica acelerada em tendões lacerados e suturados submetidos a injeções intratendíneas de células-tronco, inclusive com alterações morfológicas das células-tronco semelhantes às características nucleares e citoplasmáticas de tenócitos¹⁰.

As células-tronco são células adultas e indiferenciadas, que podem ser usadas de forma autóloga, apresentam capacidade de autorenovação, reprodução e diferenciação e são facilmente obtidas por punção óssea na crista ilíaca. Além disso, estas células têm oferta abundante, não causam reações imunológicas, não necessitam de isolamento celular, seleção ou cultivo, e já foi demonstrada recuperação histológica e biomecânica em tendões de Aquiles lesionados de ratos inclusive em trabalho de nossa autoria¹¹.

O âmnio ou membrana amniótica (MA) também tem sido estudado na regeneração de diversos tecidos. Caracteriza-se como uma membrana conjuntiva associada à placenta, sendo facilmente obtido após o parto, e possui propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas e baixa antigenicidade, quando decelularizada^{12,13}.

Fragmentos de membrana amniótica utilizados em tendões lesionados também demonstraram melhor organização de colágeno tipo I em relação ao grupo controle. A membrana amniótica possui diversos fatores de crescimento, que estimulam quimiotaxia, proliferação e diferenciação celular, além da síntese de colágeno, neovascularização e deposição de matriz extracelular¹⁴⁻¹⁶.

2 JUSTIFICATIVA

As tendinites são doenças crônicas e recorrentes com alto impacto econômico e social, devido à ineficácia dos tratamentos atuais em promover alívio efetivo e duradouro.

Com relação às novas terapias que vêm sendo estudadas na área de regeneração tecidual, células tronco mononucleares da medula óssea e membrana amniótica mostram-se efetivos na diferenciação e organização tecidual, portanto estes tratamentos, isoladamente, apresentam resultados favoráveis no tratamento de lesões tendíneas.

Desta maneira, o uso simultâneo de células-tronco e membrana amniótica no tratamento de lesão tendínea de membro posterior de ratos poderia apresentar resultados melhores aos do tratamento atual, aumentando a chance de sucesso do tratamento destas lesões.

3 REVISÃO DE LITERATURA

Os tendões são estruturas fundamentais do sistema esquelético, formados por tecido conjuntivo denso e proporcionando a ligação entre músculos e ossos, transmitindo a força gerada pela contração muscular e criando o movimento. Auxiliam também na manutenção do equilíbrio corporal e são constituídos principalmente por colágeno tipo I, sendo o colágeno III visível nas fases iniciais de cicatrização, onde sua função é dar força mecânica a matriz recém-formada¹⁷.

Justamente pela sua função de proporcionar movimento e resistir a movimentos antianatômicos, os tendões são susceptíveis facilmente a lesões¹⁸.

3.1 TENDINITE DE AQUILES

A tendinite de Aquiles é caracterizada por uma alteração estrutural da anatomia tendínea, em que suas fibras de colágeno tipo I são substituídas por tecido fibroso em resposta à sobrecarga crônica da estrutura. Estão também associados à sua etiopatogenia, além da sobrecarga, hipovascularização, falta de flexibilidade, genética, gênero, alterações endócrino-metabólicas, uso de antibióticos quinolonas, sobrepeso, deformidades como pés cavos, instabilidade lateral do tornozelo ou anterior do retopé^{1,18}.

Esta doença afeta 2% da população adulta em geral, variando de 9-40% dependendo do tipo e grau de atividade considerando os indivíduos fisicamente ativos¹.

Estima-se que esta incidência esteja aumentando devido a maior participação em atividades recreacionais e competitivas, embora 31% dos pacientes com dores no calcanhar não relatem participação em atividade física rigorosa¹.

As lesões ocorrem mais frequentemente entre a terceira e quinta décadas da vida, com predominância no sexo masculino¹.

O diagnóstico é dado facilmente pelo quadro clínico, de dor na face posterior do calcânhar aos esforços, normalmente a 2-6 centímetros da inserção do Tendão de Aquiles no calcâneo. Deve ser observado o alinhamento global dos membros inferiores e avaliar presença de espessamentos ou sinais flogísticos. Estes achados são confirmados facilmente por exames de radiografias (alinhamento), ultrassonografia e ressonância nuclear magnética¹.

O tratamento habitual baseia-se em medidas conservadoras e cirúrgicas que alterem a neovascularização local, retirando o tecido fibrosado e estimulando a neoformação tecidual, porém não há consenso terapêutico ou modalidade considerada *gold standard*³.

O tratamento conservador consiste em repouso, utilização de drogas e órteses, fisioterapia, terapia por ondas de choque, eletrocoagulação, uso de plasma rico em plaquetas e ultrassom terapêutico³.

A terapêutica de resultados mais consistentes na literatura é o treinamento excêntrico desenvolvido por Alfredson. A contínua carga excêntrica ao Aquiles, através de exercícios de dorsiflexão do tornozelo com joelho fletido e estendido, alternadamente, em séries de 15 repetições duas vezes ao dia, ao longo de 12 semanas, alonga a unidade tendínea e aumenta a capacidade de suportar sobrecarga¹⁹.

O tratamento cirúrgico costuma ser indicado após seis meses de tratamento conservador sem melhora. Existem inúmeras técnicas, como tenotomia percutânea, desbridamento endoscópico, múltiplas incisões longitudinais ao longo do tendão (tenotomia aberta) com ou sem transferência do ventre muscular do corpo do gastrocnêmio, retirada da porção acometida e reconstrução com retalhos do próprio Aquiles⁶, transferências de outros tendões ou uso de enxertos autólogos²⁰.

O uso do plasma rico em plaquetas é uma modalidade difundida de tratamento em tendinopatias crônicas, porém, tem resultados conflitantes na literatura²⁰.

O uso de células-tronco tem validação em estudos pré-clínicos e clínicos veterinários mas existem poucos estudos clínicos de qualidade em humanos^{21,22}.

3.2 TERAPIA CELULAR - CÉLULAS-TRONCO

As células-tronco são células não especializadas que possuem capacidade de proliferação indefinida, auto renovação e diferenciação em tecidos especializados, propriedades que vêm sendo estudadas na cicatrização e regeneração tecidual²³.

A terapia celular busca aproveitar-se destas propriedades para produzir matriz extracelular específica e assim promover a regeneração tecidual em substituição à formação de cicatriz fibrótica^{24,25}.

Células-tronco embrionárias são encontradas em estágios iniciais pós-fertilização, por volta do 4º ao 5º dia, derivadas da camada interna do blastocisto, e apesar de terem mostrado capacidade de diferenciação em vários tipos celulares, ainda permanecem grandes limitações, principalmente éticas, para seu uso²⁷.

Células-tronco mesenquimais constituem uma linhagem de células-tronco adultas, somáticas, que podem ser encontradas na medula óssea e no sangue periférico, entre outros tecidos, e que apresentam grande plasticidade e podem se diferenciar em vários tipos celulares, como células musculares, hepáticas, ósseas, adiposas e cartilagíneas. São responsáveis pela manutenção e reparo tecidual e facilmente expandidas in vitro e diferenciadas quando cultivadas em meios de cultura apropriados²⁶.

As células da medula óssea, por exemplo, são facilmente extraídas e isoladas, mas ainda há necessidade de estudos adicionais para melhorar a compreensão dos fatores de

crescimento e suas interações com as CT, entre eles, o fenômeno de migração das células ao ambiente de cicatrização^{28,29}.

Assim, dentre os diversos meios de terapia celular, o tratamento regenerativo a partir do transplante de células tronco de medula óssea é uma promissora alternativa aos métodos regenerativos convencionais na tendinopatias^{30,31}.

Em relação às tendinopatias, já foi demonstrado o potencial que células tronco de medula óssea tem em diferenciar-se em tenócitos e também de induzir a formação de colágeno tipo I linearmente disposto, aumentando também a resistência ao módulo de estresse, tensão e deformação, melhorando as características biomecânicas^{32,33}.

3.3 MEMBRANA AMNIÓTICA

O âmnio, parte componente da placenta, é facilmente obtido após parto cesáreo, onde é descartado, e possui propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas e baixa antigenicidade³⁴⁻³⁵.

Davis, em 1910, usou pela primeira vez a membrana fetal como substituto de pele para tratamento de feridas abertas, porém, sem os meios práticos de separação, esterilização e armazenamento, o uso da membrana foi muito limitado³⁶.

Em 1965, foi demonstrado pela primeira vez que a membrana amniótica poderia ser separada, esterilizada e utilizada posteriormente de forma segura, iniciando uma série de pesquisas para avaliar o potencial regenerativo da membrana³⁶.

Atualmente, várias patologias estão sendo tratadas com a membrana amniótica, e no site do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos, em 2015, existiam 95 ensaios clínicos relevantes relacionados com células derivadas da placenta ou membrana amniótica nas áreas de oftalmologia, dermatologia, odontologia, ortopedia, cirurgia,

lesões de coluna vertebral e outras, como no acidente vascular cerebral, encefalopatia hipóxica, hipertensão pulmonar, fibrose pulmonar idiopática, doença de Crohn, artrite reumatoide e disfunção erétil³⁷⁻³⁹.

Quanto à sua composição, a membrana amniótica possui 2 camadas: o córion, que é vascularizado e está em contato com a parede uterina; e a membrana amniótica (MA) que não é vascularizada e está em contato com o líquido amniótico, envolve o feto e é altamente flexível³⁶.

Na espécie humana, a MA surge sete a oito dias após a concepção. Apresenta dois tipos de células com diferentes origens embriológicas: as células epiteliais amnióticas, derivadas da ectoderme embrionária, e as células mesenquimais amnióticas, derivadas da mesoderme embrionária. Do ponto de vista ultraestrutural, ela é fina (espessura de 0,02 – 0,05 mm), resistente, transparente, não vascularizada e composta por 3 camadas principais: o epitélio, a membrana basal e o estroma^{36,38}.

Sua membrana basal é muito similar à membrana basal encontrada em outras partes do corpo, sendo composta por colágeno do tipo IV, V e VII, laminina 1 e 5 e fibronectina^{39,40}.

A MA tem ação anti-inflamatória devido à diminuição de secreção de citocinas pró-inflamatórias como o Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) e Interferon (IFN) e aumento da produção de citocinas anti-inflamatórias, como interleucina 10 e interleucina 4, e regulação da apoptose^{35,39}.

As células epiteliais e mesenquimais da MA tem uma expressão limitada de antígenos do complexo principal de histocompatibilidade humano, caracterizando sua baixa antigenicidade e atividade imunomoduladora e antiviral⁴⁰⁻⁴³.

A MA também contém um grande número de fatores de crescimento pró-angiogênicos e sua composição colágena fornece rigidez e elasticidade mantendo o arcabouço local⁴⁴⁻⁴⁶.

Quando submetida ao processo de descelularização, a MA mantém seus maiores componentes estruturais, que são o colágeno e a elastina, ficando livre de resíduos de DNA no tecido. A presença de colágeno IV, fibronectina e laminina observadas na membrana basal após a descelularização confirmam que a membrana basal permanece intacta após o processo. Esta característica é importante, pois a matriz extracelular contém componentes essenciais para a fixação, proliferação celular e para o remodelamento do tecido⁴⁷.

A descelularização não tem efeito sobre a resistência, nem sobre a extensibilidade do tecido e contribui para eliminar a rejeição imunológica. A MA descelularizada é biocompatível e não tem efeitos adversos na proliferação ou morfologia celular sendo, portanto, uma matriz de grande potencial como sistema de entrega de células. Também é biodegradável, bioabsorvível e pode ser bem incorporada ao tecido biológico, aumentando, por exemplo, a espessura do pericárdio^{48,49}.

A MA descelularizada foi utilizada em vários estudos como veículo para diferentes tipos de células como, por exemplo, as células estaminais da córnea, liberando-as diretamente no sítio do defeito corneano⁵⁰.

3.4 CITOCINAS E TENDINOPATIA

As citocinas são moléculas sinalizadoras produzidas por diferentes tipos celulares e que controlam funções básicas como proliferação celular, diferenciação, apoptose, imunomodulação e comunicação celular⁵¹.

Discutiremos abaixo as interleucinas relacionadas ao nosso estudo atual.

3.4.1 INTERLEUCINA-6 (IL-6)

É uma citocina pró-inflamatória de fase aguda, porém pode permanecer tardiamente nos processos inflamatórios, até a fase crônica, assumindo função imunomoduladora e relacionada a cicatrização tendínea⁵².

Dentre as citocinas estudadas na variação com atividade física, é a IL-6 que demonstra as maiores variações. Sua produção aumenta em tendões submetidos a alongamentos cíclicos e outros exercícios agudos e está associada a síntese de colágeno quando infiltrada em humanos de maneira peritendínea^{53,54}.

É comprovado em modelos caninos e murinos que a expressão gênica da citocina IL-6 está aumentada em animais submetidos à lesão tendínea, da mesma maneira que a infiltração peritendínea de IL-6 estimula síntese colágena em humanos⁵⁵.

Em modelos in vitro, a aplicação da IL-6 em células tronco tendíneas derivadas de tendões de Aquiles de ratos, resultou em sua proliferação e diferenciação fenotípica em tenócito maduro, com diminuição de produção de colágeno tipos I e III, tenomodulina e escleromodulina após 5 dias⁵⁶.

Também é sabido que o mecanismo de cicatrização tendínea está comprometido em ratos knock-out para IL-6, além de estar comprovado que ela é capaz de degradar metaloproteinases de matriz extracelular⁵⁷.

Porém, ela depende de uma delicada homeostase, e em doenças inflamatórias crônicas auto-imunes como a Artrite Reumatóide e a Esclerose Sistêmica, ocorrem níveis persistentemente altos de IL-6 nos tecidos tendíneos, gerando uma desorganização celular, colágena e da matriz extracelular, o que pode estar associado a incidência mais elevada de tendinopatias nessas doenças⁵⁸.

3.4.2 INTERLEUCINA-4 (IL-4)

É uma citocina Th2 presente em processos inflamatórios alérgicos e parasitárias, mas também envolvida na produção de colágeno pelos fibroblastos. Faz feedback negativo com a IL-6 e interferon-gama, antagonizando sua ação pró-inflamatória inicial, aparecendo em processos inflamatórios mais tardios, gerando controle do processo inflamatório inicial para reparo tecidual efetivo⁵⁹.

3.4.3 INTERLEUCINA-13 (IL-13)

Citocina Th2, intimamente relacionada à IL-4, também está presente em processos inflamatórios alérgicos e parasitárias, além de incentivar produção de colágeno pelos fibroblastos e promover remodelamento tecidual⁵⁹.

A quebra do colágeno pela IL-13 é essencial no processo de remodelamento tecidual, através da quebra de colágeno tipo III (desorganizado, inicial) e deposição de colágeno tipo I (maduro, linear). A IL-4 não atua diretamente neste processo, mas é essencial para a sinalização ativadora da IL-13, que por sua vez, ativa as metaloproteinases de matriz (MMPs – matrix metalloproteases) – MMP-2, -9, -12, -13 e -14, capazes de degradar todos os constituintes da matriz extracelular (MEC)⁶⁰.

Esse controle regional é essencial no processo adequado de cicatrização. Por exemplo, no coração infartado, mantém integridade estrutural no tecido acometido, impedindo fibrose em área cardíaca normal, perilesional, que possa prejudicar a contratilidade cardíaca⁶⁰.

As MMPs induzidas pela IL-13 também atuam na sinalização celular pois apresentam capacidade de degradar moléculas bioativas. A MMP-12 modifica a ação de moléculas pró-inflamatórias e suprime inflamação⁶⁰.

Portanto, a IL-13, através das MMPs, suprime vias inflamatórias e promove quebra do colágeno em estágios iniciais de reparação, e na continuidade do processo, a IL-13 é a principal responsável pela deposição de colágeno, sendo então este processo dependente de tempo, celularidade e localização⁶⁰.

Um dos principais meios pelos quais a IL-13 promove a síntese colágena é através da ativação e amplificação da sinalização do TGF-B (fator de crescimento tumoral beta), que estimula fibroblastos. A MMP-9, mediada pela IL-13, cliva TGF-b latente em ativo e estimula sua expressão⁶⁰.

Mas os fibroblastos também respondem à ação direta da IL-13 e IL-4, independentemente da ação do TGF-B⁶⁰.

3.4.4 METALOPROTEINASES (MMPS)

Estão envolvidas no dano tendíneo, particularmente as MMP1, -2, -3, -8, -9, -13, -14,19,38. Tem papel central na degradação da matriz e regulação dolorosa. As MMP-1, -8 and -13 estão envolvidas na degradação do colágeno tipo 1 e 3 e a MMP-18 na degradação do colágeno tipo 4⁶¹.

Existem 23 metaloproteinases humanas identificadas, direcionadas a diversos substratos e são divididas em quatro grupos principais: collagenases (degradam colágenos tipo 1, 2 e 3); gelatinases (degradam colágenos desnaturados e colágeno tipo 4), estromelisinases (degradam proteoglicanos, fibronectina, caseína, colágenos tipo III, 4 e 5) e MMps de membrana⁶²⁻⁶³.

A MMP3 é necessária para o adequado remodelamento tendíneo e prevenção de mudanças patológicas e o início de sua produção é crítico neste processo, estando inibida em processos patológicos⁶⁴.

Já a MMP-2 está elevada nas tendinites, eleva-se consideravelmente após atividade física e desencadeia uma resposta inflamatória potente e juntamente com a MMP-9 têm atividade collagenolítica⁶⁴⁻⁶⁷.

As collagenases 9 e 13 aparentemente só participam da degradação da MEC, enquanto as MMP-2, MMP-3, and MMP-14 participam tanto na degradação quanto no remodelamento e a MMP-9 está significativamente aumentada em tendões de manguito rotador rompidos em humanos⁶⁷.

3.4.5 INTERFERON GAMA

Está elevado em amostras de tendão de Aquiles de humanos com tendinite crônica e/ ou ruptura. Caracteriza uma resposta imune tipo Th1, com neutrófilos e macrófagos M1, em associação com as outras citocinas clássicas associadas ao sinais inflamatórios cardinais (calor, rubor, aumento de volume e dor) e dano tecidual. Em consequência, gera um feedback de ativação de resposta TH2 na tentativa de reequilibrar a homeostase tecidual⁶⁸.

Normalmente está relacionado a resposta à patógenos, mas está significativamente aumentado nos estágios iniciais de tendinite, mas está mais relacionado ao recrutamento de células inflamatórias e imunes do que a atuação direta em tenócitos⁶⁸.

3.5 REPARO TECIDUAL

É o meio pelo qual os organismos reparam seus tecidos lesados após processos inflamatórios, infecciosos, tumorais ou lesões mecânicas⁶⁹.

É um mecanismo fundamentalmente processado pela citocinas de fase tardia ou TH2, mas que normalmente não leva à recuperação plena do tecido devido a formação de cicatriz conjuntiva colágena e não integralmente do tecido sadio. Essa nova matriz é subótima, e dependendo da extensão em que estiver presente, levará às condições debilitantes crônicas devido à fibrose local e consequente falha funcional do órgão ou tecido⁷⁰.

4 OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo é avaliar sinergia na resposta da utilização de células-tronco associadas a MA no tratamento da tendinopatia de Aquiles induzida em ratos em relação ao grupo controle (solução salina).

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito histológico do uso das células tronco mononucleares (CT) e da membrana amniótica (MA) isolados ou em conjunto na cicatrização de lesões tendíneas em membros posteriores de ratos.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a concentração, disposição e tipo de colágeno nas lesões, por método microscópico (histomorfométrico – coloração de *sirius red*);
- Comparar a composição histológica entre os grupos através de *score* histológico;
- Avaliar imuhistoquimicamente a presença de interleucinas 4, 6, 13, e interferon gama relacionadas ao processo de degradação e reparo tecidual nas tendinopatias.

5 HIPÓTESE

A ação conjunta das células-tronco da medula óssea e da MA podem melhorar o perfil inflamatório perilesional ao tendão afetado, direcionando para o processo de reparo e cicatrização e organização de colágeno através da modulação de citocinas de fase tardia esperando-se:

- Inicialmente maior concentração de colágeno tipo I e tardiamente de colágeno tipo III nos grupos submetidos ao tratamento com células-tronco e MA em relação ao controle;
- Maiores *scores* histológicos (maior proximidade da normalidade) nos grupos submetidos ao tratamento com células-tronco e MA em relação ao controle;
- Maior concentração de IL-4 e IL-13 nos grupos submetidos ao tratamento com células-tronco e MA em relação ao controle;
- Menor concentração de IL-6 e IFN-g nos grupos submetidos ao tratamento com células-tronco e MA em relação ao controle.

6 MATERIAL E MÉTODO

Esse é um estudo experimental, realizado seguindo as normas e princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

6.1 PREPARO E ISOLAMENTO DAS CÉLULAS-TRONCO

Para o preparo e isolamento das células-tronco foi utilizada a técnica descrita por Boyum. Foram coletado 3 ml de sangue das cristas ilíacas, de forma autóloga, dos ratos randomizados a receber este tipo de tratamento. Este sangue foi coletado em tubo de ensaio estéril de 15 ml e em câmara de fluxo contínuo de ar foi homogeneizado com meio de cultura Iscove's Modified Dulbecco's Media (IMDM), solução tampão 4% e antibiótico 1% (penicilina e estreptomicina)⁷¹.

À seguir, este homogeneizado foi acrescido de 3mL de solução de separação por gradiente densidade (d: 1,077) (Ficoll-Hypaque) e levado à centrífuga a 1400 rotações por minuto (RPM) durante 40 minutos à 22°C e o material obtido foi à câmara de fluxo novamente para retirada do anel formado entre o meio de cultura e o gradiente de densidade, onde encontram-se as células-tronco mononucleares.

Este material foi colocado em outro tubo de ensaio de 15mL, completado novamente com meio IMDM e centrifugado por 1500 rotações por minuto (rpm) por 10 minutos a 22°C. Após retirada da centrifuga foi realizado um descarte do sobrenadante, e o precipitado no fundo constitui células-tronco mononucleares.

6.2 OBTENÇÃO DA MEMBRANA AMNIÓTICA

Esse projeto obteve duas placentas de pacientes da Maternidade Victor Ferreira do Amaral, mediante termo de autorização aprovado pelo Comitê de Ética do próprio hospital e da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, por meio de projeto intitulado “REPARAÇÃO TRAQUEAL DE COELHOS COM MATRIZ ACELULAR CULTIVADAS COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS ASSOCIADO A NANOPARTÍCULAS DE 15-DEOXY-12, 14 PROSTAGLANDINAJ2” (Registro número 01238) e termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) assinado pelas parturientes (n=2, com 36 a 40 semanas de idade gestacional).

O termo de autorização do hospital, os TCLEs e o parecer de aprovação do comitê de ética do projeto supracitado estão anexados ao final desse arquivo (ANEXO 1).

6.2.1 PREPARAÇÃO DA MATRIZ AMNIÓTICA HUMANA DESCELULARIZADA (MAHD)

A membrana amniótica (MA) fresca foi obtida após partos cesareanos. Doadoras maternas apresentaram sorologias negativas para HIV, hepatite B, hepatite C e sífilis e o preparo das membranas foi feito como proposto por Riau et al⁴⁸.

Após o parto e dequitação placentária completa, os coágulos de sangue foram imediatamente removidos da placenta com solução salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7.2 (Gibco®), contendo 100 u/ml de penicilina e 100 mg/ml de estreptomicina e após essa limpeza, descolou-se manualmente a membrana amniótica, separando-a do córion.

Para o processo de descelularização (remoção de células epiteliais amnióticas), as membranas foram retiradas do meio PBS com técnica asséptica em uma cabine de segurança biológica classe II BioSAFE (Veco®) e tratadas com solução de duodecil sulfato de sódio (SDS) a 0,01% e desoxicolato de sódio (SD) a 0,01% por 24 horas a

37°C, com auxílio de agitador mecânico (mesa agitadora 109 M, Nova Ética Ltda.). Depois, foram conservadas em PBS a 4° Celsius (freezer), de acordo com a metodologia descrita por Hopper⁷².

6.3 AMOSTRA

Em conformidade com aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (CEUA-Pr) e do Instituto de Tecnologia do Paraná (TecPar), anexos, foram utilizados ratos Wistar machos, pesando em média 350 g, em número de 40 exemplares.

Os animais foram acomodados no biotério da TECPar, em número de 4 animais por gaiola, com água e ração *ad libitum* e com jornadas de 12 horas de claro / 12 horas de escuro, com controle local de temperatura e umidade.



Figura 1 Ratos acomodados no biotério

Para o procedimento cirúrgico, os animais foram randomizados em quatro grupos de acordo com o tratamento a ser recebido, no mesmo procedimento:

- Grupo CT (células-tronco mononucleares de medula óssea), n=10 animais;
- Grupo MA (membrana amniótica), n = 10 animais;
- Grupo CT + MA (células tronco + membrana amniótica), n=10 animais;
- Grupo C (controle, solução salina a 0,9%, n=10 animais.

Os ratos foram anestesiados via intraperitoneal (IP) com cloridrato de Ketamina a 5% (Vetanarcolâ, Konig do Brasil Ltda.) na dose de 80mg/Kg associado ao cloridrato de Xilazina a 2% (Rompunâ, Bayer S.A, Brasil) na dose de 10mg/Kg e após a obtenção do plano anestésico, constatado através do reflexo pupilar e do relaxamento muscular, foi realizada tricotomia e procedimento cirúrgico.

Para os ratos do grupo CT e CT + MA o procedimento iniciou com a coleta de 3 ml de sangue de suas cristas ilíacas para preparo e isolamento das células-tronco conforme descrito previamente.

Todos os ratos foram submetidos a incisões cutâneas sobre os tendões de Aquiles e sua secção em seu terço médio, rafiada com fio prolene 4,0.

Para os animais do grupo MA e MA + CT, após sutura da lesão de aquiles com prolene 5.0, foi adaptada membrana amniótica descelularizada humana (obtida conforme técnica já descrita) e suturada por seus bordos ao tendão através de quatro pontos em suas extremidades também com fio prolene 5.0.

Todos os animais foram submetidos a sutura de pele com fio prolene 5.0, e após esse processo os animais dos grupos CT e CT + MA foram infiltrados percutaneamente peritendão de aquiles com as células-tronco e os animais do grupo C foram infiltrados percutaneamente com 2 ml de solução salina a 0,9%.



Figura 2 Animal anestesiado e preparado para o procedimento

Os animais foram submetidos a analgesia por 72 horas após o procedimento, via aplicação subcutânea abdominal de carprofeno na dose de 5mg/kg/dia e no pós-operatório foram monitorados através de sinais clínicos e comportamentais que fossem indicativos de complicações pós cirúrgicas através da ficha de avaliação de cada animal (Anexo 4).



Figura 3 Analgesia percutânea dos animais no biotério.

Após quatro semanas da indução da lesão os animais foram submetidos à eutanásia, conforme protocolo de anestesia já descrito, sendo ressecados os tendões e preparados para a histologia.

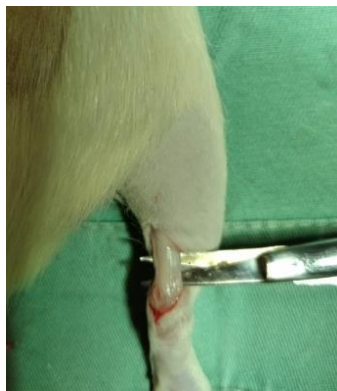


Figura 4 Imagem per-operatória do tendão



Figura 5 Imagem do tendão após sua ressecção

6.4 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

Os tendões foram preservados em frascos contendo formol 10% e após submetidos a banhos sucessivos em álcool 70%, 80%, 90% e três banhos em álcool 100%, durante uma hora e logo após foi impregnada parafina líquida através de dois banhos a 65°C no mesmo aparelho no (Leica modelo TP1020). Após o emblocamento em parafina e resfriamento, os tendões foram preparados no micrótomo (Leica modelo RM2145) em cortes com espessura de 4µm. Os cortes histológicos foram montados em lâminas e corados com solução de hematoxilina-eosina (HE) e Sirius Red (SR).

Estes cortes histológicos foram montados em lâminas e corados com solução de hematoxilina-eosina (HE), para caracterização nuclear e de matriz extracelular. Esta avaliação foi feita sempre pelo mesmo avaliador, médico patologista, cego aos grupos do trabalho e intervenções, segundo o score abaixo, de seis parâmetros, variando de 1 (mudanças significativas) a 4 (normal), onde foram avaliadas linearidade da estrutura das fibras colágenas, forma dos tenócitos, densidade de tenócitos, inflamação, hemorragia, espessura do epitendão⁷³.

Variáveis						
	Linearidade da estrutura da fibra	Forma dos tenócitos	Densidade de tenócitos	Infiltrado inflamatório	Hemorragia	Espessura do epitendão
1	Sem áreas lineares	Predominantemente arredondados	Camadas de células	Grande aumento	Predominante	Fibrose maciça
2	20-50% de fibras lineares	Moderadamente arredondados	Aumento moderado	Aumento moderado	Múltiplas áreas por campo	7-15 células
3	➤ 50 % de fibras lineares	Ligeiramente ovais	Aumento leve	Aumento leve	Esparsa	3-6 células
4	Linear (normal)	Lineares (normal)	Esparsos	Nenhum	Nenhuma	1-2 células

Tabela 1 Critérios para avaliação histológica dos tendões. Fonte: URDZIKOVA LM, SEDLACEK R, SUCHY T, AMEMORI T, RUZICKA J, LESNY P, HAVLAS V, SYKOVA E, JENDELOVA P. Human multipotent mesenchymal stem cells improve healing after collagenase tendon injury in the rat. BioMedical Engineering OnLine. 2014

Através do programa *ZEN 2.3*®, foram obtidas fotos digitalizadas de todas as lâminas em H-E através de scanner Axio Scan.Z1 (Zeiss) para as fotos ilustrativas do trabalho.

Da mesma maneira foram preparadas as lâminas para coloração por *Sirius Red*, específico para fibras colágenas tipo I (verde) e tipo III (vermelho).

De cada campo de grande aumento (CGA=40X), houve a mensuração das áreas de fibras colágenas do tipo I e III pelo software Image Pro-Plus versão 4.5 (Media Cybernetics, Rockville, MD), através do emprego de um método de segmentação semiautomatizada por cores, na qual a área de cada colágeno, baseada pela coloração da fibra, foi artificialmente delimitada e quantificada. Por fim, foram calculados os valores de média aritmética dos dez campos de cada paciente, de maneira que seus resultados foram organizados em planilhas de Excel e posteriormente submetidos à análise estatística.

A análise imunohistoquímica foi feita com anticorpos previamente validados contra IL-4,6,13 e IFN- γ , sendo a reação imunológica também realizada por método de segmentação semiautomatizada por cores, na qual as áreas coradas pelo marcador foram

artificialmente delimitadas e quantificadas. Por fim, foram calculados os valores de média aritmética das fotos das lâminas de cada rato, de maneira que seus resultados foram organizados em planilhas de Excel e posteriormente submetidos à análise estatística.

6.5 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA

Os dados foram organizados em planilha Excel® e analisados com o programa computacional IBM SPSS Statistics v.29.0. Os resultados foram descritos por média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo. Para a comparação dos grupos em relação às variáveis quantitativas, foi usado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e o teste *post-hoc* de Dunn. A correlação entre duas variáveis quantitativas foi analisada estimando-se coeficientes de correlação de Spearman e avaliando a sua significância. A condição de normalidade das variáveis contínuas foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística. Para as comparações múltiplas os valores de p foram corrigidos por Bonferroni

Para cada das variáveis estudadas (escore histológico, percentual de colágenos tipo I e III e imunohistoquímica para interleucinas 4, 6, 13 e IFNg), testou-se a hipótese nula de que os resultados são iguais nos 4 grupos, *versus* a hipótese alternativa de que os resultados não são iguais nos grupos. No caso de rejeição da hipótese nula os grupos foram comparados dois a dois.

7 RESULTADOS

Dos 40 animais, três foram a óbito após o procedimento da tenotomia e tenorrafia, sendo dois no grupo de MA + CT, e um no grupo controle, estando disponíveis para análise final dados de 37 ratos, assim discriminados: grupo CT n =10, grupo MA n=10, grupo MA + CT n = 8 e grupo controle n=9.

Para cada uma das variáveis (escore histológico, percentual de colágeno tipo I, percentual de colágeno tipo III, avaliação imunohistoquímica de interleucina 4,6,13 e de interferon gama), testou-se a hipótese nula de que os resultados são iguais nos 4 grupos, versus a hipótese alternativa de que os resultados não são iguais nos grupos. No caso de rejeição da hipótese nula os grupos foram comparados dois a dois, conforme descrito nos resultados à seguir.

Estes resultados também são apresentados no anexo 5, artigo que originou-se dos dados levantados neste estudo e submetido à revista *Cellular and Molecular Life Sciences (printed ed.)*, Springer Nature.

7.1 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA POR HEMATOXILINA-EOSINA

Conforme descrito previamente, a avaliação histológica simples por coloração de hematoxilina-eosina levou em conta linearidade da estrutura das fibras colágenas, forma dos tenócitos, densidade de tenócitos, inflamação, hemorragia e espessura do epitendão⁹¹ através da pontuação de cada um destes⁷³.

Abaixo, as imagens das lâminas do projeto exemplificam as variáveis avaliadas e suas alterações.

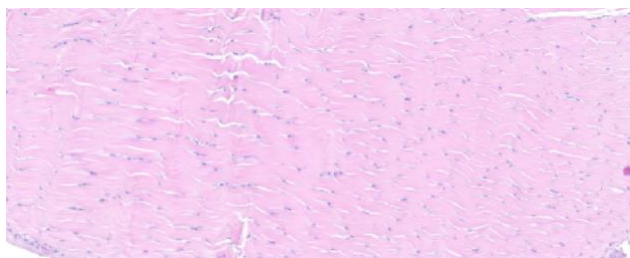


Figura 6 Imagem de lâmina demonstrando fibras colágenas lineares



Figura 7 Quadro demonstrando variação nuclear dos tenócitos, desde lineares até arredondados

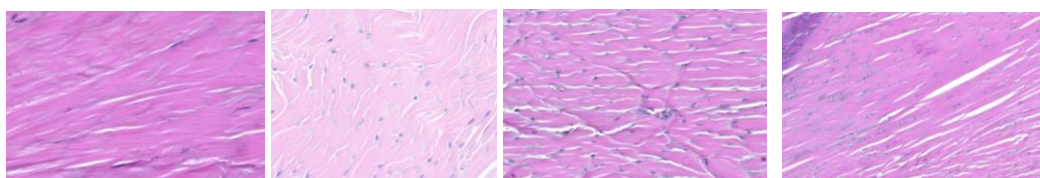


Figura 8 Quadro demonstrando a variação da densidade de tenócitos

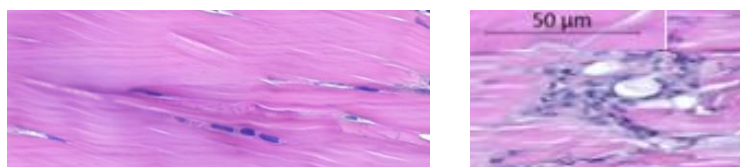


Figura 9 Fotos demonstrando ausência de infiltrado inflamatório e aumento significativo dele



Figura 10 Fotos demonstrando a ausência de neovascularização e neovascularização predominante

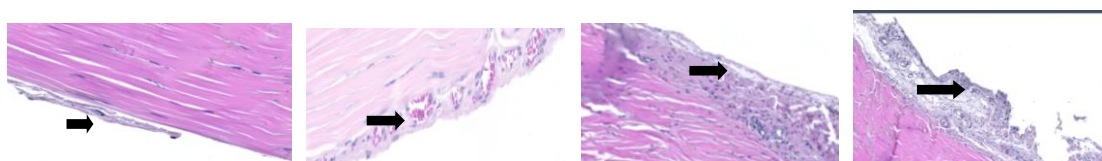


Figura 11 Quadro com Lâminas demonstrando o epitenão (seta), corado em eosina, em uma camada de células (normal) até fibrose maciça

As tabelas geradas com os dados da aplicação aplicação de notas a cada um dos fatores, por patologista cego aos grupos de estudo, estão demonstradas no Anexo 5 e geraram o resultado descrito pela tabela e gráficos de *box-plot* abaixo:

Grupo	N	Média	Desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	p*
CT	10	13,6	1,8	13,5	10,0	17,0	0,222
CT + MA	8	12,6	1,8	13,5	9,0	14,0	
MA	10	13,6	0,7	14,0	12,0	14,0	
C	9	14,2	1,3	14,0	12,0	17,0	

Tabela 2 Teste de Kruskal-Wallis para análise estatística do score histológico nos grupos

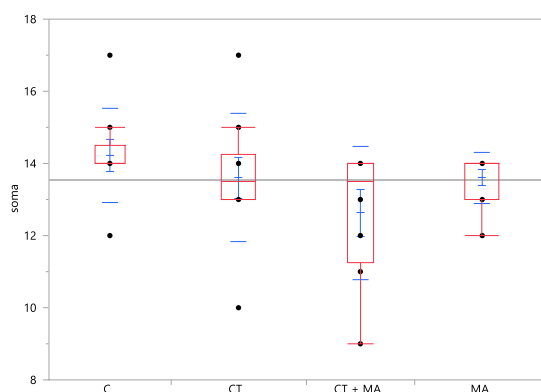


Gráfico 7-1 Box-plot representando o somatório histológico entre os grupos

7.1 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DE FIBRAS COLÁGENAS POR SIRIUS-RED

Para a avaliação histológica de fibras colágenas tipo I e III, foi realizada coloração por Sirius Red, conforme demonstram figuras abaixo.

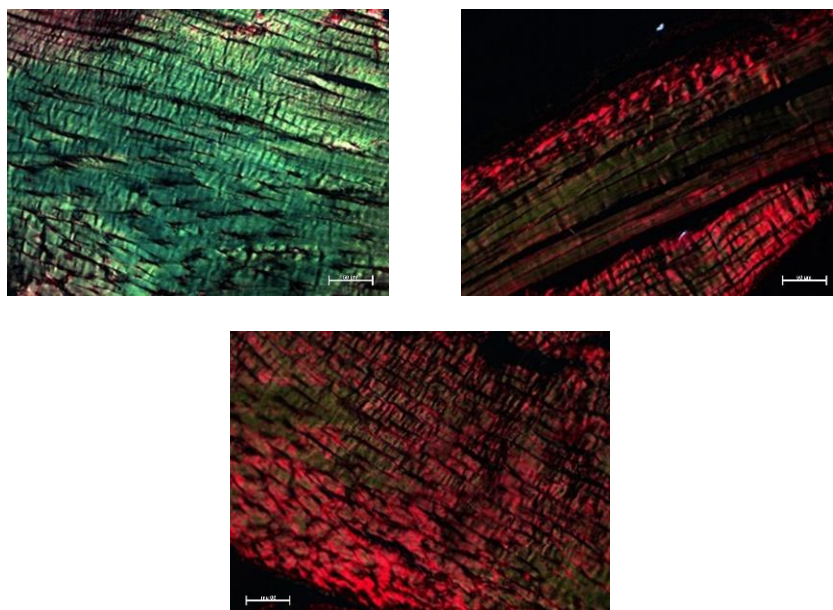


Figura 12 Lâminas coradas por Sirius Red, demonstrando fibras colágenas tipo I (verde) e III (vermelho)

Os dados da análise estatística para os colágenos tipo I e III estão demonstrados no anexo 6 e geraram a tabela e gráficos abaixo.

Variável	Grupo	n	Média	Desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	p*
Col. I (%)	CT	10	84,3	18,2	90,2	37,2	97,8	0,147
	CT + MA	8	82,0	8,4	83,1	66,3	95,3	
	MA	10	80,3	12,0	83,2	55,6	93,7	
	C	9	88,4	12,1	93,6	68,0	98,0	
Col. III (%)	CT	10	15,7	18,2	9,8	2,2	62,8	0,147
	CT + MA	8	18,0	8,4	16,9	4,7	33,7	
	MA	10	19,7	12,0	16,8	6,3	44,4	
	C	9	11,6	12,1	6,4	2,0	32,0	

Tabela 3 Teste de Kruskal-Wallis para análise estatística percentual de colágeno tipo I e III nos grupos.

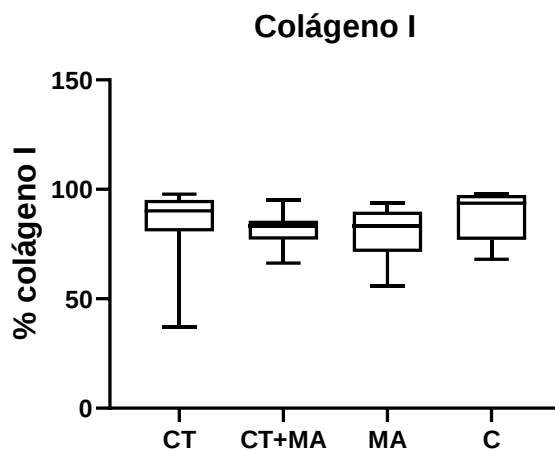


Figura 13 Distribuição de col. Tipo I entre os grupos

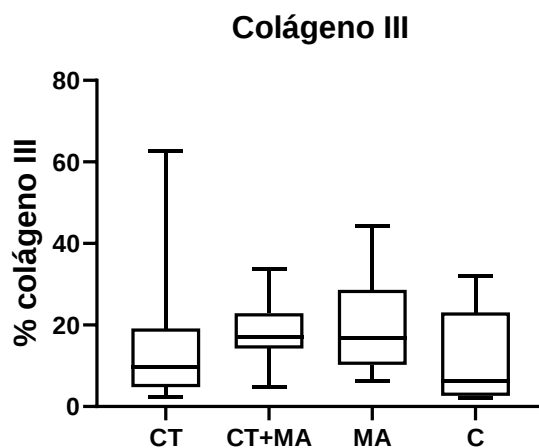


Figura 14 Distribuição de Col. Tipo III entre os grupos

Observação: os resultados de colágeno I e III são simétricos e têm o mesmo valor de p no teste da comparação dos grupos, pois são duas variáveis complementares (somam 100%).

7.1 AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUIMICA DE IL 4, 6, 13 E IFN-G

Para a avaliação imunohistoquímica da presença de IL-4,6,13 e IFN γ entre os grupos, as lâminas foram coradas com os anticorpos anti IL-4 (policlonal/coelho, PAS25165, AB 2542665, Thermo Fisher Scientific 1:200), anti-IL-13 policlonal/coelho, PI30E, AB 223471, Thermo Fisher Scientific 1:600), anti IL-6 e anti-IFN γ .

Abaixo, fotos ilustrativas da leitura das lâminas e a força da reação tecidual causada pelos anticorpos.

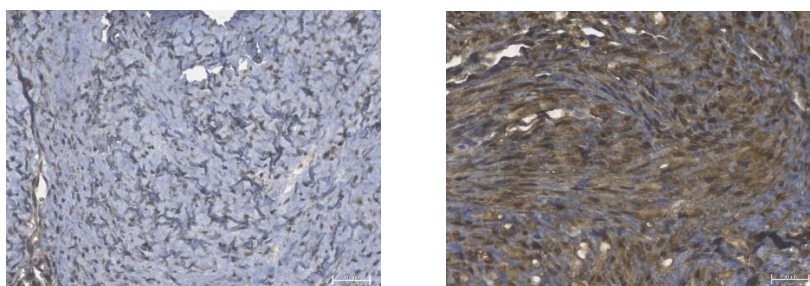


Figura 15 Lâmina com fraca reação para IL-4 e com forte reação

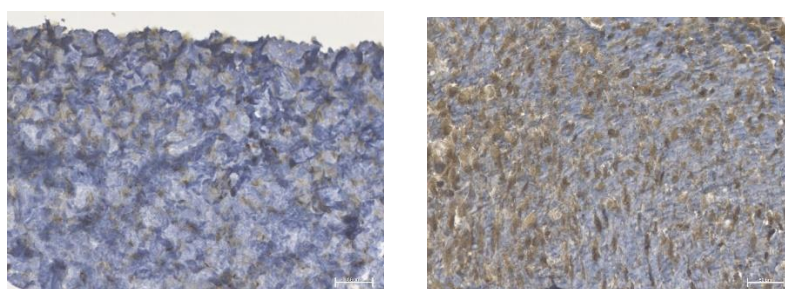


Figura 16 Lâmina com fraca reação para IL-6 e com forte reação

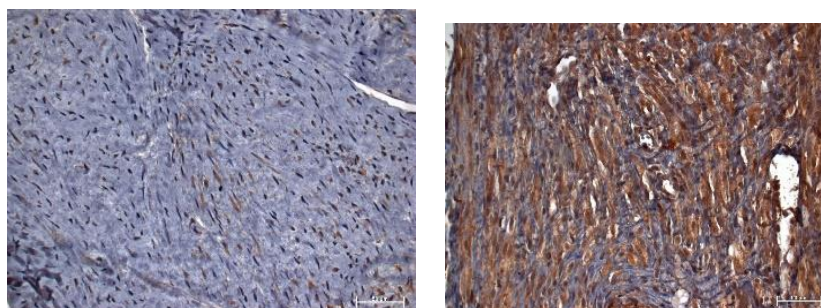


Figura 17 Lâmina com fraca reação para IL-13 e com forte reação

À partir de cada lâmina, foram geradas fotos cuja leitura foi feita de maneira automatizada, gerando a média de área corada pela reação imunohistoquímica e resultando nos valores tabelados e demonstrados no anexo 7, que geraram a análise estatística para a presença de IL-4,6,13 e IFN γ , à seguir.

Variável	Grupo	n	Média	Desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	p*
IL-6	CT	6	0,18	0,11	0,17	0,06	0,38	0,084
	CT + MA	4	0,93	0,83	0,77	0,24	1,94	
	MA	8	0,22	0,15	0,15	0,08	0,53	
	C	4	0,44	0,26	0,46	0,15	0,70	
IFNg	CT	9	0,04	0,03	0,03	0,01	0,10	0,014
	CT + MA	7	0,17	0,09	0,17	0,06	0,32	
	MA	8	0,09	0,07	0,08	0,01	0,20	
	C	7	0,05	0,05	0,04	0,02	0,15	
IL-13	CT	8	3,9	2,9	3,2	1,3	10,5	0,004
	CT + MA	6	13,6	9,0	11,4	5,6	27,8	
	MA	9	6,8	4,2	6,0	2,0	16,4	
	C	7	2,7	2,5	1,5	0,5	7,3	
IL-4	CT	10	9,8	2,7	8,6	7,0	13,0	0,011
	CT + MA	7	14,9	7,2	13,0	9,6	30,6	
	MA	9	9,9	5,8	9,8	3,0	23,0	
	C	7	6,6	2,5	6,0	2,9	10,5	

Tabela 4 *Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$) para análise estatística do percentual de IL-4,6,13 e IFNg nos grupos

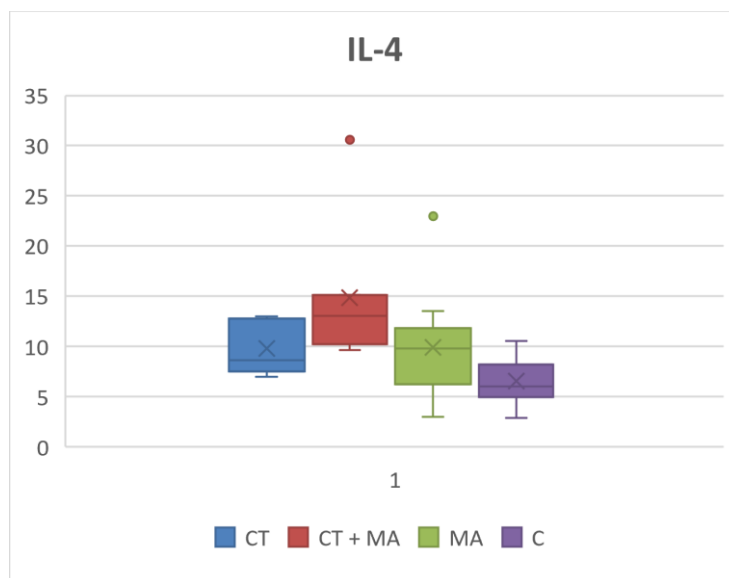


Gráfico 7-2 Distribuição do percentual de IL-4 entre os grupos

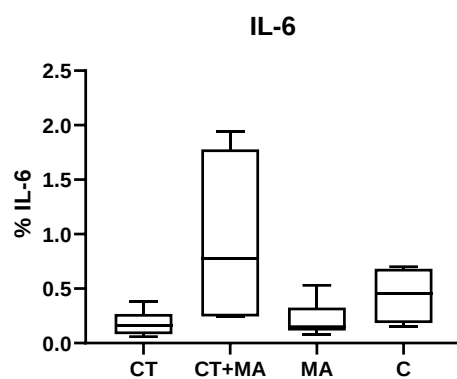


Gráfico 7-3 Distribuição do percentual de IL-6 entre os grupos

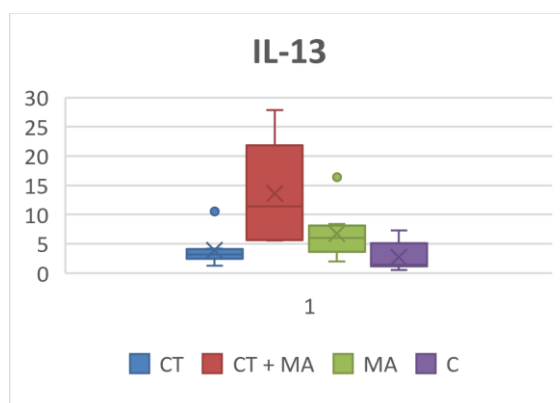


Gráfico 7-4 Distribuição do percentual de IL-13 entre os grupos

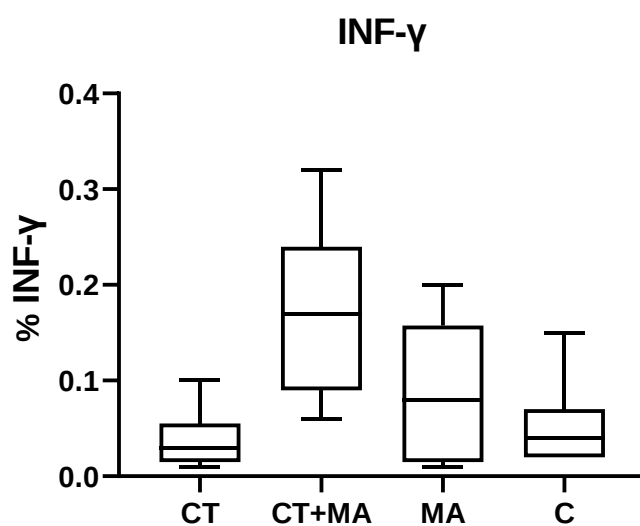


Gráfico 7-5 Distribuição do percentual de IFN-g entre os grupos

Para IFN γ , IL-13 e IL-4 foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. Sendo assim, foram feitas as comparações dos grupos dois a dois, conforme tabelas abaixo, que apresentam os valores de p dessas comparações.

Grupos comparados	p*		
	IFN γ	IL-13	IL-4
Cel tronco x Controle	1	1	0,489
Cel tronco x Membrana	1	0,733	1
Cel tronco x Cel tronco + membrana	0,011	0,060	0,381
Controle x Membrana	1	0,101	0,985
Controle x Cel tronco + membrana	0,081	0,005	0,005
Membrana x Cel tronco + membrana	0,451	1	0,200

*Tabela 5 *Teste de Dunn, $p < 0,05$

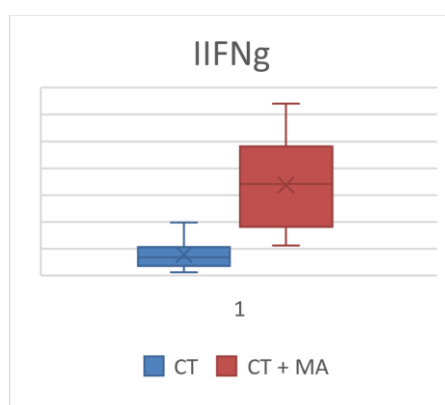


Gráfico 7-6 Comparação demonstrando diferença estatística na presença de IFN- γ entre os grupos de CT e CT + MA

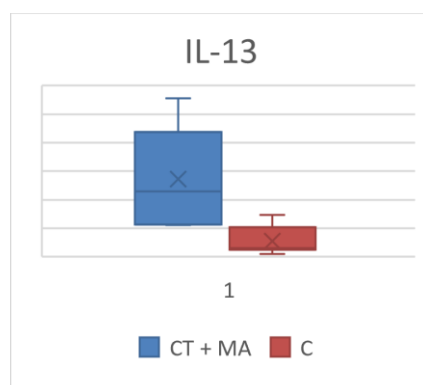


Gráfico 7-7 Comparação demonstrando diferença estatística na presença de IL-13 entre os grupos de CT + MA e C

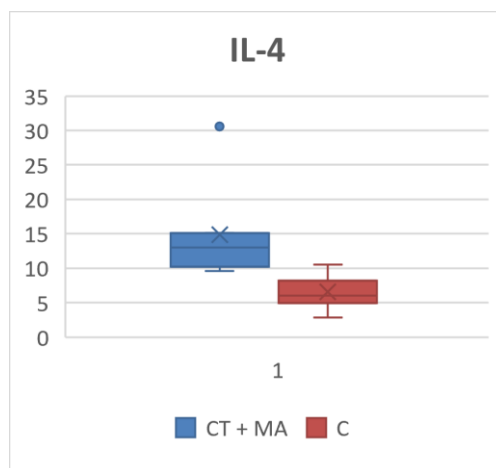


Gráfico 7-8 Comparação demonstrando diferença estatística na presença de IL-4 entre os grupos de CT + MA e C

7.2 AVALIAÇÃO DE CORRELAÇÃO ENTRE VARIÁVEIS

Para cada duas variáveis analisadas, testou-se a hipótese nula de que o coeficiente de correlação entre elas é igual a 0 (não há correlação), versus a hipótese alternativa de que o coeficiente de correlação é diferente de 0 (há correlação). Esta análise foi feita estratificando pelos grupos e também no geral.

Na tabela do anexo 8 são apresentados os coeficientes de correlação de Spearman estimados e os valores de p dos testes estatísticos. Não foram estimados os coeficientes para variáveis com menos de 5 casos com dados válidos.

Como o coeficiente de correlação entre IFNg e Colágeno I é negativo (-0,42), a correlação entre estas duas variáveis é inversa, ou seja, valores baixos (altos) de uma delas correspondem a valores altos (baixos) da outra, como demonstrado no gráfico de dispersão abaixo, em que os pontos estão alinhados em torno de uma reta com inclinação para baixo.

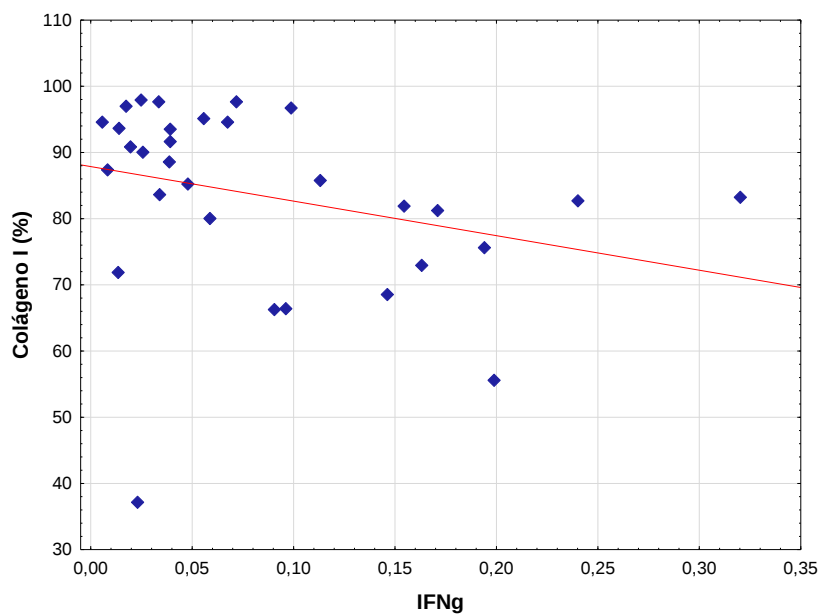


Gráfico 7-9 Gráfico de dispersão demonstrando correlação inversa entre Col. tipo I e IFNg

O mesmo ocorre para a correlação entre colágeno tipo I e IL-4 (-0,65) e colágeno tipo I e IL-13 (-0,35).

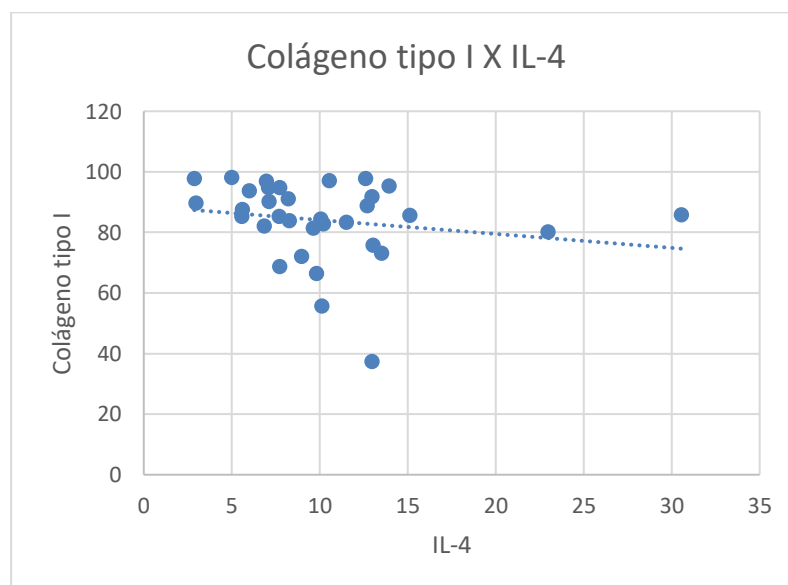


Gráfico 7-10 Gráfico de dispersão demonstrando correlação inversa entre Col. tipo I e IL-4

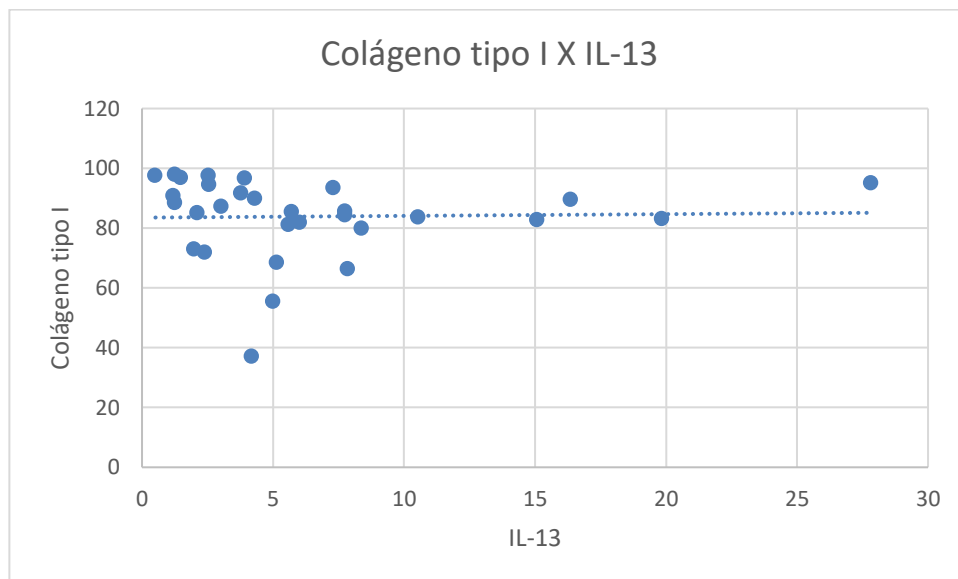
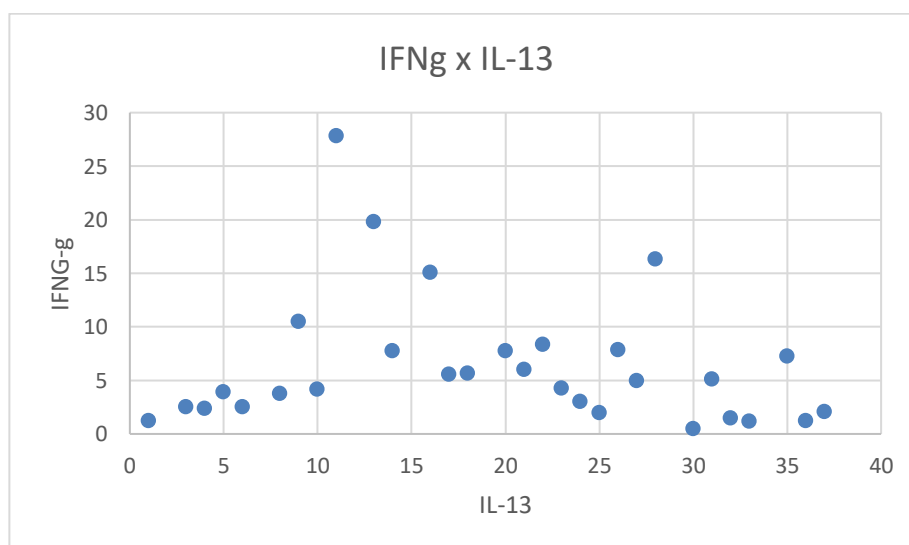


Gráfico 7-11 Gráfico de dispersão demonstrando correlação inversa entre Col. tipo I e IL-13

Já para a correlação entre IFN-g e IL-13 o coeficiente de correlação é positivo (0,51), portanto a correlação entre estas duas variáveis é direta, ou seja, valores baixos (altos) de uma delas correspondem a valores altos (baixos) da outra. O mesmo ocorre para a correlação entre colágeno tipo tipo III e IL-13 (0,35) e colágeno tipo III e IL-4 (0,65), fazendo com que no diagrama de dispersão abaixo que os pontos fiquem alinhados em torno de uma reta com insinuação superior.



8 DISCUSSÃO

Na avaliação final de nossos dados, apresentados acima, não verificamos diferenças entre os grupos quanto à análise histológica por hematoxilina-eosina e quanto à porcentagem e disposição de fibras colágenas tipo I e III, avaliadas por *Sirius-red*.

Portanto, para as características morfológicas de número e formato de tenócitos, espessura do epitendão, presença de infiltrado hemorrágico e linearidade da fibra colágena não houve diferenças significativas entre os grupos.

De fato, o valor da média e mediana do escore histológico foi semelhante entre os grupos, aquela variando de 12,6 a 14,2 e esta de 13,5 a 14. O escore poderia variar de 6 (desorganização estruturas completa) a 24 (tecido normal), portanto, valores entre 12,6 a 14 indicam uma organização tecidual intermediária para todos os grupos.

Para a avaliação histológica de fibras colágenas tipo I e III, o valor médio por grupo para colágeno tipo I variou de 80,3 a 88,4 de colágeno tipo III de 11,6 a 19,7. Desta maneira, todos os grupos apresentaram uma estrutura de matriz celular com mais de 80% de disposição de fibras colágenas tipo I.

Com relação à avaliação do painel inflamatório entre os grupos, para as citocinas de fase aguda, IFN- γ e IL-6, houve diferenças significativas entre os grupos com relação ao percentual de IFN- γ . A presença de interferon-gama, proteína inflamatória de fase aguda e com relação com dano tecidual, apresentou menor percentual no grupo controle, provavelmente porque a presença da membrana amniótica, mesmo descelularizada, e das células-tronco, foram fatores que atuaram mantendo o estímulo inflamatório mais cronicamente.

A ausência de diferenças estatísticas para a presença de IL-6 nos grupos ao final de quatro semanas pode estar relacionada ao fato de ser uma citocina de fase aguda, então

sua correlação à formação de colágeno e atividade de tenócitos estaria presente nos primeiros dias da lesão²¹.

Em termos de tempo, parece que os picos de IL-6 são vistos nas lesões tendíneas entre 3 dias após lesão até duas semanas. Sua permanência elevada por períodos mais prolongados está associada à disfunção de matriz extracelular por gerar cronicamente uma alça de feedback positivo com o IFN- γ , interleucina degradadora de matriz extracelular²²⁻²⁷.

Com relação às citocinas de fase tardia, IL-4 e IL-13, ambas apresentaram diferenças significativas entre os grupos e estiveram presentes em maior concentração no grupo CT + MA em relação ao controle²⁸.

A IL-4 é uma citocina tardia que faz feedback negativo com a IL-6 e gera controle do processo inflamatório inicial direcionando a reparo tecidual efetivo. O fato de IL-4 estar aumentada significativamente no grupo CT + MA infere que neste grupo o reparo está facilitado²⁹.

A IL-13 também é uma citocina tardia e intimamente relacionada à IL-4, uma vez que é ativada por ela. Ela promove remodelamento tecidual e produção de colágeno pelos fibroblastos, tendência confirmada neste trabalho. Seguindo a IL-4, a IL-13 também esteve aumentada significativamente no grupo CT + MA, inferindo também reparo facilitado, tanto que ambas as interleucinas correlacionam-se positivamente a presença de colágeno tipo III (o primeiro a formar-se no processo de reparo tecidual)³⁰.

O fato de não demonstrarmos diferença histológica entre os grupos não representa necessariamente homogeneidade, mas provavelmente, um recorte de um momento em que o processo de reparo ainda não evoluiu o suficiente para demonstrar diferenças visíveis morfológicamente. No momento em que foi feito o estudo, houve diferenças entre

os marcadores inflamatórios, e provavelmente, se continuássemos o estudo e tivéssemos avaliação histológica após um tempo maior, encontraríamos diferenças.

Isso é corroborado inclusive por um estudo prévio de nosso grupo, em que avaliamos a Resistência biomecânica e histologia de tendões de Aquiles de ratos submetidos a tratamento de tendinopatia com células-tronco e plasma rico em plaquetas, e mesmo não encontrando alterações histológicas e de presença de colágeno tipo I e III entre os grupos, o grupo tratado com plasma rico em plaquetas apresentou melhor parâmetro biomecânico, indicando a existência de mecanismos moleculares envolvidos no processo³¹.

No processo de cicatrização tendinea a IL-4 atua como sinalizadora para a IL-13, citocina efetora que estimula a produção dos fibroblastos, inicialmente aumentando a produção de colágeno tipo III, que com o decorrer do tempo pode sofrer maturação em colágeno tipo I, organizando ainda mais a matriz extracelular, correlação comprovada neste estudo.

No processo de reparo tecidual a membrana amniótica por si mesma fornece arcabouço colágeno de sustentação e facilita adesão de fatores de crescimento, promovendo cicatrização em diversos tipos de lesões, como lesões corneanas, úlceras venosas, queimaduras cutâneas e a membrana associada ao uso de células-tronco mesenquimais já mostrou-se efetiva em curar defeitos de pele total em ratos, fato que nos incentivou a buscar essa associação no tratamento de lesões tendíneas³²⁻³⁴.

A continuidade de estudos de vias inflamatórias consiste em uma potencial alternativa de tratamento específico e eficaz para patologias inflamatórias e crônicas. Esperamos que a elucidação dessas vias possa definir alvos específicos de tratamento assim como o bloqueio da IL-21 se demonstrou eficaz para controle de AR³⁵.

Os mecanismos moleculares envolvidos na patogênese das tendinopatias demonstram alterações precoces em relação às alterações histológicas ou morfológicas, mas são um alvo promissor de tratamento destas patologias, a exemplo do que já ocorre para outras doenças como a Artrite reumatóide.

Nas tendinites crônicas, presença baixa de IL-4 e IL-13 demonstram processo inflamatório não controlado, e portanto, ausência de reparo em direção ao tecido normal, mas ratos tratados com Células-tronco e membrana amniótica apresentam maiores níveis de IL-4 e IL-13, demonstrando um perfil imunohistoquímico favorável à recuperação e demonstrando possíveis estratégias de tratamento.

9 CONCLUSÃO

Neste estudo não observamos sinergia na resposta da utilização de células-tronco associadas a MA no tratamento da tendinopatia de Aquiles induzida em ratos em relação ao grupo controle (solução salina) para as variáveis histológicas de concentração, disposição e tipo de colágeno nas lesões (avaliado por coloração de *Sirius Red*) e de composição histológica (avaliada por coloração de hematoxilina-eosina).

Com relação à avaliação imunohistoquímica, não houve diferenças significativas entre os grupos para a interleucina 6, porém, os níveis de IFN-g foram significativamente menores no grupo controle.

Com relação às citocinas de fase tardia, IL-4 e IL-13, ambas apresentaram diferenças significativas entre os grupos e estiveram presentes em maior concentração no grupo CT + MA em relação ao controle.

Neste estudo, apesar de não termos obtido a resposta esperada para a avaliação histológica e de colágeno, o perfil inflamatório encontrado no grupo de células-tronco e membrana amniótica sugere que a associação destas técnicas relaciona-se a melhor cicatriz tendínea, provavelmente pela membrana fornecer um arcabouço de sustentação e orientação ao trabalho das células-tronco.

Portanto, a associação de técnicas que forneçam arcabouço colágeno, como a membrana amniótica, a terapias celulares, pode fornecer base para novos tratamentos eficientes para as lesões tendíneas.

10 REFERÊNCIAS

1. MAFULLI N, KADER D. Tendinopathy of Tendo Achillis. *J Bone Joint Surg (Br)* 2002; 84-B:1-8.
2. CHRISTENSEN IB. Rupture of the Achilles tendon: analysis of 57 cases. *Acta Chir Scand*. 1953; 106: 50-60.
3. LOPEZ RGL, JUNG H-G. Achilles tendinosis: treatment options. *Clinics in Orthopedic Surgery*. 2015; 7:1-7.
4. TATARIE ET AL. Deleterious effects of local corticosteroids injections on the Achilles tendon of rats. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2001, vol. 121, p333 – 337.
5. TATARI ET AL. Comparison of early and late term effects of hylan G-F 20 in Achilles tendonitis: an experimental study. *Joint Dis Rel Surg* 2005; 16 (3):215-223.
6. LAFFITE CD, LE SOSLOWSKI LJ, GOFF B. Molecular and structural effects of percutaneous interventions in chronic Achilles tendinopathy. *Int J Mol Sci*, 21 (19) (2020), pp. 1-18. 2018 Dec; 5: 38.
7. WARDEN SJ. Animal models for the study of tendinopathy. *British Journal of Sports Medicine*. Apr 2007; 41(4): 232–240. Published online Nov 24, 2006.
8. YOUNG, M, Stem Cell Applications in Tendon Disorders: A Clinical Perspective. Hindawi Publishing Corporation, Stem Cells International 2012.
9. Z. YIN, X. ET AL. Stem cells for tendon tissue engineering and regeneration. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2010, vol. 10, no. 5, p. 689–700.
10. AWAD HA, BUTLER DL, BOIVIN GP, SMITH FN, MALAVIYA P, HUIBREGTSE B, CAPLAN AI. Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon. *Tissue Eng*. 1999 Jun;5(3):267-77.
11. GIBLE, J. ET AL. In vitro Differentiation Potential of Mesenchymal Stem Cells. *Transfus Med Hemother* 2008, vol. 35, p228–238.
12. TODA A, OKABE M, YOSHIDA T, NIKAIDO T. The potential of amniotic membrane/amnion-derived cells for regeneration of various tissues. *J Pharmacol Sci* 2007 Nov;105(3):215-28.
13. SACHS BP, STERN CM. Activity and characterization of a low molecular fraction present in human amniotic fluid with broad spectrum antibacterial activity. *Br J Obstet Gynaecol* 1979 Feb;86(2):81-6.
14. WERBER B. Amniotic Tissues for the Treatment of Chronic Plantar Fasciitis and Achilles Tendinosis. *Journal of Sports Medicine*. 2015: 1-6.
15. PHILIP J, HACKL F, CANSECO JÁ, KAMEL RA, KIWANUKA E, DIAZ-SISO JR, CATERSON EJ, JUNKER JPE, ERIKSSON E. Amnion-Derived Multipotent Progenitor Cells Improve Achilles Tendon Repair in Rats. *Eplasty*. 2013;13: e 31.
16. NICODEMO MC, NEVES LR, AGUIAR JC, BRITO FS, FERREIRA, SANT'ANNA LB, RANIERO LJ, MARTINS RAL, BARJA PR, ARISAWA EALS. Amniotic membrane as an option for treatment of acute Achilles tendon injury in rats. *Acta cirúrgica brasileira/Sociedade brasileira para desenvolvimento Pesquisa em Cirurgia* 32 (2):125-139.
17. CROVACE A, LACITIGNOLA L, FRANCIOSO E, ROSSI G. Histology and immunohistochemistry study of ovine tendon grafted with cBMSCs and BMMNCs after collagenase-induced tendinitis. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2008; 21: 329–336.
18. SHARMA P, MAFFULLI N: Tendon injury and tendinopathy: healing and repair. *J Bone Joint Surg Am* 2005, 87:187–202.
19. O'NEIL S, WATSON PJ, BARRY S. Why are eccentric exercises effective for Achilles tendinopathy? *The International Journal of Sports Physical Therapy*. 2015; 10 (4):552-562.

20. ALFREDSON H, CUCCHIARINI M, MADRY H, MARMOTTI A, MOUTON C, OLIVEIRA JM, PEREIRA H, PERETTI GM, SPANG C, STEPHEN J, VAN BERGEN CJA, GIROLAMO L. Current trends in tendinopathy: consensus of the ESSKA basic science committee. Part II: treatment options. REVIEW. *Journal of Experimental Orthopedics* (2018) 5:38.
21. MIRGHADERI SP, VALIZADEH Z, SHADMAN K, LAFOSSE T, ORYADI-ZANJANI L, YEKANINEJAD MS, NABIAN MH. Review paper. Cell therapy efficacy and safety in treating tendon disorders: a systemic review of clinical studies. 1,4*pgs. 2-19
22. MIRGHADERI SP, VALIZADEH Z, SHADMAN K, LAFOSSE T, ORYADI-ZANJANI L, YEKANINEJAD MS, NABIAN MH. Cell therapy efficacy and safety in treating tendon disorders: a systemic review of clinical studies. *J EXP ORTOP* 9, 85 (2022).
23. PITTENGER MF, MACKEY AM, BECK SC, JAISWAL RK, DOUGLAS R, MOSCA JD, ET AL. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*.1999;284(5411):143-7.
24. CHEN ET AL. Stepwise differentiation of human embryogenic stem cells promotes tendon regeneration by secreting fetal tendon matrix and differentiation factors. *Stem Cells* 2009; 27:1276-1287.
25. DEANS RJ, MOSELEY AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol*. 2000;28(8):875-84.
26. BOTMAN O, WYNS C. Induced pluripotent stem cell potential in medicine, specifically focused on reproductive medicine. *Front Surg*.2014;1:5.
27. ZOU L, KIDWAY FK, KOPHER RA, MOTL J, KELLUM CA, WESTENDORF JJ, et al. Use of RUNX2 expression to identify osteogenic progenitor cells derived from human embryonic stem cells. *Stem Cell Reports*. 2015;4(2):190-8.48.
28. GUARITA-SOUZA LC, CARVALHO KA, REBELATTO C, SENEGAGLIA A, HANSEN P, FURUTA M, ET AL. Cell transplantation: differential effects of myoblasts and mesenchymal stem cells. *Int J Cardiol*. 2006;111(3):423-9.
29. ABETOV D, MUSTAPOVA Z, SALIEV T, BULANIN D. Biomarkers and signaling pathways of colorectal cancer stem cells. *Tumour Biol*. 2015;36(3):1339-53.
30. WEISMAN IL. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science*. 2000;287(5457):1442-6.
31. BADIMON L, VILAHUR G. Experimental cell therapy: the search for the best stem cell continues. *J Am Coll Cardiol*. 2014;64(16):1695-7.
32. LOVATI AB, CORRADETTI B, CREMONESI F, BIZZARO D, CONSIGLIO AL. Tenogenic differentiation of equine mesenchymal progenitor cells under indirect co-culture. *Int J Artif Organs* 2012; 35(11): 996 – 1005.
33. AHMAD Z, WARDALE J, BROOKS R, HENSON F, NOORANI A, RUSHTON N. Exploring the application of stem cells in tendon repair and regeneration. *Arthroscopy*. 2012 Jul;28(7):1018-29.
34. TODA A, OKABE M, YOSHIDA T, NIKAIDO T. The potential of amniotic membrane/amnion-derived cells for regeneration of various tissues. *J Pharmacol Sci*2007 Nov;105(3):215-28.
35. SACHS BP, STERN CM. Activity and characterization of a low molecular fraction present in human amniotic fluid with broad spectrum antibacterial activity. *Br J Obstet Gynaecol*1979 Feb;86(2):81-6.
36. SILINI R. et al. The Long Path of Human Placenta, and its Derivates, in Regenerative Medicine. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 3, n. 162, 2015.

37. NAUGHTON, G. K. From lab bench to market: critical issues in tissue engineering. *Annals of the New York Academy of Sciences*, n. 9611, p. 372-385, 2002.
38. DUA, H. S. Azuara-Blanco, A. Amniotic membrane transplantation. *British Journal of Ophthalmology*, v. 83, n. 6, p. 748-52, 1999.
39. CHOPRA, A.; THOMAS, B. S. Amniotic membrane: A novel material for regeneration and repair. *Journal of Biomimetics, Biomaterials, and Tissue Engineering*, v. 18, n. 1, p. 106-13, 2013.
40. FUKUDA, K. et al. Differential distribution of sub-chains of the basement membrane components type IV collagen and laminin among the amniotic membrane, cornea and conjunctiva. *Cornea*, n. 18, p. 73-79, 1999.
41. WEISS, M. L. et al. Immune response of human umbilical Wharton jelly-derived cell. *Stem Cells*, n. 26, p. 2865-74, 2008.
42. AKLE, C. A. et al. Immunogenicity of human amniotic epithelial cells after transplantation into volunteers. *Lancet*, n. 2, p. 1003-1005, 1981.
43. BARADARAN-RAFII, A.; ARJMAND, B.; JAVADI, M. Amniotic membrane transplantation. *Journal of Ophthalmic & Vision Research*, n. 2, p. 58-75, 2007.
44. LOPEZ-VALLADARES, M. J. et al. Donor age and gestational age influence on growth factor levels in human amniotic membrane, *Acta Ophthalmologica*, n. 88, p. 211-216, 2010.
45. KIM, S. S. Effects of human amniotic membrane grafts combined with marrow mesenchymal stem cells on healing of full-thickness skin defects in rabbits. *Cell and Tissue Research*, n. 336, p. 59-66, 2009.
46. OXLUND, H. et al. Biomechanical analysis of human chorioamniotic membranes. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, n. 34, p. 247-255, 1990.
47. WILSHAW, S. P. et al. Biocompatibility and potential of acellular human amniotic membrane to support the attachment and proliferation of allogeneic cells. *Tissue Engineering Part A*, v. 14, n. 4, p. 463-72, 2008.
48. RIAU, A. K. et al. Preservation, sterilization and de-epithelialization of human amniotic membrane for use in ocular surface reconstruction. *Biomaterials*, n. 31, p. 216-225, 2010.
49. FRANCISCO J. C. et al. Decellularized Amniotic Membrane Scaffold as a Pericardial Substitute: An In Vivo Study. *Transplantation Proceedings*, n. 48, p. 2845-2849, 2016.
50. LIU, J. et al. Update on amniotic membrane transplantation. *Expert Review of Ophthalmology*, n. 5, p. 645-661, 2010.
51. MOBASHERI A, SHAKIBAEI M. Is tendinitis an inflammatory disease initiated and driven by pro-inflammatory cytokines such as interleukin 1b. *Histol Histopathol* 2013;28:955e6
52. LEGERLOTZ K, JONES ER, SCREEN HR, RILEY GP. Increased expression of IL-6 family members in tendon pathology. *Rheumatology (Oxford)* 2012;51:1161e5
53. SKUTEKM, VAN GRIENSVEN M, ZEICHEN J, BRAUER N, BOSCH U. Cyclic mechanical stretching enhances secretion of Interleukin 6 in human tendon fibroblasts. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2001;9:322e6.
54. ANDERSEN MB, PINGEL J, KJÆR M, LANGBERG H. Interleukin-6: a growth factor stimulating collagen synthesis in human tendon. *J Appl Physiol* 1985;2011(110):1549e54
55. ANDERSEN MB, PINGEL J, KJAER M ET AL: Interleukin-6: A growth factor stimulating collagen synthesis in human tendon. *J Appl Physiol* (1985); 2011; 110: 1549-54.

56. CHEN S, DENG G, LI K, ZHENG H, WANG G, YU B, ZHANG K. Interleukin-6 Promotes Proliferation but Inhibits Tenogenic Differentiation via the Janus Kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription 3 (JAK/STAT3) Pathway in Tendon Derived Stem Cells. 2018; 24: 1567-1573.
57. KATSMA MS, PATEL SH, ELDON E, CORBELL KA, SHIMKUS KL, FLUCKEY JD, CARROLL CC. The influence of chronic IL-6 exposure, in vivo, on rat Achilles tendon extracellular matrix. Volume 93, May 2017, Pages 10-14.
58. STAUBER T, MOSCHINI G, HUSSIEN AA, JAEGER PK, DE BOCK K, SNEDEKER JG. IL-6 signaling exacerbates hallmarks of chronic tendon disease by stimulating progenitor proliferation & migration to damage. Doi.org/10.1101/2023.02.13.528273. 2023.
59. ELLIS M, SCHNABEL LV, BERGLUND AK. Defining the profile: Characterizing cytokines in tendon injury to improve clinical therapy. *Journal of Experimental Orthopedics* (2022) 9:85.
60. FARVIND V, HUANG AH. Reparative and Maladaptive Inflammation in Tendon Healing. *Front. Bioeng. Biotechnology*. 9:719047. 2021.
61. VISSE R, NAGASE H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases. *Circ Res* 2003;92:827e39.
62. OBLANDER SA, SOMERVILLE RPT, APTE SS. An update on metalloproteinases in the musculoskeletal system. *Curr Opin Orthop* 2003;14:322–8.
63. BRAMONO DS, RICHMOND JC, WIETZEL PP, ET AL. Matrix metalloproteinases and their clinical applications in orthopedics. *Clin Orthop* 2004;428:272–85.
64. KOSKINEN SOA, HO`YHTYA` M, TURPEEMNNIEMIHUJANEN T, et al. Serum concentrations of collagen-degrading enzymes and their inhibitors after downhill running. *Scand J Med Sci Sports* 2001;11:9–15
65. NAGASE H, WOESSNER JF Jr: Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999, 274:21491–21494. 14. Aimes RT, Quigley JP: Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments. *J Biol Chem* 1995, 270:5872–5876].
66. OSHIRO W, LOU J, XING X, TU Y, MANSKE PR. Flexor tendon healing in the rat: a histologic and gene expression study. *J Hand Surg Am* 2003, 28:814–823.
67. LAKEMEIER S, BRAUN J, EFE T, FOELSCH C, ARCHONTIDOU-APRIN E, FUCHS-WINKELMANN S, PALETTA JR, SCHOFFER MD: Expression of matrix metalloproteinases 1, 3, and 9 in differing extents of tendon retraction in the torn rotator cuff.
68. DAKIN SG, NEWTON J, MARTINEZ FO, HEDLEY R, GWILYM S, JONES N, REID HAB, WOOD S, WELLS G, APPLETON L, WHEWAY K, WATKINS B, JONATHAN A. Chronic inflammation is a feature of Achilles tendinopathy and rupture. *Br J Sports Med* 2018; 52:359–367.
69. JARVINEN TAH, JATVINEN M, KALIMO H. Regeneration of injured skeletal muscle after the injury. *Muscles, Ligaments and Tendons Journal* 2013; 3 (4): 337-345.
70. ENWEMEKA, C. S. Inflammation, cellularity and fibrinogenesis in regeneration tendon: Implications for tendon rehabilitation. *Physical Therapy*, v. 69, n.10, p. 816-825, 1989.
71. BOYUM A. Separation of lymphocytes, granulocytes, and monocytes from human blood using iodinated density gradient media. *Methods in Enzymology*. Volume 108, 1984, Pages 88-102.

72. HOPPER, R. A. Acellularization of human placenta with preservation of the basement membrane: a potential matrix for tissue engineering. *Ann. Plast. Surg.* 51:598–602, 2003.
73. URDZIKOVA LM, SEDLACEK R, SUCHY T, AMEMORI T, RUZICKA J, LESNY P, HAVLAS V, SYKOVA E, JENDELOVA P. Human multipotent mesenchymal stem cells improve healing after collagenase tendon injury in the rat. *BioMedical Engineering OnLine.* 2014
74. FEDATO RA, FRANCISCO JC, SLIVA G, NORONHA L, OLANDOSKI M, FARIA NETO JR, FERREIRA PE, SIMWONI R B, ABDELWAHID E, CARVALHO KAT, GUARITA-SOUZA LC. Stem Cells and Platelet-Rich Plasma Enhance the Healing Process of Tendinitis in Mice. *Gama Research Article.* Volume 2019. Article ID 1497898.
75. DALLAUDIERE B, ZURLINDEN O, PEROZZIELLO A, DESCHAMPS L, LARBI A, LOUEDEC L, PESQUER L, BENAYOUN Y, SILVESTRE A, SERFATY JM. Combined intra-tendinous injection of Platelet Rich Plasma and bevacizumab accelerates and improves healing compared to Platelet Rich Plasma in tendinosis: comprehensive assessment on a rat model. *Muscles, Ligaments and Tendons Journal.* 2014; 4 (3): 351-356.
76. SHARMA P, MAFFULLI N: Tendon injury and tendinopathy: Healing and repair. *J Bone Joint Surg Am*, 2005; 87: 187–202.
77. CEN L, LIU W, CUI L, ZHANG W, CAO Y. Collagen tissue engineering: development of novel biomaterials and applications. *Pediatr Res.* 2008 May;63(5):492-6.
78. KURPAKUS, M. A.; STOCK, E. L.; JONES, J. C. The roles of the basement membrane in differential expression of keratin proteins in epithelial cells. *Developmental Biology*, n. 150, p. 243-255, 1992.
79. CEN L, LIU W, CUI L, ZHANG W, CAO Y. Collagen tissue engineering: development of novel biomaterials and applications. *Pediatr Res.* 2008 May;63(5):492-6.
80. GALATZ LM, GERSTENFELD L, HEBER-KATZ E ET AL. Tendon regeneration and scar formation: The concept of scarless healing. *J Orthop Res*, 2015; 33: 823–31
81. TANG C, CHEN Y, HUANG J, ZHAO K, CHEN X, YIN Z, HENG BC, CHEN W, SHEN W. Review article: the roles of inflammatory mediators and immunocytes in tendinopathy. *Journal of orthopedic translation.* volume 14, July 2018, pages 23-33.
82. BARBONI B, RUSSO V, CURINI V, MAURO A, MARTELLI A, MUTTINI A, BERNABÒ N, VALBONETTI L, MARCHISIO M, DI GIACINTO O, BERARDINELLI P, MATTIOLI M. Achilles tendon regeneration can be improved by amniotic epithelial cell allotransplantation. *Cell Transplant.* 2012;21(11):2377-95. Doi: 10.3727/096368912X638892. Epub 2012 Apr 10.

11 ANEXOS

11.1 TERMOS DE CONSENTIMENTO LIVRES E ESCLARIDOS DAS PARTURIENTES, AUTORIZANDO DOAÇÃO DE MATERIAL PLACENTÁRIO / CORDÃO UMBILICAL.

1. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Este documento é um termo de consentimento livre e esclarecido, ele informa a você os objetivos, procedimentos, riscos e benefícios sobre o estudo de pesquisa clínica no qual você está sendo convidada a participar. Você precisa ler, entender e assinar este termo de consentimento livre e esclarecido se concordar em participar deste estudo.

Eu Mateia Guatira Aparecida da Silva, RG 091.570.899-69, estou sendo convidada a participar de um estudo denominado: "Reparação traqueal de coelhos com matriz celular associada a nanopartículas de 15-deoxy- Δ^{12} , 14 prostaglandina J2".

Sei que para o avanço da pesquisa a participação de voluntários é de fundamental importância. Caso eu aceite participar desta pesquisa, doarei a minha placenta após o nascimento da minha criança assim como responderei a um questionário médico, se necessário.

Entendo que a placenta é um órgão da gestação e que após o término do parto sofre descarte (jogada no lixo hospitalar) e não havendo prejuízo para a mãe e nem para o meu (minha) filho (a) recém-nascido (a).

Entendo que a placenta será utilizada para o estudo, portanto não apresentará fins lucrativos.

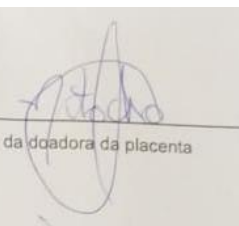
Estou ciente de que minha privacidade será respeitada, ou seja, meu nome, ou qualquer outro dado confidencial, será mantido em sigilo. A elaboração final dos dados será feita de maneira codificada, respeitando o imperativo ético da confidencialidade.

Estou ciente de que posso me recusar a participar do estudo, ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar, sem sofrer qualquer dano.

Os pesquisadores envolvidos com o referido projeto são: Dr. Luiz César Guarita Souza e a Mestranda em Ciências da Saúde Anna Flavia Ribeiro dos Santos com quem poderei manter contacto pelos telefones.

Estarão garantidas todas as informações que eu queira saber antes, durante e depois do estudo.

Li, portanto, este termo e fui orientada quanto ao teor da pesquisa acima mencionada e compreendi todas as informações dadas, estou satisfeita com as informações recebidas, pude formular todas as perguntas convenientes e me foram esclarecidas todas as dúvidas. Concordo, voluntariamente em participar desta pesquisa, sabendo que não receberei e nem pagarei nenhum valor econômico por minha participação.


Assinatura da doadora da placenta

Pesquisador Responsável
Tel: (41) _____

Mestrando em Ciências da Saúde - PUCPR
Tel: (41) 996859499

Curitiba 14 de novembro de 2018.

Anexo 1 TCLE para doação placentária, Paciente 1

1. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Este documento é um termo de consentimento livre e esclarecido, ele informa a você os objetivos, procedimentos, riscos e benefícios sobre o estudo de pesquisa clínica no qual você está sendo convidada a participar. Você precisa ler, entender e assinar este termo de consentimento livre e esclarecido se concordar em participar deste estudo.

Eu, Carolina Freire Damalho, RG nº 16.996.429 estou sendo convidada a participar de um estudo denominado: "Reparação traqueal de coelhos com matriz acelular associada a nanopartículas de 15-deoxy-Δ12, 14 prostaglandina J2".

Sei que para o avanço da pesquisa a participação de voluntários é de fundamental importância. Caso eu aceite participar desta pesquisa, doarei a minha placenta após o nascimento da minha criança assim como responderei a um questionário médico, se necessário.

Entendo que a placenta é um órgão da gestação e que após o término do parto sofre descarte (jogada no lixo hospitalar) e não havendo prejuízo para a mãe e nem para o meu (minha) filho (a) recém-nascido (a).

Entendo que a placenta será utilizada para o estudo, portanto não apresentará fins lucrativos.

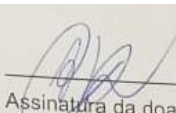
Estou ciente de que minha privacidade será respeitada, ou seja, meu nome, ou qualquer outro dado confidencial, será mantido em sigilo. A elaboração final dos dados será feita de maneira codificada, respeitando o imperativo ético da confidencialidade.

Estou ciente de que posso me recusar a participar do estudo, ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar, sem sofrer qualquer dano.

Os pesquisadores envolvidos com o referido projeto são: Dr. Luiz César Guarita Souza e a Mestranda em Ciências da Saúde Anna Flavia Ribeiro dos Santos com quem poderei manter contacto pelos telefones.

Estarão garantidas todas as informações que eu queira saber antes, durante e depois do estudo.

Li, portanto, este termo e fui orientada quanto ao teor da pesquisa acima mencionada e compreendi todas as informações dadas, estou satisfeita com as informações recebidas, pude formular todas as perguntas convenientes e me foram esclarecidas todas as dúvidas. Concordo, voluntariamente em participar desta pesquisa, sabendo que não receberei e nem pagarei nenhum valor econômico por minha participação.


Assinatura da doadora da placenta

Pesquisador Responsável
Tel: (41)

Mestrando em Ciências da Saúde - PUCPR
Tel: (41) 996859499

Curitiba 27 de setembro de 2018.

Anexo 2 TCLE para doação placentária, Paciente 2

11.2 LIBERAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM ANIMAIS DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação
Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais

Curitiba, 26 de junho de 2019.

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

REGISTRO DO PROJETO: 01637 – 2ª versão

TÍTULO DO PROJETO: CÉLULAS-TRONCO MONONUCLEARES E MEMBRANA AMNIÓTICA COMO ADJUVANTES NA CICATRIZAÇÃO DE LESÕES TENDÍNEAS EM RATOS

PESQUISADOR RESPONSÁVEL

LUIZ CÉSAR GUARITA SOUZA

EQUIPE DE PESQUISA

Rosângela Alquieri Fedato Develis, Julio Cesar Francisco, Rossana Baggio Simeoni

INSTITUIÇÃO

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

CURSO

Medicina

VIGÊNCIA DO PROJETO	Junho/2019 a Dezembro/2019	QUANTIDADE DE ANIMAIS	80
ESPECIE/LINHAGEM	Rato wistar (<i>Rattus norvegicus</i>)	Nº SISBIO (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
SEXO	Variado	ATIVIDADES (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
IDADE / PESO	4 meses / 350 gramas	ESPECIE – GRUPO TAXONÔMICOS (de vida livre)	Não se aplica
ORIGEM DO ANIMAL	Será necessário realizar demandas em Universidades que disponibilizem os animais no momento do início da pesquisa: UEL, UEM, Universidade Estadual de Ponta Grossa, TECPAR e PUCRS	LOCAL (IS) (Somente animais de vida livre)	Não se aplica

O Colegiado da CEUA-PUCPR certifica que esta emenda que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794/2018 e Decreto nº 6.899/2009, e com as normas editadas pelo CONCEA e foi **APROVADO** pela CEUA – PUCPR. Se houver mudança do protocolo o pesquisador deve enviar um relatório a CEUA descrevendo de forma clara e sucinta, a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por esta CEUA em qualquer tempo. Lembramos, ao pesquisador que é obrigatório encaminhar o relatório anual/parcial e relatório final da pesquisa a esta CEUA.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Sérgio Luiz Rocha

Coordenador

Comissão de Ética no Uso de Animais



Anexo 3 Aprovação do CEUA da Pontifícia Universidade Católica do Paraná

11.3 FICHA DE AVALIAÇÃO INDIVIDUAL DE BEM ESTAR ANIMAL APÓS PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

GRUPO: ☐ CT () CONTROLE () CT + MA () MA DATA DA CIRURGIA: / /

PRÉ-OPERATÓRIO:
 PESO: ____ Kg. TEMPO DE JEJUM: ____ hs (12hs). FREQ. CARDIACA: ____ bpm.

PER-OPERATÓRIO:
 INÍCIO: Anestesia: ____ hs Cirurgia: ____ hs
 TERMINO: Anestesia: ____ hs Cirurgia: ____ hs

ANESTÉSICOS, ANALGÉSICOS E ANTIBIÓTICOS:
 KETAMINA: ____ mg(20mg/Kg-IM) XILAZINA: ____ mg (1,0mg/Kg - IM)

FREQUÊNCIA CARDIACA:
 T-00 min: ____ T-05 min: ____ T-10 min: ____ T-15 min: ____ T-20 min: ____ T-25 min: ____
 COMPLICAÇÕES (hemorragia, óbito, etc.):

RECUPERAÇÃO PÓS-OPERATÓRIA: (acordado, responsivo e deambulando sem torpor)
 FINAL DA ANESTESIA: ____ hs FINAL DA RECUPERAÇÃO: ____ hs

PÓS-OPERATÓRIO:

PO	DATA	HORA	ATIVO (S / N)	HIDRATAÇÃO (S / N)	ALIMENTAÇÃO (S / N)	INFECCÇÃO (S / N)	ANALGESIA (S / N)
1º							

	Comportamentos	Sim	Nao
*ATIVIDADE: <u>movimenta-se bem ao estímulo verbal ou tátil</u>	Vocalização	()	()
* HIDRATAÇÃO: <u>perda de brilho dos olhos e letargia</u>	Perda de peso	()	()
* ALIMENTAÇÃO: <u>ingesta da ração e água</u>	Hipotermia	()	()
*INFECCÇÃO: <u>calor, rubor, tumor e secreção</u>	Alterações nas fezes e urina	()	()
* ANALGESIA: Tramadol SC.	Ato de lamber-se (falta de higiene pessoal)	()	()
	Recusa em se movimentar	()	()
	Automutilação	()	()

EUTANÁSIA:
 DATA: ____ / ____ / ____ HORA: ____ hs
 PESO: ____ kg. FENOBARBITAL: ____ mg(100mg/Kg - IM)
 RETIRADA DA PEÇA: INÍCIO: ____ hs TERMINO: ____ hs

11.4 RESULTADOS

11.4.1 DADOS DA ANÁLISE HISTOLÓGICA POR HEMATOXILINA-EOSINA

		Nota atribuída aos parâmetros histológicos						
Grupo	Animal	Linear.	Morfol.	Celular.	Inflam.	Hemor.	Epit.	Soma
CT	1	3	3	2	3	2	1	14
	2	3	3	2	2	2	1	13
	3	3	3	2	2	2	1	13
	4	3	3	2	3	2	1	14
	5	3	3	2	3	2	1	14
	6	2	2	1	2	2	1	10
	7	3	3	2	2	2	1	13
	8	3	4	3	3	3	1	17
	9	3	3	2	2	2	1	13
	10	3	3	2	3	2	2	15
MA + CT	1	2	2	1	3	2	1	11
	2	2	2	2	3	2	1	12
	3	3	3	2	3	2	1	14
	4	-	-	-	-	-	-	-
	5	3	3	2	3	2	1	14
	6	3	3	2	2	2	1	13
	7	-	-	-	-	-	-	-
	8	1	2	1	2	2	1	9
	9	3	3	2	3	2	1	14
	10	3	3	2	3	2	1	14
MA	1	3	2	2	3	2	1	13
	2	3	3	2	3	2	1	14
	3	3	3	2	3	2	1	14
	4	3	2	2	3	2	1	13
	5	3	2	2	2	2	1	12
	6	3	3	2	3	2	1	14
	7	3	3	2	3	2	1	14
	8	3	3	2	3	2	1	14
	9	3	3	2	3	2	1	14
	10	3	3	2	3	2	1	14
C	1	3	3	2	3	2	1	14
	2	3	3	2	3	2	1	14
	3	3	3	2	3	2	1	14
	4	3	3	2	3	2	1	14
	5	3	3	2	3	2	1	14
	6	3	3	2	3	2	2	15
	7	3	3	2	3	2	1	14
	8	2	2	2	3	2	1	12
	9	3	4	3	3	2	2	17
	10	-	-	-	-	-	-	-

Anexo 5 Resultado da análise histológica por HE

11.4.2 DADOS DA ANÁLISE HISTOLÓGICA POR SIRIUS-RED

Grupo	Animal	% Col. tipo I	% Col. tipo III
CT	1	88,67228	11,32772
	2	94,68957	5,310428
	3	94,67009	5,329908
	4	71,99287	28,00713
	5	96,78912	3,210885
	6	97,76461	2,235387
	7	85,19644	14,80356
	8	91,76752	8,232476
	9	83,73942	16,26058
	10	37,24898	62,75102
MA + CT	1	95,25195	4,748048
	2	75,68604	24,31396
	3	83,30736	16,69264
	4	-	-
	5	85,80346	14,19654
	6	66,34731	33,65269
	7	-	-
	8	82,80798	17,19202
	9	81,30873	18,69127
	10	85,55754	14,44246
MA	1	93,74026	6,259735
	2	84,39343	15,60657
	3	82,02189	17,97811
	4	80,07587	19,92413
	5	90,08762	9,91238
	6	87,41478	12,58522
	7	73,04669	26,95331
	8	66,41677	33,58323
	9	55,63869	44,36131
	10	89,67368	10,32632
C (Controle)	1	68,02493	31,97508
	2	97,72878	2,271217
	3	68,59478	31,40522
	4	97,01947	2,980529
	5	90,97798	9,022016
	6	96,26597	3,734033
	7	93,64437	6,355624
	8	97,96367	2,036329
	9	85,24229	14,75771
	10	-	-

Anexo 6 Dados da análise histológica por SR

11.4.3 DADOS DA ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA

Grupo	Animal	IL-4	IL-6	IL-13	IFNg
CT	1	12,6851	0,09289	1,26152	0,03834
	2	7,08174	0,37515		0,06742
	3	7,71709		2,55785	0,00552
	4	8,97251	0,05649	2,39723	0,01324
	5	6,95885		3,93043	0,09864
	6	12,5989	0,22803	2,54793	0,03316
	7	7,68494			
	8	12,9734		3,78649	0,0388
	9	8,27816	0,14316	10,5361	0,03374
	10	12,9734	0,19234	4,18266	0,02266
CT + MA	1	13,9265		27,8312	0,05555
	2	13,0249	1,93656		0,19392
	3	11,5018		19,8547	0,32015
	4	30,5643	0,25865	7,75376	0,11303
	5				0,09043
	6	10,2099		15,0871	0,24008
	7	9,64392	0,24008	5,59404	0,17075
	8	15,1371	1,28579	5,70805	
MA	1				0,01389
	2	10,0641	0,53462	7,75376	
	3	6,86066		6,01953	0,15422
	4	22,988	0,30739	8,3792	0,05841
	5	7,11552	0,1392	4,30523	0,02553
	6	5,60763	0,07892	3,03288	0,00795
	7	13,5096	0,16221	1,98716	0,16279
	8	9,81983	0,11303	7,86464	0,096
	9	10,1212	0,1319	5,00698	0,1986
	10	2,97585	0,32952	16,3635	
C	1				
	2	2,8693	0,15288	0,51087	0,07175
	3	7,73207		5,13824	0,145829558
	4	10,5307	0,28865	1,49216	0,01712
	5	8,21829	0,69733	1,19455	0,01934
	6				
	7	6,01073	0,63131	7,3027	0,03915
	8	4,98184		1,2504	0,02477
	9	5,5838		2,10399	0,04748

Anexo 7 Resultado da análise imunohistoquímica entre os grupos - % marcado pelo anticorpo

11.4.4 DADOS DA ANÁLISE DO COEFICIENTE DE RELAÇÃO ENTRE VARIÁVEIS

Grupo	Variáveis analisadas	n	Coefficiente de correlação de Spearman	*P
CT	Escore histológico x IL-6	6	-0,50	0,312
	Escore histológico x IFNg	9	0,17	0,657
	Escore histológico x IL-13	8	0,12	0,772
	Escore histológico x IL-4	10	0,50	0,145
	Escore histológico x Colágeno I (%)	10	-0,44	0,206
	Escore histológico x Colágeno III (%)	10	0,44	0,206
	IL-6 x IFNg	6	0,49	0,329
	IL-6 x Colágeno I (%)	6	0,54	0,266
	IFNg x Colágeno I (%)	9	0,43	0,244
	IL-6 x IL-13	5	0,50	0,391
	IL-6 x IL-4	6	-0,26	0,623
	IFNg x IL-13	8	0,19	0,651
	IFNg x IL-4	9	-0,27	0,486
	IL-13 x IL-4	8	-0,12	0,778
	IL-13 x Colágeno I (%)	8	-0,19	0,651
	IL-13 x Colágeno III (%)	8	0,19	0,651
	IL-4 x Colágeno I (%)	10	-0,41	0,235
	IL-4 x Colágeno III (%)	10	0,41	0,235
CT + MA	Escore histológico x IL-6	4		
	Escore histológico x IFNg	7	0,11	0,812
	Escore histológico x IL-13	6	-0,54	0,268
	Escore histológico x IL-4	7	0,22	0,641
	Escore histológico x Colágeno I (%)	8	0,11	0,788
	Escore histológico x Colágeno III (%)	8	-0,11	0,788
	IL-6 x IFNg	4		
	IL-6 x Colágeno I (%)	5	-0,20	0,747
	IFNg x Colágeno I (%)	7	-0,14	0,760
	IL-6 x IL-13	3		
	IL-6 x IL-4	4		
	IFNg x IL-13	5	-0,10	0,873
	IFNg x IL-4	6	-0,54	0,266
	IL-13 x IL-4	6	0,14	0,787
	IL-13 x Colágeno I (%)	6	0,54	0,266
	IL-13 x Colágeno III (%)	6	-0,54	0,266
	IL-4 x Colágeno I (%)	7	0,68	0,094
	IL-4 x Colágeno III (%)	7	-0,68	0,094
MA	Escore histológico x IL-6	8	-0,09	0,826
	Escore histológico x IFNg	8	0,49	0,212
	Escore histológico x IL-13	9	-0,05	0,907
	Escore histológico x IL-4	9	-0,25	0,515
	Escore histológico x Colágeno I (%)	10	-0,52	0,126
	Escore histológico x Colágeno III (%)	10	0,52	0,126

	IL-6 x IFNg	7	0,54	0,215
	IL-6 x Colágeno I (%)	8	0,26	0,531
	IFNg x Colágeno I (%)	9	-0,62	0,077
	IL-6 x IL-13	8	0,45	0,260
	IL-6 x IL-4	8	0,19	0,651
	IFNg x IL-13	7	0,00	1
	IFNg x IL-4	8	0,45	0,260
	IL-13 x IL-4	9	-0,10	0,798
	IL-13 x Colágeno I (%)	9	0,03	0,932
	IL-13 x Colágeno III (%)	9	-0,03	0,932
	IL-4 x Colágeno I (%)	9	-0,65	0,058
	IL-4 x Colágeno III (%)	9	0,65	0,058
Controle	Escore histológico x IL-6	4		
	Escore histológico x IFNg	7	0,27	0,562
	Escore histológico x IL-13	7	0,27	0,562
	Escore histológico x IL-4	7	0,13	0,775
	Escore histológico x Colágeno I (%)	9	-0,39	0,305
	Escore histológico x Colágeno III (%)	9	0,39	0,305
	IL-6 x IFNg	4	-	-
	IL-6 x Colágeno I (%)	4	-	-
	IFNg x Colágeno I (%)	7	-0,39	0,383
	IL-6 x IL-13	4		
	IL-6 x IL-4	4		
	IFNg x IL-13	7	0,21	0,645
	IFNg x IL-4	7	-0,54	0,215
	IL-13 x IL-4	7	0,29	0,535
	IL-13 x Colágeno I (%)	7	-0,54	0,215
	IL-13 x Colágeno III (%)	7	0,54	0,215
	IL-4 x Colágeno I (%)	7	-0,43	0,337
	IL-4 x Colágeno III (%)	7	0,43	0,337
	Escore histológico x IL-6	22	-0,14	0,530
	Escore histológico x IFNg	31	0,02	0,920
Todos	Escore histológico x IL-13	30	-0,23	0,222
	Escore histológico x IL-4	33	-0,06	0,741
	Escore histológico x Colágeno I (%)	37	-0,18	0,296
	Escore histológico x Colágeno III (%)	37	0,18	0,296
	IL-6 x IFNg	21	0,39	0,082
	IL-6 x Colágeno I (%)	23	0,21	0,335
	IFNg x Colágeno I (%)	32	-0,42	0,018
	IL-6 x IL-13	20	0,25	0,280
	IL-6 x IL-4	22	0,17	0,450
	IFNg x IL-13	27	0,51	0,007
	IFNg x IL-4	29	0,24	0,217
	IL-13 x IL-4	30	0,25	0,174
	IL-13 x Colágeno I (%)	30	-0,35	0,057
	IL-13 x Colágeno III (%)	30	0,35	0,057

IL-4 x Colágeno I (%)	33	-0,32	0,066
IL-4 x Colágeno III (%)	33	0,32	0,066

Anexo 8 Coeficiente de relação de Spearman

11.5 ARTIGO ORIGINADO À PARTIR DO PRESENTE ESTUDO E *SUBMISSION LETTER*

Cellular and Molecular Life Sciences AMNIOTIC MEMBRANE AND STEM CELLS IMPROVE THE IMMUNOHISTOCHEMICAL PROFILE OF INJURED RAT ACHILLES TENDONS --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	AMNIOTIC MEMBRANE AND STEM CELLS IMPROVE THE IMMUNOHISTOCHEMICAL PROFILE OF INJURED RAT ACHILLES TENDONS
Article Type:	Original Article
Corresponding Author:	Rosangela Alquieri Fedato, MD Pontificia Universidade Católica do Paraná: Pontificia Universidade Catolica do Parana BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Pontificia Universidade Católica do Paraná: Pontificia Universidade Catolica do Parana
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Rosangela Alquieri Fedato, MD
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Rosangela Alquieri Fedato, MD Guilherme Vieira Cavalcante da Silva Lúcia Noronha Seigo Nagashima Márcia Olandoski Ricardo Aurino de Pinho Aline Luri Takejima Julio Cesar Francisco Rossana Baggio Simeoni Luiz César Guarita-Sousa Ana Paula Camargo
Order of Authors Secondary Information:	
Funding Information:	
Abstract:	Introduction: The use of stem cells and amniotic membranes has shown structural and functional improvements in injured tendons in animal models. Objective: Evaluate the response to the use of bone marrow stem cells in association with the use of a decellularised human amniotic membrane in the treatment of Achilles tendon injuries in rats. Methods: 40 Wistar rats were randomized into four treatment groups: SC (stem cells), AM (amniotic membrane), SC + AM (stem cells + amniotic membrane), and C (control, 0.9% saline solution). They underwent sectioning of the Achilles tendon and tenorrhaphy. For the animals in the AM and SC + AM groups, the amniotic membrane was sutured over the lesion after suturing the tendon. For the animals in the SC and SC + AM groups, 2 ml of autologous blood prepared from their iliac crests containing stem cells was also applied around the lesion, according to the technique described by Boyum. The animals in group C received 2 ml of 0.9% saline solution around the lesion. The animals were euthanized after four weeks and the tendons were sent for histological analysis using Sirius-red and immunohistochemical analysis of IL-6, IL-4, and IL-13. Results: There were no differences between the groups for the analysis of type I and III

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

Anexo 9 Submission letter do artigo gerado a partir dos dados desta tese

AMNIOTIC MEMBRANE AND STEM CELLS IMPROVE THE IMMUNOHISTOCHEMICAL PROFILE OF INJURED RAT ACHILLES TENDONS

AUTHORS: FEDATO RA; SILVA GVC, NORONHA L, NAGASHIMA S, MARTINS APC, OLANDOSKI M, PINHO RA, TAKEJIMA AL, SIMEONI RB, FRANCISCO JC, GUARITA-SOUZA LC.

Pontifical Catholic University of Paraná, Department of Cellular and Molecular Biology and Experimental Pathology, Curitiba, Paraná, Brazil

Main Author: Fedato RA

Professor of the Anatomy and Biomechanics Departments at Faculdades Pequeno Príncipe, Curitiba, Paraná, Brazil

Contact: rosangela.develis@professor.fpp.edu.br

ORCID: 0000-0002-5549-8294

SUMMARY

Introduction: The use of stem cells and amniotic membranes has shown structural and functional improvements in injured tendons in animal models.

Objective: Evaluate the response to the use of bone marrow stem cells in association with the use of a decellularised human amniotic membrane in the treatment of Achilles tendon injuries in rats.

Methods: 40 Wistar rats were randomized into four treatment groups: SC (stem cells), AM (amniotic membrane), SC + AM (stem cells + amniotic membrane), and C (control, 0.9% saline solution). They underwent sectioning of the Achilles tendon and tenorrhaphy. For the animals in the AM and SC + AM groups, the amniotic membrane was sutured over the lesion after suturing the tendon. For the animals in the SC and SC + AM groups, 2 ml of autologous blood prepared from their iliac crests containing stem cells was also applied around the lesion, according to the technique described by Boyum. The animals in group C received 2 ml of 0.9% saline solution around the lesion. The animals were euthanized after four weeks and the tendons were sent for histological analysis using *Sirius-red* and immunohistochemical analysis of IL-6, IL-4, and IL-13.

Results: There were no differences between the groups for the analysis of type I and III collagen fibers, but the groups treated with SC + AM showed a better immunohistochemical profile, with a greater presence of IL-4 and IL-13.

Conclusion: Animals treated with amniotic membrane and stem cells in association have a better immunohistochemical profile than the control group, as IL-4 and 13 are cytokines related to tissue repair and organization.

KEYWORDS: Achilles tendon, amniotic membrane, stem cells, tendonitis

INTRODUCTION

Tendon disorders are common in clinical practice and have low healing potential in both acute and chronic injuries [1-3]. Current treatments, based on anti-inflammatory drugs, rehabilitation programs, and surgery, fail to provide lasting and significant relief, but there is no therapeutic consensus or modality considered *gold standard* [4-9].

Concerning cell therapies, bone marrow mesenchymal stem cells (SC) can differentiate into tenocytes and induce the formation of linearly arranged type I collagen, also increasing resistance to stress modulus, tension, and deformation, improving the biomechanical characteristics of tendons [10-12].

Synthetic membranes, such as silk, or natural membranes, such as amnion, have the primary function of providing a structural framework. Amnion, a connective membrane associated with the placenta, has anti-inflammatory and antimicrobial properties and low antigenicity when decellularised, and amniotic membrane fragments used in injured tendons also showed better organization of type I collagen compared to the control group [13-15].

The use of specific blockers of inflammatory interleukins and their receptors is already a reality in the treatment of cancers such as some types of melanomas and the treatment of autoimmune joint diseases such as rheumatoid arthritis [16].

In this way, CT and MA have complementary therapeutic characteristics, influencing cell differentiation and the formation of a specialized matrix. Therefore, their association could be an alternative for the treatment of chronic lesions with fibrotic characteristics, such as tendinopathies, whose current treatment has a high failure rate.

Therefore, this study aimed to assess the occurrence of synergy in the response to the use of CT associated with MA in the treatment of Achilles tendinopathy induced in rats.

MATERIALS AND METHODS

Following the approval of the Ethics Committee of the Victor Ferreira do Amaral Maternity Hospital (Registration 01238) and the Ethics Committee for the Use of Animals of the Pontifical Catholic University of Paraná (CEUA-Pr 01637), and under international animal welfare standards (*ARRIVE* guidelines), placentas were collected from two parturients and 40 male Wistar rats, weighing an average of 350 g, were used.

The animals were randomized into four groups according to the treatment to be received in the same procedure:

- SC group (bone marrow mononuclear stem cells), n=10 animals;
- AM group (amniotic membrane), n = 10 animals;
- SC + AM group (stem cells + amniotic membrane), n=10 animals;
- C group (control, 0.9% saline solution), n=10 animals.

The rats were anesthetized intraperitoneally with 5% ketamine hydrochloride (Vetanarcolâ, König do Brasil Ltda.) at a dose of 80mg/Kg combined with 2% xylazine hydrochloride (Rompunâ, Bayer S.A, Brazil) at a dose of 10mg/Kg and after anesthesia had been achieved, verified by pupillary reflex and muscle relaxation, trichotomy, and surgery were performed.

For the rats in the SC and SC + AM groups, the procedure began with the collection of 3 ml of blood from their iliac crests for the preparation and isolation of stem cells according to the technique described by Boyum, of separation by density gradient using Iscove's Modified Dulbecco's Media (IMDM), 4% buffer solution and 1% antibiotic (penicillin and streptomycin) and density gradient separation solution (d: 1.077, Ficoll-Hypaque) [17].

All the rats underwent skin incisions on the Achilles' tendons and tenotomy in their middle third, threaded with polypropylene 5-0 suture wire (Polipropypoint Point Suture, Brazil).

Figure 18 Achilles tendon after tenotomy and suturing

For the animals in the AM and AM + SC groups, after suturing the Achilles lesion with polypropylene 5-0 suture wire, a decellularised amniotic membrane was adapted and sutured along its edges to the tendon using four stitches at its ends, also with

polypropylene 5-0 suture wire.

The fresh amniotic membrane (AM) was obtained after cesarean deliveries and prepared as proposed by Riau et al, with the clots cleaned with phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2 (Gibco®), containing 100 u/ml penicillin and streptomycin and for the decellularisation process (removal of amniotic epithelial cells), the membranes were removed from the PBS medium using an aseptic technique in a BioSAFE class II biological safety cabinet (Veco®) and treated with a 0.01% sodium duodecyl sulfate (SDS) solution and 0.01% sodium deoxycholate (SD) for 24 hours at 37°C, using a mechanical stirrer (shaker table 109 M, Nova Ética Ltda.). They were then preserved in PBS at 4° Celsius, according to the methodology described by Hopper [18,19].

Figure 19 Aspect of the amniotic membrane at the time of the experiment

All the animals underwent skin suturing with polypropylene 5-0 suture wire, after which the animals in the CT and CT + MA groups were percutaneously infiltrated with stem cells in the Achilles peritendon, and the animals in group C were percutaneously infiltrated with 2 ml of 0.9% saline solution.

Figure 20 Percutaneous application of stem cells

Four weeks after inducing the injury, the animals were euthanized according to the anesthesia protocol described above, and the tendons were resected and sent for collagen and immunohistochemical evaluation.

Figure 21 Per-operative image of the tendon Figure 22 Tendon after resection

Histological sections were mounted for *Picrosirius Red* staining to specifically characterize collagen fibers type I (green) and type III (red).

The immunohistochemistry technique was used to identify the immunoexpression of interleukin-4 (IL-4, PAS-25165, 1:200, Thermo Fisher Scientific AB_2542665), interleukin-6 (IL-6, MP5-2OF3, Thermo Fisher Scientific, AB_469216) and interleukin-33 (IL-33, P130-E, 1:600, Thermo Fischer Scientific, AB_223471ABclonal, Manhattan Beach, CA).

The slides were immunolabelled with anti-IL-4, anti-IL-6, and anti-IL-13 and then scanned using the Axio Scan.Z1 slide scanner (Zeiss, Jena, Germany) and submitted to high magnification field imaging (CGA) using the ZEN Blue Edition software (Zeiss, Jena, Germany). From each CGA, the areas of immunoexpression were measured using Image Pro-Plus software version 4.5 (Media Cybernetics, Rockville, MD), using a semi-automated color segmentation method, in which the area of tissue immunoexpression for each biomarker was artificially delimited and quantified.

Subsequently, its value, expressed in square micrometers (μm^2) was divided by the value of its respective total tissue area and finally transformed into a percentage value. Finally, the arithmetic mean values of the CGA of each sample were calculated, so that their results were organized in Excell® spreadsheets and analyzed using the IBM SPSS Statistics v.29.0 computer program.

The results were described by mean, standard deviation, median, minimum, and maximum. The Kruskal-Wallis non-parametric test and Dunn's *post-hoc* tests were used to compare the groups in relation to the quantitative variables. The correlation between two quantitative variables was analyzed by estimating Spearman's correlation coefficients and assessing their significance. The normality of the continuous variables was assessed

using the Shapiro-Wilk test. Values of $p < 0.05$ indicated statistical significance. For multiple comparisons, p-values were corrected by Bonferroni.

RESULTS

Of the 40 animals, three died after the tenotomy and tenorrhaphy procedure, two in the AM + SC group and one in the control group. Data from 37 rats were available for final analysis, broken down as follows: CT group $n = 10$, MA group $n = 10$, MA + CT group $n = 8$ and control group $n = 9$.

For the histological assessment of type I and III collagen fibers, the statistical analysis is shown in the tables and graphs below, and we found no significant differences between the groups.

For the histological assessment of type I and III collagen fibers, *Sirius Red* staining was carried out, in which type I collagen stains green under illumination and type III collagen stains red.

The figures below show the variation in collagen composition between the samples.

Figure 23 Sirius Red stained slides, showing variation in the ratio between type I and III collagen fibers, with a predominance of type I collagen

Figure 24 Sirius Red stained slides, showing variation in the ratio between type I and III collagen fibers, with a small amount of type I collagen

Figure 25 Sirius Red stained slides, showing variation in the ratio between type I and III collagen fibers, with predominance of type III collagen

The slides were submitted to an automated process to assess the percentage of type I collagen fibers and the percentage of type III collagen fibers, resulting in the values tabulated below.

Table 6 Kruskal-Wallis test for statistical analysis of the percentage of type I and III collagen in the groups

Thus, there was no statistically significant difference in the presence of type I and III collagen between the groups, as shown in the graphs below.

Graph-1 Distribution of Type I and Type III collagen among groups

The immunohistochemistry technique was used to identify the immunoexpression of IL-6, IL-4 and IL-13, but due to the loss of samples (slides in which the immunohistochemical staining was not fixed and therefore could not be analyzed), the final n for each group was broken down as follows:

Table 7 Final n of each group for the immunohistochemical staining

The photos below illustrate the reading of the slides and the strength of the tissue reaction caused by the antibodies.

Figure 26 Slide with weak reaction for IL-4

Figure 27 Slide with strong reaction for IL-4

Figure 28 Slide with weak reaction for IL-6

Figure 29 Slide with strong reaction for IL-6

Figure 30 Slide with weak reaction for IL-13

Figure 31 Slide with strong reaction for IL-13

Photographs were generated from each slide and read automatically, generating the average area stained by the immunohistochemical reaction, resulting in the values tabulated below and explained in the subsequent graphs.

Table 8 Results of the presence of interleukins among the groups
Graph 2 - Distribution of the percentage of IL-6 among the groups
Graph 3 - Distribution of the percentage of IL-13 among the groups
Graph 4 - Distribution of the percentage of IL-4 among the groups

Significant differences were found between the groups for IL-13 and IL-4. Therefore, the groups were compared two by two, as shown in the tables below, which present the p-values of these comparisons.

Table 9 Comparison of percentage of IL-4 and IL-13 between groups Dunn's test, $p < 0.05$*

From the results above, the groups that showed statistically significant differences are shown in the graphs below.

Graph 5 Statistical difference in the presence of IL-13 between the CT + MA and C groups
Graph 6 Statistical difference in the presence of IL-4 between the CT + MA and C groups

Finally, we carried out a statistical analysis of the correlation between variables, and the table below shows the estimated Spearman correlation coefficients and the p-values of the statistical tests for the data with significance.

Table 10 Correlation between variables with a significant difference (r): Spearman's correlation coefficient

The correlation coefficient between IL-4 and IL-13 and Collagen I is negative (-0.65 and -0.35 respectively), showing an inverse correlation between these two variables as shown in the scatter plots below.

Graph 7 Scatter plot showing an inverse correlation between Col. type I and IL-4
Graph 8 Scatter plot showing an inverse correlation between Col. type I and IL-13

The correlation coefficient between type III collagen and IL-13 and type III collagen and IL-4 is positive (0.35 and 0.65 respectively), showing a direct correlation between these two variables, as shown in the scatter diagrams below.

Graph 2 Scatter plot showing a direct correlation between Col. type III and IL-4
Graph 10 Scatter plot showing a direct correlation between Col. type III and IL-13

DISCUSSION

According to the data presented above, in this study there was no significant difference between the groups at the end of four weeks of treatment for the histological variable of the presence of type I and III collagen, assessed by *Sirius-red*, nor was there any difference between the groups for the presence of IL-6.

For the histological assessment of type I and III collagen fibers, the average value per group for type I collagen ranged from 80.3 to 88.4 and type III collagen from 11.6 to 19.7. Thus, all the groups had a cellular matrix structure with more than 80% type I collagen fibers.

The absence of statistical differences for the presence of IL-6 in the groups at the end of four weeks may be related to the fact that it is an acute phase cytokine, so its

correlation with collagen formation and tenocyte activity would be present in the first days of the injury [21].

In terms of time, it seems that IL-6 peaks are seen in tendon injuries between 3 days after injury and up to two weeks. Its elevated permanence for longer periods is associated with extracellular matrix dysfunction by chronically generating a positive feedback loop with interferon-gamma (IFN-g), the extracellular matrix-degrading interleukin [22-27].

Regarding the late-phase cytokines, IL-4 and IL-13, both showed significant differences between the groups and were present in higher concentrations in the SC + AM group than in the control group [28].

IL-4 is a late cytokine that provides negative feedback to IL-6 and controls the initial inflammatory process, leading to effective tissue repair. The fact that IL-4 was significantly increased in the SC + AM group suggests that repair is facilitated in this group [29].

IL-13 is also a late cytokine and closely related to IL-4 since it is activated by it. It promotes tissue remodeling and collagen production by fibroblasts, a trend confirmed in this study. Following IL-4, IL-13 was also significantly increased in the SC + AM group, also inferring facilitated repair, as both interleukins correlate positively with the presence of type III collagen (the first to form in the tissue repair process) [30].

The fact that there were no histological differences between the groups does not necessarily represent homogeneity, but probably a snapshot of a moment when the repair process had not yet evolved enough to show morphologically visible differences. At the time the study was carried out, there were differences between the inflammatory markers, and it is likely that if we were to continue the study and carry out a histological assessment after a longer period of time, we would find differences.

This is also corroborated by a previous study by our group, in which we assessed the biomechanical strength and histology of Achilles tendons in rats treated for tendinopathy with stem cells and platelet-rich plasma, and even though we didn't find any histological changes or changes in the presence of type I and III collagen between the groups, the group treated with platelet-rich plasma showed a better biomechanical parameter, indicating the existence of molecular mechanisms involved in the process [31].

In the tendon healing process, IL-4 acts as a signal for IL-13, an effector cytokine that stimulates fibroblast production, initially increasing the production of type III collagen, which over time can mature into type I collagen, further organizing the extracellular matrix, a correlation proven in this study.

In the process of tissue repair, the amniotic membrane itself provides a collagenous support framework and facilitates the adhesion of growth factors, promoting healing in various types of lesions, such as corneal lesions, venous ulcers, skin burns and the membrane associated with the use of mesenchymal stem cells has already proved effective in healing total skin defects in rats, a fact that encouraged us to look for this association in the treatment of tendon lesions [32-34].

Continuing to study inflammatory pathways is a potential alternative for specific and effective treatment of inflammatory and chronic pathologies. We hope that elucidating these pathways can define specific treatment targets, just as blocking IL-21 is effective in controlling Rheumatoid Arthritis [35].

CONCLUSION

The molecular mechanisms involved in the pathogenesis of tendinopathies show early changes in relation to histological or morphological alterations, but are a promising target for treating these pathologies, as is already the case for other diseases such as rheumatoid arthritis.

In chronic tendonitis, low levels of IL-4 and IL-13 show an uncontrolled inflammatory process and therefore a lack of repair towards normal tissue, but rats treated with stem cells and amniotic membrane have higher levels of IL-4 and IL-13, showing an immunohistochemical profile favourable to recovery and demonstrating possible treatment strategies.