

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
MARIA HELENA COSTA VIEIRA**

**EFEITO DA TERAPIA CELULAR COM CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS NO TRATAMENTO DA RUPTURA AGUDA DO
TENDÃO DE AQUILES EM HUMANOS**

**CAMPO GRANDE
2020**

MARIA HELENA COSTA VIEIRA

**EFEITO DA TERAPIA CELULAR COM CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS NO TRATAMENTO DA RUPTURA AGUDA DO TENDÃO DE
AQUILES EM HUMANOS**

**Tese apresentada ao programa de Pós-
graduação em Saúde e Desenvolvimento
na Região Centro-Oeste da Universidade
Federal de Mato Grosso do Sul, para
obtenção do título de Doutor.**

**Orientadora: Profa. Dra. Andréia Conceição Milan Brochado Antoniolli da
Silva**

CAMPO GRANDE

2020

FOLHA DE APROVAÇÃO

MARIA HELENA COSTA VIEIRA

EFEITO DA TERAPIA CELULAR COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS NO TRATAMENTO DA RUPTURA AGUDA DO TENDÃO DE AQUILES EM HUMANOS

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação
em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-
Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do
Sul, para obtenção do título de Doutor.

Resultado _____ **Campo Grande (MS),** _____ **de 2020.**

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Andréia Conceição Milan Brochado Antonioli da Silva
Instituição: FAMED – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Prof. Dr. Roberto Antonioli da Silva
Instituição: FAMED - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Profa. Dra. Larissa Correa Hermeto
Instituição: FAMEZ - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Profa. Dra. Renata Trentin Perdomo
Instituição: FACFAN - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Profa. Dr. Filipe Abdalla dos Reis
Instituição: BYOFISIO

Prof.a Dra. Christianne de Faria Coelho Ravagnani (Suplente)
Instituição: FAED - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

DEDICATÓRIA

Aos meus pais por terem sempre me incentivado nos estudos;

Ao Prof. Dr. Aurélio Ferreira por ter me encorajado a continuar.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me mostrar sempre que para tudo na vida há um tempo;

A Profa. Dra. Andréia Conceição Milan Brochado Antonioli da Silva, pela oportunidade única, pela busca incessante de métodos para melhorar a qualidade de vida de todos;

Ao Prof. Dr. Rodrigo Juliano de Oliveira, por me guiar em solo desconhecido.

A todos que contribuíram para que este trabalho pudesse se tornar realidade, em especial aos que trabalham no CETROGEN, à Tatyanne Ferreira da Silva e Laynna de Carvalho Schweich;

Ao meus amigos, por terem me ouvido, incansavelmente, falar sobre este tema.

A FUNDECT pelo apoio financeiro.

“O conhecimento científico é independente dos conhecimentos da fé que são imutáveis, a fé nos faz dizer creio, e a ciência, sei.”

Blaise Pascal

RESUMO

Vieira MHC. Efeito da terapia celular com células-tronco mesenquimais no tratamento da ruptura aguda do tendão de Aquiles em humanos. Campo Grande; 2020. [Tese – Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste].

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da terapia celular com células-tronco mesenquimais (CTM) no tratamento da ruptura aguda do tendão de Aquiles em humanos. Tratou-se de um estudo do tipo transversal onde foram selecionados 15 pacientes com ruptura aguda do tendão de Aquiles (até 72 horas do trauma). O diagnóstico foi realizado por meio de exame clínico e ultrassonográfico. Os pacientes foram divididos aleatoriamente em grupos de 5 sendo: grupo 1 - ruptura; grupo 2 – sutura; grupo 3 – ruptura + CTM. Houve diferença significativa entre os grupos experimentais em relação ao escore no AOFAS (teste ANOVA de uma via, $p=0,008$), sendo que este escore foi maior nos participantes do grupo ruptura + CTM, quando comparado com aquele entre os participantes do grupo ruptura (pós-teste de Tukey, $p<0,05$). No entanto, o escore no AOFAS observado entre os participantes do grupo ruptura + sutura não foi significativamente diferente daquele dos participantes do grupo ruptura apenas e nem daquele dos participantes do grupo ruptura + CTM (pós-teste de Tukey, $p>0,05$). Em relação ao escore ATRS, também houve diferença significativa entre os grupos experimentais (teste ANOVA de uma via, $p<0,001$), sendo que este escore foi maior nos participantes dos grupos ruptura + sutura e ruptura + CTM, quando comparado com aquele dos participantes do grupo ruptura (pós-teste de Tukey, $p<0,05$), porém, sem diferença significativa entre eles ($p>0,05$). Quanto ao escore na ultrassonografia, houve diferença significativa entre os grupos experimentais em relação a este escore (teste ANOVA de uma via, $p=0,042$), todavia, no teste de múltiplas comparações, comparando dois grupos de cada vez, não foi possível observar diferença significativa entre eles (pós-teste de Tukey, $p>0,05$). Pode-se concluir que a utilização de CTM nas rupturas agudas do tendão de Aquiles em humanos possa ser opção de tratamento pela regeneração tecidual e recuperação significativa da função sendo atletas os principais beneficiados.

Palavras-chave: tendão, tendão de Aquiles, lesão, terapia celular, células-tronco, regeneração.

ABSTRACT

Vieira MHC. Effect of cell therapy with mesenchymal stem cells in the treatment of acute Achilles tendon rupture in humans. Campo Grande; 2020. [Tese – Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste].

The objective of this study was to evaluate the effect of cell therapy with mesenchymal stem cells (MSC) in the treatment of acute Achilles tendon rupture in humans. It was a cross-sectional study in which 15 patients with acute Achilles tendon rupture (up to 72 hours after the trauma) were selected. The diagnosis was made through clinical and ultrasound examination. The patients were randomly divided into groups of 5, being: group 1 - rupture; group 2 - suture; group 3 - rupture + MSC. There was a significant difference between the experimental groups in relation to the AOFAS score (one-way ANOVA test, $p = 0.008$), and this score was higher in the participants in the rupture + CTM group, when compared with that among the participants in the rupture group (Tukey post-test, $p < 0.05$). However, the AOFAS score observed among the participants in the rupture + suture group was not significantly different from that of the participants in the rupture group only, nor that of the participants in the rupture + CTM group (Tukey's post-test, $p > 0.05$). Regarding the ATRS score, there was also a significant difference between the experimental groups (one-way ANOVA test, $p < 0.001$), and this score was higher in the participants in the rupture + suture and rupture + MSC groups, when compared with that of the participants in the rupture group (Tukey's post-test, $p < 0.05$), however, with no significant difference between them ($p > 0.05$). As for the score on ultrasound, there was a significant difference between the experimental groups in relation to this score (one-way ANOVA test, $p = 0.042$), however, in the multiple comparison test, comparing two groups at a time, it was not possible to observe a difference significant among them (Tukey's post-test, $p > 0.05$). It can be concluded that the use of MSCs in acute Achilles tendon ruptures in humans may be a treatment option for tissue regeneration and significant recovery of function, with athletes being the main beneficiaries.

Key-words: tendon, Achilles tendon, injury, cell therapy, stem cells, regeneration.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados da comparação entre os grupos experimentais em relação à idade, sexo, lado de lesão do tendão e avaliação do tendão por meio dos escores AOFAS, ATRS BrP e na ultrassonografia

..... 39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação gráfica da organização da estrutura tendínea.....	16
Figura 2 – (a) Dimensões e (b) Suprimento sanguíneo do tendão de Aquiles.....	17
Figura 3 – Esquema do suprimento sanguíneo do tendão de Aquiles.....	18
Figura 4 – Configurações de sutura durante o repado do tendão de Aquiles: Ma & Griffiths, Webb & Bannister, Carmont & Maffulli e a cadia de sutura produzida com o gabarito de Achillon jig. (CARMONT <i>et al</i> , 2011).....	20
Figura 5 – Gabarito Achillon® (Integra Life Sciences Corporation).....	20
Figura 6 – Bota imobilizadora longa e calço.....	31
Figura 7 – Extração da gordura.....	32
Figura 8 – Incisões pela técnica de Webb & Bannister.....	32
Figura 9 – Técnica cirúrgica.....	33
Figura 10 – Fluxograma das etapas de cultivo das CTM.....	34
Figura 11 – A) Seringa com a diluição de CTM + solução fisiológica pronta para aplicação B) Aplicação das CTM na área de ruptura do tendão.....	37
Figura 12 – Gráfico representando o escore na escala AOFAS em cada grupo experimental.....	40
Figura 13 – Gráfico representando o escore na escala ATRS BrP em cada grupo experimental.....	41
Figura 14 – Gráfico representando o escore na ultrassonografia em cada grupo experimental.....	42

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AOFAS	American Orthopaedic Foot and Ankle Society
AST	Área de Secção Transversa
ATRS BrP	Brazilian Portuguese version of the Achilles Tendon Rupture Score
CT	células-tronco
CTA	células-tronco adultas
CTE	células-tronco embrionárias
CTH	células-tronco hematopoiéticas
CTM	células-tronco mesenquimais
CTP	células tronco pluripotentes
DNA	ácido desoxirribonucleico
FCFb	fator de crescimento de fibroblastos básico
IGF-1	fator de crescimento semelhante à insulina – 1
MEC	matrix extracelular
MO	medula óssea
PDGF	fator de crescimento derivado de plaquetas
RNA	ácido ribonucleico
TA	tecido adiposo
TDSCs	células-tronco derivada dos tendões
TFG- β	fator de transformação do crescimento - β
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE SÍMBOLOS

cm	centímetros
ml	mililitro
N	newton
rpm	rotação por minuto

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1 Os tendões.....	15
2.2 O tendão de Aquiles	17
2.3 Cicatrização tendínea.....	21
2.3.1 <u>Fases da cicatrização tendínea.....</u>	21
2.3.1.1 fase inflamatória.....	21
2.3.1.2 fase de proliferação.....	21
2.3.1.3 fase de remodelação.....	22
2.3.2 <u>Controle da cicatrização dos tendões.....</u>	22
2.4 Células-tronco.....	24
2.4.1 <u>Células-tronco e idade.....</u>	26
2.5 Sistemas de classificação.....	27
3 OBJETIVOS.....	29
4 METODOLOGIA.....	29
5 RESULTADOS.....	38
6 DISCUSSÃO.....	43
7 CONCLUSÃO.....	46
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
ANEXOS.....	61

1 INTRODUÇÃO

A ruptura tendínea é uma injúria aguda de etiologia desconhecida apesar do conhecimento aprimorado sobre sua estrutura e a função. Tendinopatia degenerativa é o achado histológico mais comum nas rupturas espontâneas com o surgimento de células lipídicas, degeneração mucóide, calcificação tendínea ou a combinação destes fatores. (VAILAS *et al*, 1978; ROSENBAUN *et al*, 2010). Em alguns casos, o tendão não pode ser reparado o que requer restituição parcial ou total. Se não tratadas, as lesões podem levar a perda da função muscular e incapacidade laborativa significativa, o que pode afetar a qualidade de vida do paciente. (THEIN *et al*, 2004).

Desde sua primeira descrição por Ambroise Paré em 1575 e reportado na literatura em 1633, a ruptura do tendão de Aquiles tem recebido cada vez mais atenção com relação ao seu tratamento. Essa atenção é baseada no fato de que sua ruptura é uma lesão grave e uma das mais comuns afetando cerca de 6 a 18 por 100.000 habitantes por ano. (SMITH, 1965)

As rupturas do tendão de Aquiles são lesões comuns em pacientes jovens e responde por 35% de todas as lesões tendíneas. Mais de 75% das lesões ocorrem durante a participação em atividades esportivas (BESKIN *et al*, 1987; J'OZSA *et al*, 1989) e apenas 50-60% dos esportistas de elite retornam aos níveis anteriores à lesão após a ruptura (LEPPILAHTI *et al*, 1998).

Geralmente resultam de lesões indiretas ocasionadas por mecanismos que incluem tração forçada do pé com o joelho em extensão, dorsiflexão súbita e inesperada do tornozelo, ou dorsiflexão violenta com o pé em flexão plantar. O mecanismo de aceleração/ desaceleração é relatado em mais de 90% das lesões no esporte. Os fatores adicionais implicados nas rupturas incluem microtraumas de repetição, hipóxia e degeneração mucóide, diminuição da perfusão resultante de mudanças degenerativas e administração sistemática ou infiltração local de corticosteroides. (SOLDATIS *et al*, 1997; FOX *et al*, 1975; KANNUS; J'OZSA, 1991; LAGERGREN; LINDHOLM, 1959; MAHLER; FRITSCHY, 1992). Apesar da atenção para o tratamento cirúrgico das rupturas, a decisão em tratar essas lesões cirurgicamente ou não permanece controversa. (ASSAL *et al*, 2002; BHANDARI *et al*, 2002; JAAKKOLA *et al*, 2001; KHAN *et al*, 2005)

O tratamento não cirúrgico historicamente está associado a um alto risco de reruptura, variando de 13 a 30%, atrofia da musculatura da perna, mas com a vantagem de não apresentar complicações da ferida cirúrgica. O tratamento cirúrgico das rupturas

do tendão de Aquiles resulta em menor porcentagem de reruptura (0 a 6%), mobilização precoce e melhor retorno ao esporte, mas com o risco das complicações da ferida (0 a 21%). (AMLANG *et al*, 2005; BESKIN *et al*, 1987; CRETNIK *et al*, 2004; HAJI *et al*, 2004; MORTENSEN; PEDERSEN, 1990; RICHARDSON *et al*, 2003) Entretanto, na metanálise de Soroceanu *et al* (2012) conclui-se que o tratamento conservador deve ser considerado em centros que dispõem de reabilitação funcional precoce.

Estudos mostram que o tecido tendíneo cicatrizado apresenta uma densidade celular alta e diminuição da organização do colágeno em comparação ao tecido pré-lesionado. Esta organização celular alterada serve como uma base para resultados ruins como reruptura, aderências restritivas e baixa função após o tratamento de lacerações tendíneas. (KLEINERT *et al*, 1973; MORBERG *et al*, 1997; J'OZSA; KANNUS, 1997) Portanto, as opções de tratamento inovadoras para melhorar a cicatrização do tendão são de grande interesse.

Pesquisas atuais têm se concentrado em novas técnicas de terapia celular, incluindo o uso de células-tronco mesenquimais (CTM) e fatores de crescimento como métodos alternativos para reparo de diversos tecidos. (ZAIDI; NIXON, 2007; BRUDER *et al*, 1998; SMITH *et al*, 2003; DI *et al*, 2006; STREM *et al*, 2005; BOSNAKOVSKI *et al*, 2005; BAKSH *et al*, 2004; CAPLAN, 2005; GROVE *et al*, 2004; ZUK *et al*, 2004)

Há na literatura trabalhos em animais e humanos que avaliaram o efeito do uso de CTM no tratamento de patologias tendíneas (rupturas e tendinopatias) com resultados significativos (AHMAD *et al*, 2012; VIEIRA *et al*, 2014) mas nenhum deles avaliou a utilização das mesmas em rupturas do tendão de Aquiles em humanos sendo o objetivo deste trabalho. O que se espera é que pacientes não necessitem de procedimento cirúrgico ao sofrer ruptura do tendão e ainda sim apresentem força e capacidade laborativa similar a indivíduos sem lesão.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Os tendões

Os tendões são tecidos conjuntivos moles que consistem em fibras colágenas paralelas mergulhadas em uma matriz extracelular. Apresentam estrutura organizada e possibilitam a transmissão de forças entre os músculos e ossos. (LIN *et al*, 2004) Eles

surgem no mesênquima do broto do membro entre 6 e 8 semanas da vida fetal e se juntam aos músculos originados dos somitos. Contém inicialmente um grande número de células mas, com o desenvolvimento para vida adulta, estas diminuem e dão lugar aos elementos da matrix extracelular. Suas fibras colágenas tornam-se mais largas durante a maturação aumentando a espessura do tendão. Durante sua maturação, as organelas intracelulares responsáveis pela síntese proteica diminuem. (DAHNER, 2005; IPPOLITO *et al*, 1980).

Dentro do tendão existe uma hierarquia estrutural em que o mesmo é subdividido em fascículos, fibrilas, miofibrilas e tropocolágeno (Fig. 1), contém relativamente poucas células, com o tipo predominante sendo os fibroblastos em bastonete ou fuso. É composto por 20% de células e 80% de matrix extracelular (MEC). A estrutura celular apresenta 60-85% de colágeno, 0,2% de proteoglicanos, 2% de elastina e 4,5% de outras proteínas enquanto que a MEC é composta por 55-70% de água e o restante por proteoglicanos. (NAKAMURA *et al*, 2000; O'BRIEN, 2005) Os tendões deslizam sobre os ossos e geralmente se movem através de canais e bainhas que ajudam a direcionar seu caminho e limitam a quantidade de atrito que precisam superar. As bainhas consistem em duas camadas, entre as quais contém líquido sinovial que melhora a lubrificação. Os tendões que não possuem essa bainha de duas camadas são cercados por um tecido conjuntivo areolar frouxo chamado paratendão que atua para fornecer uma divisão e permitir o movimento livre do tendão em relação ao tecido circundante (J'OSZA; KANNUS, 1997).

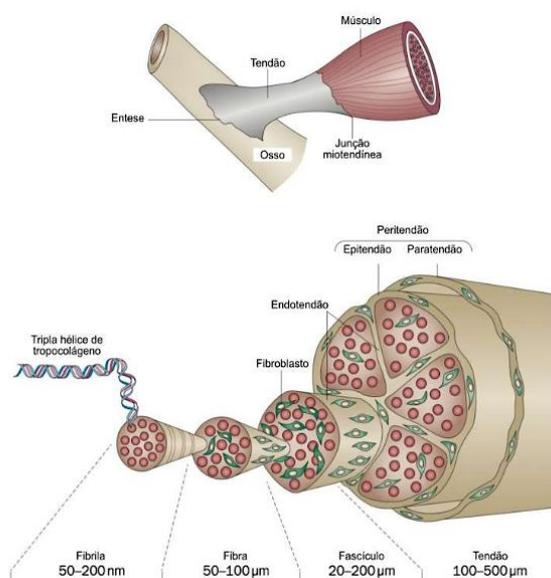


Figura 1. Representação gráfica da organização da estrutura tendínea. (NOURISSAT, 2015)

2.2 O tendão de Aquiles

É formado por fibras coalescentes dos músculos gastrocnêmio e sóleo. Este complexo fixa-se nas articulações do joelho e tornozelo, tornando-se mais susceptível a lesões do que músculos que se fixam em apenas uma articulação. É o tendão mais longo e forte do corpo, variando entre 12 e 15 cm de comprimento e é submetido a forças superiores a 10 vezes o peso corporal durante a corrida, experimentando mais de 7000N de força. (BURDETT, 1982; SCOTT; WINTER, 1990; CLAIN;BAXTER, 1992).

Seu suprimento sanguíneo é segmentar e derivado das artérias tibial posterior e fibular. Três territórios vasculares foram identificados, sendo a porção média suprida pela artéria fibular (4-7cm da inserção no calcâneo) e os segmentos proximal (7cm da inserção até a junção músculotendínea) e distal (4cm acima da inserção no calcâneo) supridos pela artéria tibial posterior (figura 2). A porção média é marcadamente mais hipovascular do que o restante do tendão e essa área, entre 4 a 7 cm da sua inserção calcânea, corresponde ao local de maior ocorrência das rupturas e tendinites. (LANGERGREN; LINDHOLM, 1959; CARR; NORRIS,1989; CHEN *et al*, 2009)

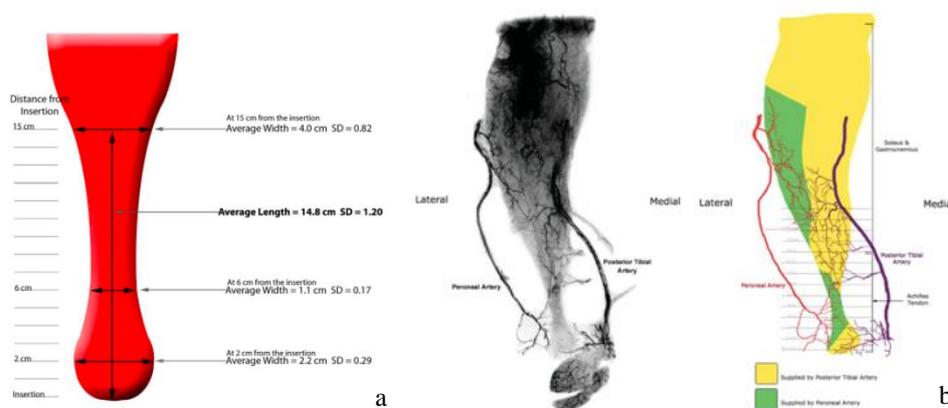


Figura 2 – (a) Dimensões e (b) Suprimento sanguíneo do tendão de Aquiles (CHEN *et al*, 2009)

O tendão de Aquiles é suprido principalmente pelas artérias de sua superfície anterior e profunda, com ramos que circundam ou passam transversalmente pelo tendão para obter acesso à sua superfície posterior. As artérias na superfície anterior do tendão de Aquiles são maiores e mais numerosas do que as artérias posteriores, o que contribui menos para o suprimento sanguíneo do tendão em todas as regiões, exceto para a inserção do tendão (figura 3).

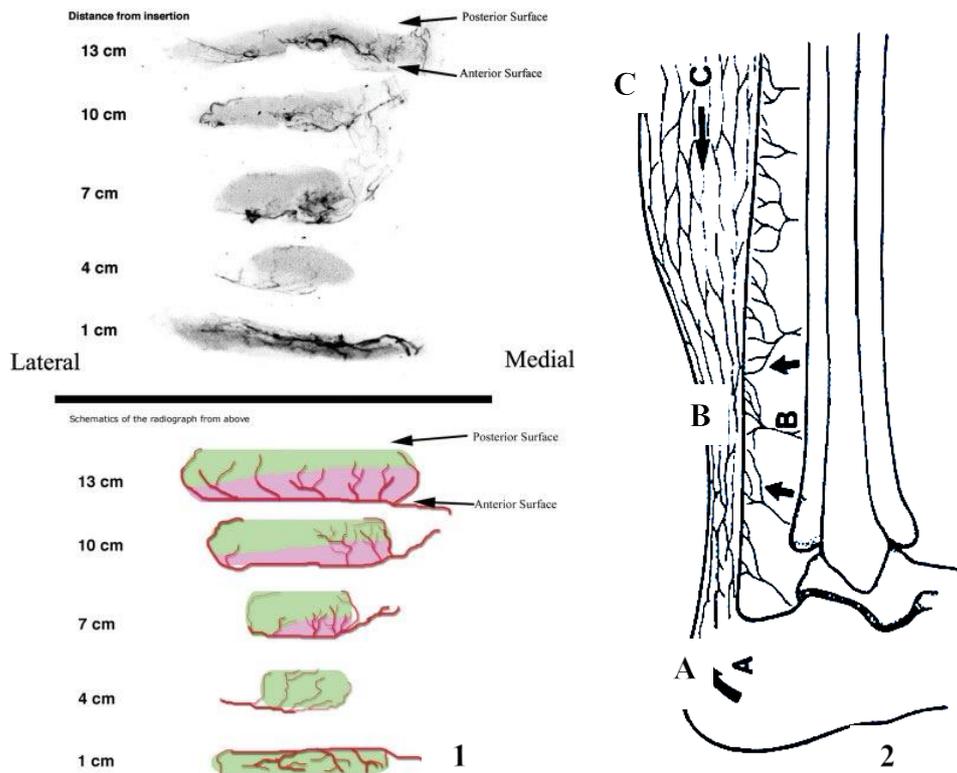


Figura 3. Esquema do suprimento sanguíneo do tendão de Aquiles. (1): A inserção (1 cm) é fornecida pelos vasos posteriores da artéria medial (artéria tibial posterior). A seção mediana (4 cm) é pouco suprida pelos vasos anteriores da artéria lateral (artéria peroneal). A seção proximal (7 a 10 cm) é suprida por grandes vasos anteriores da artéria medial (artéria tibial posterior). A aponeurose (13 cm) é suprida por grandes vasos anteriores da artéria medial (artéria tibial posterior). (2): suprimento sanguíneo da junção osteotendínea (A) do mesotendão (B), e da junção músculotendínea (C). (CARR; NORRIS, 1989; CHEN *et al*, 2009)

Uma camada de fáscia profunda cobrindo o tendão de Aquiles age como um canal para a entrada de vasos sanguíneos. Esses vasos então se espalham como uma fina rede de artérias para cobrir a superfície do tendão dentro da camada de paratendão. Este mostrou-se uma bainha do tendão vascular, envolvendo o tendão de tal maneira que a remoção do mesmo remove todo o suprimento vascular do tendão.

As artérias do tendão de Aquiles e do paratendão estão orientadas em três direções: longitudinal, transversal e profunda. Na maioria dos casos, os grandes ramos arteriais correm na superfície do tendão transversalmente, em uma direção perpendicular à direção das fibras do tendão. Esses grandes vasos transversais distribuem numerosos ramos que correm longitudinalmente ao longo das estrias

interfibrilares. Os vasos longitudinais também penetram profundamente no tendão entre suas fibras.

O padrão de suprimento arterial para o tendão de Aquiles é um padrão fractal progressivo, com cada artéria ramificada reproduzindo o padrão do vaso parental. As artérias se espalharam perpendicularmente uma à outra e se tornam progressivamente menores, com grandes artérias transversais ramificando-se em numerosos vasos longitudinais menores, que se dividem ainda mais em artérias transversais ainda menores. Esse padrão de ramificação permite que os vasos atingissem todas as áreas do tendão. (CHEN *et al*, 2009)

Fatores como microtraumas de repetição foram propostos para a patogênese da ruptura do tendão assim com o uso de fluorquinolonas, classe de antibiótico utilizada para tratamento de diversos tipos de infecções mas, o único estabelecido mecanismo que contribui para a degeneração do tendão é sua pobre vascularização (SMITH 1965; PUFÉ *et al*, 2005; FOROUTAN, 2019)

Devido ao suprimento sanguíneo descrito, diversos autores observaram maiores complicações como infecção profunda e necrose incisional nos pacientes submetidos a tratamento cirúrgico com grandes incisões comparados aos pacientes submetidos a procedimento por técnica minimamente invasiva (as extremidades do tendão podem ser vistas em oposição através da pequena incisão, embora as próprias suturas possam ser passadas por incisões em ambos os lados do tendão) ou percutânea (as extremidades do tendão podem não ser vistas diretamente, mas podem ser visualizadas por meio de ultrassom e endoscopia) apesar de não observarem diferença funcional. (DEL BUONO *et al*, 2014; BAUMFELD *et al*, 2018).

Uma série de configurações diferentes de sutura têm sido usadas para realizar reparos percutâneos e minimamente invasivos (figura 4).

A primeira técnica percutânea foi descrita por Ma & Griffith em 1977 (MA; GRIFFITH; 1977). O reparo consiste em uma sutura de Bunnel aplicada ao tendão proximal e uma sutura em caixa distalmente no coto inserida através de 6 incisões paratendinosas. Esta técnica desenvolveu uma reputação para lesões iatrogênicas do nervo sural, com uma taxa de 13% de envolvimento do nervo, embora ainda seja comumente usada (KLEIN *et al*; 1991). Webb e Bannister (1999) desenvolveram uma técnica percutânea, colocando as suturas na linha média ao invés do lado próximo ao nervo para evitar o risco de lesão iatrogênica. Dois pontos caixa de fio de nylon são inseridos através de três incisões transversas. Pela técnica com o gabarito Achillon (Integra Lifesciences

Corporation, EUA) suturas transtendíneas são colocadas através de orifícios direcionados em um gabarito entre as duas camadas da pele, paratendão e o tendão de Aquiles. Quando o gabarito é removido, as suturas de atravessamento do tendão permanecem dentro do paratendão e, portanto, podem ser amarradas dentro dele. (ASSAL *et al*; 2002). Claramente, há também o risco de lesão do nervo sural. (figura 4 e 5).

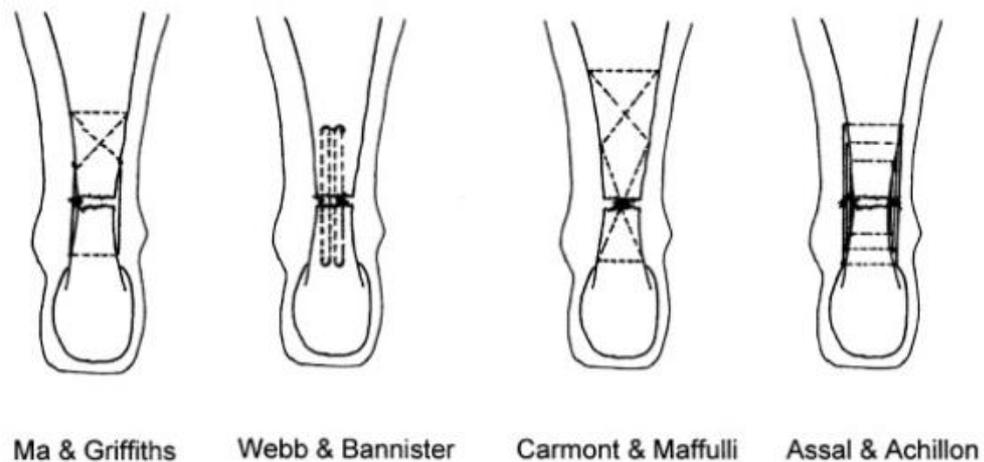


Figura 4 - Configurações de sutura durante o reparo do tendão de Aquiles: Ma & Griffiths, Webb & Bannister, Carmont & Maffulli e a caixa de sutura produzida com o gabarito de Achillon jig. (CARMONT *et al*, 2011).



Figura 5 – Gabarito Achillon®. (Integra LifeSciences Corporation)

2.3 Cicatrização tendínea

Os tendões são propensos a lesões agudas e crônicas por serem submetidos a movimentos repetitivos. Após a lesão, o corpo inicia um processo de cicatrização que pode ser dividido em fases as quais se sobrepõem e sua duração pode variar bastante devido à localização da lesão ou doença (GOMEZ, 1995; MONTGOMERY, 1989).

O processo de cicatrização resulta na formação de uma cicatriz fibrótica. As propriedades estruturais, organizacionais e mecânicas deste tecido cicatrizado são inferiores ao tendão normal e, independente do tempo, elas não retornam aos níveis normais de função (FRANK *et al*, 1983, 1992, 1997).

2.3.1 Fases da cicatrização tendínea

2.3.1.1 Fase inflamatória

Essa fase ocorre quase imediatamente após a lesão do tendão e se mantém por aproximadamente sete dias. Primeiro, a lesão nos vasos vasculares circundantes causa a formação de um hematoma. Em seguida, o coágulo e a hemostasia resultantes ativam uma cascata de vasodilatadores e plaquetas, bem como a liberação de substâncias químicas pró-inflamatórias dos mastócitos. As células inflamatórias são atraídas para o local da lesão e se envolvem agressivamente na fagocitose do tecido necrótico e detritos, além de quebrar o coágulo sanguíneo. Os macrófagos auxiliam no recrutamento de novos fibroblastos e na liberação de fatores promotores da angiogênese para iniciar o crescimento de redes capilares dentro da ferida (FENWICK *et al*, 2002; GELBERMAN *et al*, 1992). Durante essa fase, há um aumento no conteúdo de DNA, fibronectina, glicosaminoglicano, água e colágeno tipo III, que estabiliza coletivamente a matriz extracelular recém-formada (WOO *et al*, 2000a, b; J'OZSA; KANNUS, 1997; GOMEZ, 1995; MONTGOMERY, 1989; GRINNELL, 1984).

2.3.1.2 Fase de proliferação

Durante esta fase, a qual ocorre entre sete a 15 dias após a lesão, uma matriz desorganizada de tecido de granulação está presente no local da lesão.

Histologicamente, os tipos celulares predominantes são fibroblastos, juntamente com um número menor de macrófagos e mastócitos. As concentrações de ácido desoxirribonucleico (DNA) e colágeno do tipo III atingem seus valores máximos durante todo o processo reparador. Acredita-se que essas alterações ajudem na otimização da síntese de colágeno e na conversão gradual do colágeno tipo III em colágeno tipo I (GOMEZ, 1995; WOO; BUCKWALTER, 1988).

2.3.1.3 Fase de remodelação

Após 21 dias, as alterações no tecido cicatrizante podem ser vistas a olho nu, pois a cicatriz vermelha anterior agora fica rosada e translúcida, formando uma conexão entre as duas extremidades. Histologicamente, os fibroblastos diminuíram de tamanho e retardaram sua síntese matricial, e as fibras de colágeno começaram a se orientar longitudinalmente ao longo do longo eixo do tendão. À medida que a cicatriz entra em maturação, há um retorno notável da proporção de colágeno tipo III para tipo I, reticulação de colágeno e concentrações de glicosaminoglicano, água e DNA. (BUCKWALTER; HUNZIKER, 1996; GOMEZ, 1995; WOO; BUCKWALTER, 1988)

2.3.2 Controle da cicatrização dos tendões

Muitos fatores físicos e mediadores químicos iniciam, sustentam e até finalizam o complexo processo de cicatrização dos tendões. O processo inflamatório é iniciado pelo insulto ao tecido e resulta na ativação de cascatas vasculares e celulares interligadas. A vasoconstrição imediata é seguida por um período de vasodilatação que persiste pela fase inflamatória. A vasopermeabilidade aumentada causa a formação de edema tecidual e permite a liberação de exsudato para a formação de um coágulo de fibrina. O aumento da permeabilidade é mediado pela liberação de histamina, serotonina, bradicinina e prostaglandinas.

A resposta celular é controlada por fatores que podem induzir quimiotaxia e fatores que regulam a proliferação celular e a movimentação de proteínas. Um desses mediadores é o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), que é liberado pelas plaquetas danificadas. Demonstrou-se que o PDGF regula positivamente o ácido ribonucleico (RNA) mensageiro que codifica uma subunidade de integrin, a proteína de ligação celular (HARDWOOD *et al*, 1999). A fase proliferativa é caracterizada por

alterações celulares que resultam em fibroplasia e angiogênese. A fibroplasia é parcialmente controlada por fatores de crescimento e parcialmente influenciada pelos níveis de oxigênio e ácido láctico. Os fatores de crescimento, como o fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) e o fator de crescimento transformador- β (TGF- β), são liberados durante a fase inflamatória dos macrófagos, mas atuam durante a fase proliferativa. O processo de angiogênese é similarmente regulado por fatores de crescimento (PDGF, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento de fibroblastos básico (FCFb)). Foi demonstrado que a concentração de RNA mensageiro para o VEGF nas células no local da lesão é seis vezes a encontrada no epitélio normal. (BIDDER *et al*, 2000)

No entanto, em muitos estudos foi demonstrado que o tendão cicatrizado leva mais de um ano para aproximar mais de perto a força funcional do tecido não lesionado (BUCKWALTER; HUNZIKE, 1996; GOMES, 1995; WOO; BUCKWALTER, 1988). No trabalho realizado por Bruns *et al* (2000) observou-se que a força necessária para causar ruptura em 1 ano era apenas 57% da força necessária para romper um tendão normal.

Como os tendões não se recuperam bem os mecanismos de lesão e reparo dos mesmos foram estudados extensivamente tanto no cenário clínico quanto no experimental. Existem várias técnicas diferentes de sutura utilizadas clinicamente. Foi demonstrado que a força do reparo é diretamente proporcional ao número de fios que cruzam um local de reparo. Como resultado, muitas vezes é difícil restabelecer a continuidade das fibras de colágeno e restaurar a superfície deslizante do tendão. Portanto, uma combinação de muitos fatores deve ser equilibrada simultaneamente para obter um tendão funcionalmente curado.

Altos índices de reruptura estimularam a investigação de métodos para modular a cicatrização tendínea promovendo melhor reparo com mais consistência com a arquitetura original do tendão.

Em uma tentativa de entender melhor os mecanismos de cicatrização dos tendões e melhorar essas propriedades inferiores, pesquisadores investigaram uma ampla gama de fatores que afetam a lesão e o reparo do tendão, como nível de atividade, movimento após lesão, várias modalidades de lesões e diferentes localizações das mesmas. Além disso, muitos pesquisadores aplicaram conceitos de engenharia de tecidos para resolver esse problema, desde a criação de estruturas a partir de

biomateriais e células relevantes no tecido lesionado ou usando terapia genética e celular. (LIN *et al*, 2004).

2.4 Células-tronco (CT)

As células-tronco são as células-base de todos os órgãos e tecidos do corpo. Uma célula-tronco tem duas características definidoras: (i) a capacidade da auto-renovação indefinida de gerar mais células-tronco; e (ii) a capacidade de se diferenciar em um número de células filhas especializadas para desempenhar funções específicas (NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH, 2001; SMITH, 2006). Uma CT pode se dividir assimetricamente, caso em que uma das duas células-filhas mantém as características das CT, enquanto a outra é destinada à especialização em condições específicas (MORRISSON; KIMBLE, 2006). Pode se diferenciar em todos os tipos de células do corpo, enquanto uma CT multipotente pode se diferenciar ao longo de várias linhagens em muitos tipos diferentes de células (NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH, 2001). O potencial de autorenovação versus diferenciação é governado por sinais extracelulares acoplados a cascatas de sinalização intracelular (WATT; HOGAN, 2000). As informações que especificam o destino das CT são codificadas pela presença ou ausência de sinais, e também pelas combinações, localização, nível e tempo desses sinais.

Existem dois tipos principais de CT – embrionárias (CTE) e adultas (CTA) - que são classificados de acordo com sua origem e potencial de diferenciação.

As CTE são células totipotentes que pode ser derivadas da massa celular interna do blastocisto durante a gastrulação. CTE representam uma fonte potencial de células com capacidade de autorenovação e diferenciação praticamente ilimitada. A CTE é definida por sua capacidade de se expandir indefinidamente, se autorenovar e dar origem a células descendentes mais especializadas. (DONOVAN; GEARTHART, 2001)

O uso de CTE humanas para terapia clínica tem sido dificultado por preocupações éticas (WOOD, 2005). Em 2006, células com propriedades semelhantes às das CTE, denominadas células-tronco pluripotentes (CTP), foram criadas a partir de células somáticas especializadas (TAKAHASHI *et al*, 2007; TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006).

CTA (ou tecido-específicas) podem participar na regeneração de danos teciduais por meio da contribuição direta por diferenciação em fenótipos de células tecido-específicas, produção de matriz extracelular (MEC) e pela sua ação imunomodulatória.

Potencialmente, pela mesma importância, CTA derivadas de tecidos contribuem indiretamente para a cicatrização por meio da produção de proteínas bioativas como fatores de crescimento, fatores antiapoptóticos e agentes quimiotáticos. Estas proteínas secretadas têm o efeito na dinâmica celular, estimulação vascular e recrutamento de CT adicionais capazes de promover maior estímulo cicatricial. (NATHAN *et al*, 2003; BOSNAKOVSKI *et al*, 2005; BI *et al*, 2005; VISHNUBALAGI *et al*, 2004; JUNCOSA-MELVIN *et al*, 2006; STARNES *et al*, 2007)

A fonte mais comum de CTA é a medula óssea (MO) , que contém células-tronco hematopoiéticas (CTH) e células estromais da MO ou células-tronco mesenquimais (CTM) do estroma (TILL; McCULLOCH, 1961; HORWITZ *et al*, 2005; DOMINICI *et al*, 2006).

As CTH foram as primeiras CT a serem usadas com sucesso em terapias, particularmente no tratamento de doenças malignas do sangue e síndromes de imunodeficiência, mas não são capazes de dar origem a tecidos conjuntivos de suporte. As CTM, por outro lado, são um tipo de célula de interesse com potencial terapêutico para o tratamento de uma variedade de anormalidades musculoesqueléticas, doenças cardíacas e anormalidades imunológicas ((KORBLING; ESTROV, 2003).

As CTM da MO são as CTM mais amplamente estudadas porque são facilmente acessíveis em quantidades apropriadas para aplicações clínicas (CASTRO-MALASPINA *et al*, 1980; CAPLAN 1991; GRONTHOS *et al*, 2003). Essas células são clogênicas e demonstraram a capacidade de formar osso e cartilagem *in vivo* (PITTENGER *et al*, 1999; POUNTOS *et al*, 2006). Devido ao seu potencial de diferenciação, as CTM da MO têm sido utilizadas em várias fases da aplicação clínica, principalmente em ortopedia (HORWITZ *et al*, 2002; CHAMBERLAIN *et al*, 2004). Além da MO, também foram identificadas células semelhantes a CTM em muitos outros tecidos, incluindo tecido adiposo (TA), músculo, sangue periférico, pâncreas fetal e fígado (PROCKOP, 1997; BEYER; DA SILVA MEIRELLES, 2006; SETHE, 2006; DING *et al*, 2011). As CTM derivadas do TA exibem uma cinética de crescimento estável *in vitro* e exibem uma capacidade de diferenciação de várias linhagens (incluindo

osteogênese, condrogênese e adipogênese), semelhante à das CTM da MO (GRONTHOS *et al*, 2001; ZUK *et al*, 2001; IZADPANAHAH *et al*, 2006; LIU *et al*, 2007).

As CTM derivadas do TA são multipotentes, possuem alta resposta a estímulos ambientais distintos e são de fácil isolamento. (RICKERT *et al*, 2001; UYSAL; MIZUNO, 2009) Tipicamente são abundantes em ambos, no ser humano e animais e pode ser facilmente obtidas do subcutâneo de forma percutânea ou com técnicas de incisão limitadas (KATZ *et al*, 2005) o que as difere e as tornam vantajosas com relação aos procedimentos para coleta de MO o quais são muito invasivos, dolorosos com altas taxas de complicação (acima de 30%) e fornecem menor número de células. (STARNES *et al*, 2007)

Vishnubalaji *et al*.(2012) comparou a capacidade de diferenciação de CT derivadas da MO e do TA de humanos e concluiu que a colônia de células adiposas foi capaz de produzir um maior número de células em um mesmo espaço de tempo, mas que ambas as colônias teriam a mesma capacidade de diferenciação celular dependendo do local para onde são transportadas.

2.4.1 Células-tronco e idade

Um fator que deve ser levado em consideração quando se fala em terapia celular é a capacidade de regeneração da célula com a idade. Células-tronco tendíneas foram recentemente identificadas em tendões de várias espécies (BI *et al*, 2007; RUI *et al*, 2010). As CT isoladas de substâncias intermediárias de tendões de várias espécies, chamadas células-tronco derivadas de tendões (TDSCs), mostraram características padrão de CTM, com expressão de antígenos típicos da superfície da CTM, auto-renovação, formação de colônias, e potencial de diferenciação (RUI *et al*, 2010; LUI; CHAN, 2011; LUI, 2015). O microambiente em que as CT residem *in vivo* fornece sinais (receptores e fatores solúveis secretados para comunicação célula-célula, matriz extracelular, estresse oxidativo e vascularização) que as direcionam para metabolizar, auto-renovar, diferenciar ou permanecerem inativas. Tanto os déficits celulares intrínsecos quanto o microambiente envelhecido, juntamente com as alterações sistêmicas associadas aos sinais hormonais e metabólicos associados à idade, podem inibir ou alterar as funções das CT tendíneas, resultando em menor condicionamento

físico dessas células primitivas e, portanto, lesões mais frequentes e maus resultados do reparo tendíneo. (LUI; WONG, 2020)

Segundo Dressler *et al.* (2005), as CTM não perdem sua capacidade necessária para terapia celular de reparo com aumento da idade e, quando estocadas por um período de até 3 anos, continuam a promover reparo efetivo. Seu trabalho demonstra que, o microambiente é fator essencial para a função celular pois, mesmo sendo extraídas células de animais mais velhos, o meio de cultura influenciou seu potencial de replicação e função.

2.5 Sistemas de classificação

O uso de questionários relatados pelo paciente para estimar a capacidade funcional, dor e limitação nas atividades da vida diária é um importante desfecho para monitorar o progresso do tratamento em contextos clínicos e de pesquisa (NORONHA *et al.*, 2008).

Vários são os métodos de avaliação após tratamento de lesões musculoesqueléticas. Alguns destes incorporam variáveis clínicas subjetivas e objetivas em uma escala numérica. Outros incorporam apenas fatores subjetivos em escala não numérica, e alguns incluem fatores radiológicos e clínicos. Em alguns casos, pede-se aos pacientes que classifiquem seu próprio resultado do tratamento selecionando uma nota não numérica.

Um sistema de classificação padrão idealmente permite a comparação de resultados de diferentes métodos de tratamento em pacientes com o mesmo distúrbio. Ele também permite que o cirurgião acompanhe o progresso do paciente antes e em vários intervalos após um tratamento específico. (KITAOKA *et al.*, 1994)

Com esse objetivo, para avaliação e acompanhamento do tratamento das patologias tornozelo e pé e, especificamente do tendão de Aquiles, foram desenvolvidas a escala AOFAS (American Orthopaedic Foot and Ankle Society), o ATRS BrP (Brazilian Portuguese version of the Achilles Tendon Total Rupture Score) e a Pontuação de Reparo do Tendão de Aquiles. Esta última sendo avaliação ultrassonográfica.

A escala AOFAS (anexo I) é um questionário é composto por nove itens, distribuídos em três categorias: dor (40 pontos), aspectos funcionais (50 pontos), e alinhamento (10 pontos) totalizando 100 pontos. A pontuação total varia de 0 a 100,

com pontuações mais altas iguais a menos sintomas e limitações. Nenhum fator radiológico está incluso, sendo uma escala estritamente clínica. Ambos os fatores clínicos, subjetivos e objetivos a constituem. É dividida em quatro, sendo elas: (1) Escala do Tornozelo-Retropé (2) Escala do Mediopé (3) Escala da Metatarsfalângica-Interfalângica do hállux e (4) Escala da Metatarsfalângica-Interfalângica dos dedos menores. (KITAOKA *et al*, 1994)

O escore ATRS BrP (anexo II), é um questionário válido com alta reprodutibilidade e sensibilidade para medir o resultado após o tratamento em pacientes com ruptura total do tendão de Aquiles (HOPKINS, 2000). É autorreferido e composto por dez itens que refletem a opinião dos pacientes sobre seus sintomas, limitações nas atividades diárias e atividades físicas após uma ruptura completa do tendão de Aquiles. Ao final de cada pergunta, o paciente recebe uma escala de 0 a 10, onde 0 corresponde a mais sintomas e maiores limitações de atividade física, e 10 indica ausência de sintomas e limitações. A pontuação final é obtida pela soma das respostas para cada item variando de 0 a 100, com pontuações mais altas iguais a menos sintomas e limitações. (ZAMBELLI *et al*, 2016)

Na Pontuação de Reparo do Tendão de Aquiles (anexo III) os achados da ultrassonografia são avaliados com base na área de secção transversa (AST) e morfologia interna do tendão reparado. Esta última é avaliada mediante uso do sistema de classificação com referência ao sistema de classificação de Moller modificado. (MOLLER *et al*, 2002) São mensuradas áreas anecóicas de defeitos do tendão como textura de eco fibrilar descontínua, áreas hiperecóicas intratendíneas exibindo tecido cicatricial do reparo, continuidade de uma aparência fibrilar intratendinosa com alinhamento das fibras de colágeno ao longo do eixo longo do tendão reparado e reações peritendinosas. Os defeitos residuais do tendão anecóico são registrados da seguinte forma: 0% a <1%, 1% a <50% e 50% a 100%. A área hiperecóica intratendínea no local da ruptura é classificada em 0% a <25%, 25% a <50%, 50% a <75% e 75% a 100%. A continuidade de uma ecografia fibrilar interna do tendão é categorizada como completa, incompleta ou ausente. As reações peritendinosas, como edema e / ou derrame local, são categorizadas como presentes ou ausentes. São atribuídos pontos para cada parâmetro, com um máximo de 10 pontos indicando um tendão reparado. (HIRAMATSU *et al*, 2018)

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial terapêutico das CTM no reparo da ruptura aguda do tendão de Aquiles em humanos.

3.2 Objetivos específicos

a) Estudar o efeito do uso de CTM no reparo da ruptura aguda do tendão de Aquiles em humanos mediante avaliação por meio de exame clínico (utilização da escala AOFAS e ATRS BrP)

b) Estudar o efeito do uso de CTM no reparo da ruptura aguda do tendão de Aquiles em humanos mediante utilização de imagem por ultrassonografia do tornozelo.

4 METODOLOGIA

4.1 Preceitos éticos

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em seres humanos da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (CEP) parecer 2.257.789 (ANEXO IV), pela Comissão Nacional e Ética em Pesquisa (CONEP) parecer 2.296.516 CAAE 73178417.5.0000.0021 (ANEXO V), pelo Colegiado de Curso dos Cursos de Mestrado e Doutorado em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste código verificador 0734406 e código CRC 54D260C1 (ANEXO VI) e pelo Colegiado Executivo do Hospital Universitário “Maria Aparecida Pedrossian” da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (ANEXO VII)

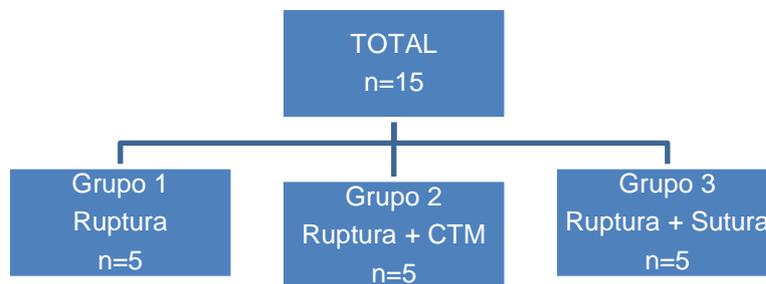
4.2 Amostra

Foram avaliados 15 pacientes adultos, de ambos os sexos, com idade superior a 18 anos, com história de ruptura aguda do tendão de Aquiles (máximo 72 horas do trauma) atendidos no pronto-atendimento do Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian (HUMAP). Os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – ANEXO VIII).

Os critérios de exclusão foram pacientes com história de ruptura prévia do tendão ou tempo de ruptura maior do que 72 horas.

4.2.1 Grupos de estudo

Os pacientes foram divididos aleatoriamente em três grupos de cinco, sendo:



Grupo 1 - pacientes com ruptura aguda do tendão submetidos a imobilização com bota imobilizadora longa (figura 4) com pé em flexão plantar de 20 graus (uso de calço no retropé) por seis semanas com apoio parcial (uso de muletas) e mais 4 semanas com bota imobilizadora longa com pé em posição neutra com apoio total.

Grupo 2 - pacientes com ruptura aguda do tendão de Aquiles submetidos à imobilização com bota imobilizadora longa com o pé em flexão plantar de 20 graus (uso de calço no retropé) por seis semanas com apoio parcial (uso de muletas) e injeção local de CTM em aproximadamente três semanas (tempo médio de cultivo celular). Após esse período o paciente permaneceu por mais 4 semanas com bota imobilizadora longa com pé em posição neutra com apoio total.

Grupo 3 - pacientes com ruptura aguda do tendão de Aquiles submetidos à sutura por técnica minimamente invasiva (WEBB; BANNISTER, 1999) e imobilização com bota imobilizadora longa com pé em equino de 20 graus (uso de

calço no retropé) por seis semanas com apoio parcial (uso de muletas) e mais 4 semanas com bota imobilizadora longa com pé em posição neutra com apoio total.



Figura 6 – Bota imobilizadora longa e calço

4.3 Procedimento anestésico

Para coleta do tecido adiposo foi realizada a sedação do paciente e para a tenorrafia do tendão de Aquiles foi realizada sedação associada à raquianestesia.

4.4 Procedimento cirúrgico

4.4.1 Coleta do Tecido Adiposo

O paciente foi posicionado em decúbito dorsal e, após assepsia e antissepsia do abdômen do mesmo, foi realizada incisão de aproximadamente 1cm com lâmina de bisturi nº. 11 para introdução das cânula de lipoaspiração próxima da crista ilíaca direita. A gordura foi extraída com a utilização de cânula de 4 mm conectada à seringa de 60ml (figura 5abc). A técnica utilizada para lipoaspiração foi a tumescente em que se realiza infiltração no subcutâneo com solução contendo 200ml de soro fisiológico 0,9% e 20ml de xilocaína 2% sem vasoconstrictor.

O material foi transportado em frasco estéril contendo solução de tampão fostato (phosphate-buffered saline, PBS) e antibiótico (figura 5d) até o laboratório imediatamente após a coleta. A pele foi suturada com fio de poliamida 3-0 e realizado curativo local compressivo com atadura de crepe de 30m circular.

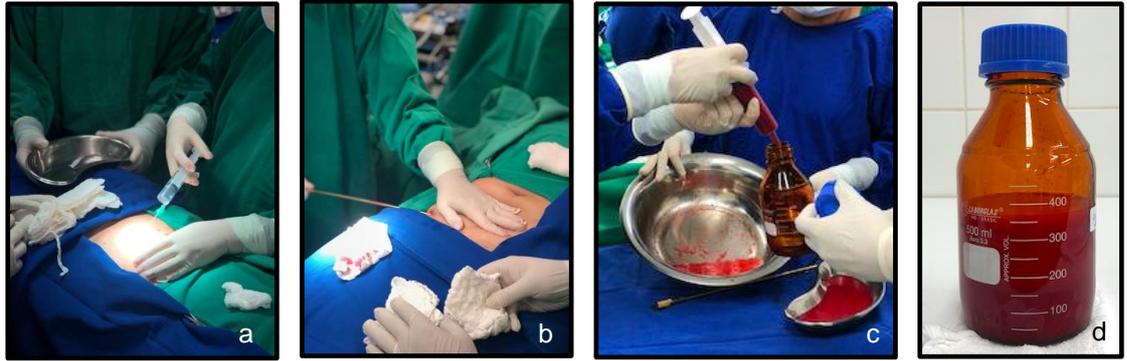


Figura 7 – Extração da gordura

4.4.2 Procedimento tendíneo

A técnica cirúrgica para tenorrafia do tendão de Aquiles utilizada neste trabalho foi uma modificação da técnica descrita por de Webb e Bannister (1999) na qual os pacientes foram colocados em posição pronada em mesa cirúrgica e as incisões na pele marcadas na face posterior do tendão de Aquiles. O primeira incisão foi feita no local da ruptura, o segundo 5 cm proximal a este e o terceiro 5 cm distal (figura 6). A incisão proximal é realizada sobre a metade medial do tendão de Aquiles para reduzir o risco de lesão no nervo sural à medida que se aproxima da linha média em seu curso proximal. O paratendão é incisionado transversalmente e com uma pinça hemostática os cotos do tendão são expostos.

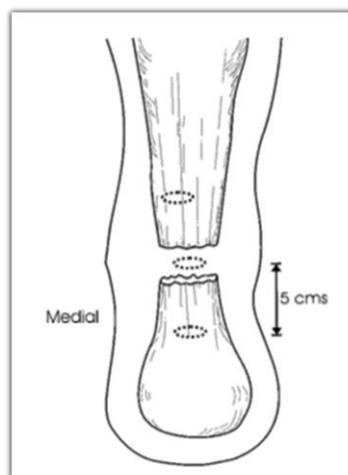


Figura 8 – Incisões pela técnica de Webb & Bannister (1999)

A sutura do tendão foi realizada pela técnica de *Krackow* (figura 7) com uso de fio de vicryl 2 e o fechamento da pele com o uso de fio de poliamida 3-0. Foi realizado curativo local e imobilização do membro como descrito acima.



Figura 9 – Técnica cirúrgica

4.5 Procedimento de coleta das CTM

Coletado o lipoaspirado o mesmo foi lavado extensivamente com tampão fosfato (*phosphate-buffered saline*, PBS), sendo centrifugado (200rpm/10 minutos) a cada lavagem. Para o processamento do lipoaspirado utilizou-se colagenase do tipo 1 para digestão da amostra como descrito por Markarian *et al* (2014), com modificações em que, para cada 10ml de gordura obtidas, 30ml de colagenase tipo 1 (Gibco®; CAT nº 17100; 250U/mg) diluída em PBS, foram utilizadas à 37^o C com agitação a cada 5 minutos por 30 minutos. A atividade enzimática foi neutralizada na mesma proporção de HDMEM (Meio DMEM de baixa glicose (Sigma®) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Gibco®), 2,5g de HEPES ácido livre (Sigma®) e 3,7g de bicarbonato de sódio). Foi realizada nova centrifugação (2000rpm/10 minutos) descartando-se posteriormente o sobrenadante e adicionado ao *pellet* o volume adequado (~10 a 50 ml) de solução de lise, (0,37g de EDTA; 8g de NH₄Cl; 0,84g de NaHCO₃; 100ml de água deionizada). Em seguida a solução foi homogeneizada e permaneceu por 10 minutos a temperatura ambiente com agitação a cada 5 minutos. Após nova centrifugação (1600rpm/5 minutos), o sobrenadante foi descartado e o *pellet* adquirido foi ressuspensionado em 3ml de meio de cultivo completo (HDMEM + 10% SBF + antibiótico e antimicótico) e semeado em um poço (placa de 6 poços) (figura 10).

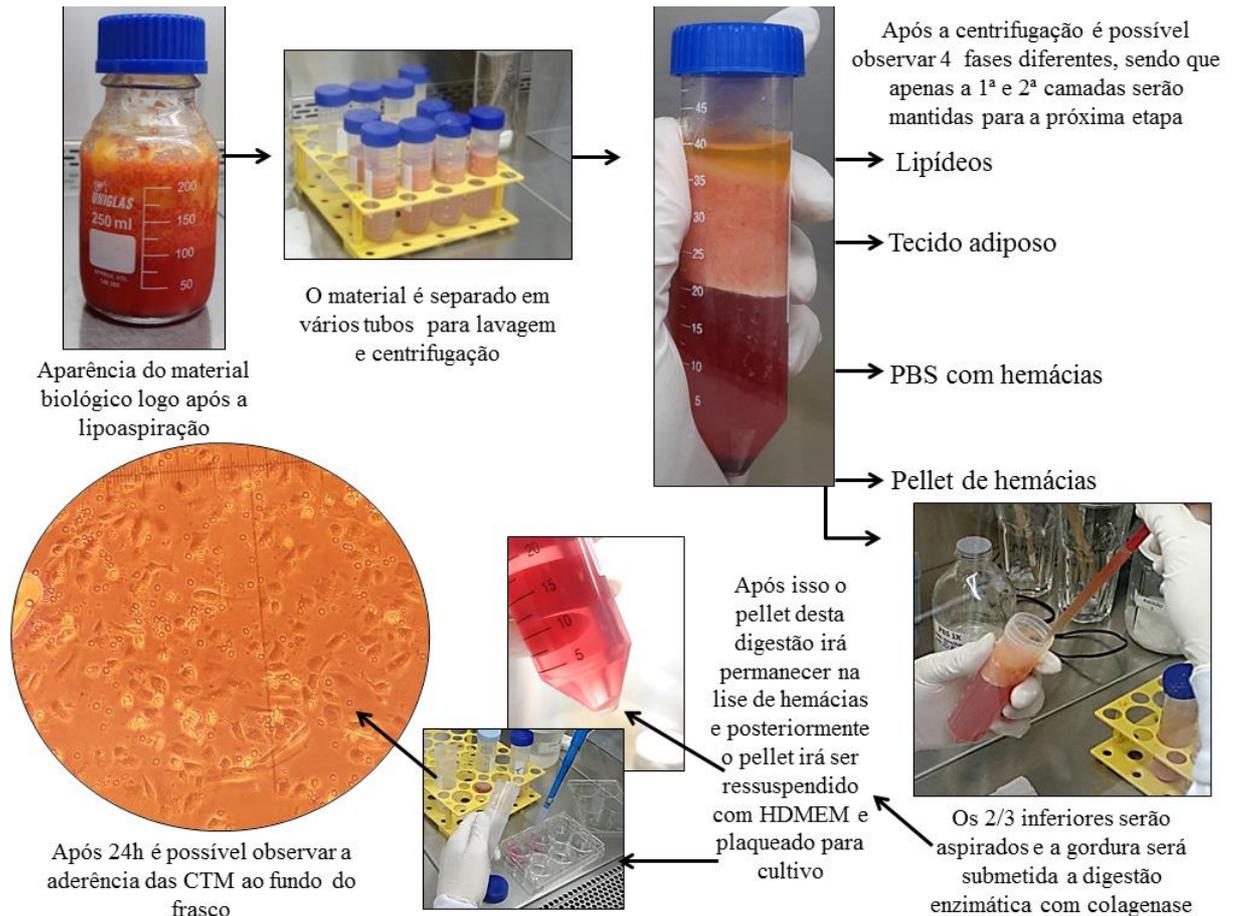


Figura 10 – Fluxograma das etapas de cultivo das CTM

4.6 Procedimento de cultivo de CTM

Após 24 horas da extração foi possível a confirmação da presença de CTM nas culturas. Nos 4 primeiros dias de cultivo as culturas eram lavadas 3x com 3 mL de PBS para a eliminação de células não aderentes e debris e novamente recebiam HDMEM suplementado a 10% SBF. No quinto dia as culturas foram tripsinizadas com 300 μ L de tripsina 0,25% sendo esta inativada com o mesmo volume de HDMEM. Em seguida, a solução foi centrifugada (1200 rpm/5min) e o *pellet* foi transferido para o frasco de cultivo celular de 25cm². A taxa de repique (1:2, 1:3, 1:4, etc.) foi determinada pela cinética da cultura; quanto mais rapidamente as células foram se expandindo, maior foi a taxa de repique. Este processo de repique foi repetido até que fosse atingida a quantidade de 4×10^6 células (\cong 21 dias). Entre os repiques uma alíquota de células foi reservada e

expandida em separado, afim de que, fossem realizados os ensaios de identificação e comprovação de pluripotência das CTM extraídas.

4.6.1 Identificação das CTM

A imunofenotipagem das células foi caracterizada por citometria de fluxo. Aproximadamente 2.0×10^5 CTM foram coletadas por tripsinização (1ml tripsina 0,25%, 3 min.), centrifugadas e incubadas durante 30 min a 4°C, com anticorpos, para os seguintes marcadores celulares: CD105, CD90, CD34 e CD133 (Pharmingen BD, San Diego, CA. EUA). As células foram analisadas em um ACCURI C6 (Becton Dickinson, EUA). Os gráficos de caracterização foram gerados com a captura de 10 eventos utilizando o software padrão do equipamento (software BD ACCURI C6; Becton Dickinson, EUA).

4.6.1.1 Diferenciação adipogênica

Para induzir a diferenciação adipogênica, 1×10^5 células foram cultivadas em meio indutor de adipogênese. Para cada 1 mL HDMEM, suplementado com 20% de SBF, utilizou-se 0,714 µL de insulina (0,35mg/mL); 100 µM de indometacina (0,0447g de indometacina Sigma® em 5 mL de DMSO); 3,5 µM de rosiglitazona (0,0089g de rosiglitazona em 5 mL de DMSO); 10^{-5} M de dexametasona (solução estoque - 1,2 mg de dexametasona em 1223 µL de etanol sendo a solução final preparada a partir de 10 µL da solução estoque para cada 2,5 mL de HDMEM) (Markarian, et al, 2014; De Carvalho Schweich, et al. 2017), o meio diferenciador foi trocado a cada 3 dias e o processo de diferenciação se deu por duas semanas.

Após descarte do meio diferenciador, as células foram fixadas por 60 min., em temperatura ambiente, com formol a 10%. Em seguida, as células foram lavadas com isopropanol a 60% e, posteriormente, incubadas com *Oil Red O* (Sigma®) por 20 min. em temperatura ambiente. O excesso de corante foi removido por lavagens com água destilada. A diferenciação foi confirmada pelo acúmulo de lipídeos intracelulares.

4.6.1.2 Diferenciação condrogênica

Para induzir a diferenciação adipogênica, 1×10^5 células foram cultivadas com o *kit* de diferenciação condrogênica STEMPRO (Gibco® Life Technologies) segundo instruções do fabricante por 21 dias, sendo o meio de cultura trocado a cada 3 dias.

Após o descarte do meio diferenciador, as células foram fixadas por 30 min. à temperatura ambiente com paraformaldeído 4%, depois foram lavadas 2 vezes com PBS e coradas com *Azul de Alcian* (Neon®) por 5 min. à temperatura ambiente. O excesso de corante foi removido por lavagens com água destilada (Camassola, *et al.* 2012). (CAMASSOLA *et al.*, 2012). A diferenciação foi confirmada pela presença de matriz extracelular rica de glicosaminoglicanos no 21º dia.

4.7 Procedimento para injeção das CTM

Após atingir o número ideal de células (4×10^6) a cultura foi tripsinizada novamente conforme a descrição do item 4.4.3. acima, o *pellet* adquirido foi ressuspendido em 3mL de PBS e homogeneizado, posteriormente centrifugou-se a amostra (1200 rpm/5min) e o sobrenadante foi descartado. Este processo foi repetido por 3 vezes para limpeza deste *pellet* quanto aos reagentes aos quais o mesmo estava exposto. Ao final o *pellet* foi ressuspendido em 1mL de solução fisiológica e transferido para uma seringa (figura 9A). O paciente foi contactado um dia antes da realização do procedimento para comparecer ao ambulatório de Ortopedia do HUMAP-UFMS. O procedimento foi realizado mediante assepsia local na topografia da área de ruptura e anestesia local com 0.5mL de Lidocaína 2% sem vasoconstritor. As CTM foram injetadas diretamente na área de lesão (figura 9B).

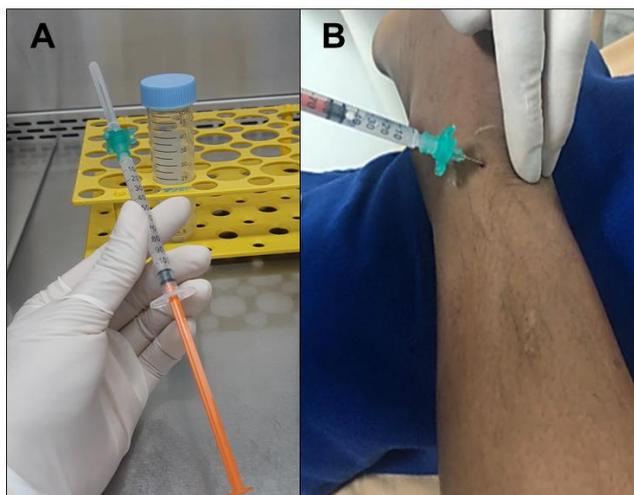


Figura 11 - A) Seringa com o a diluição de CTM + solução fisiológica pronta para a aplicação B) Aplicação das CTM na área da ruptura do tendão.

4.8 Avaliação clínica e ultrassonográfica

As Avaliações clínicas (escala AOFAS e ATRS BrP) bem como o exame de ultrassonografia foram realizados com 12 semanas da ruptura sendo que os dois primeiros efetuados por médico ortopedista e o último por médico ultrassonografista. Ambos de forma cega.

O aparelho de ultrassonografia utilizado foi o Sonoace R7 (Samsung®) com transdutor linear .

4.9 Análise Estatística

A comparação entre os os grupos experimentais, em relação às variáveis quantitativas avaliadas neste estudo (idade, escore AOFAS, ATRS BrP e escore ultrassonográfico), foi realizada por meio do teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey. Já a avaliação da associação entre o grupo experimental e as variáveis categóricas avaliadas neste estudo (sexo e lado), foi realizada por meio do teste do qui-quadrado. Os demais resultados das variáveis avaliadas neste estudo foram apresentados na forma de estatística descritiva ou na forma de tabela e gráficos. A

análise estatística foi realizada utilizando-se o programa estatístico SigmaPlot, versão 12.5, considerando um nível de significância de 5%. (SHOTT, 1990)

5 RESULTADOS

Os resultados da comparação entre os grupos experimentais em relação à idade, sexo, lado de lesão do tendão e avaliação do tendão por meio dos escores AOFAS, ATRS BrP e na ultrassonografia, estão apresentados na Tabela 1.

Não houve diferença entre os grupos experimentais em relação à idade dos participantes do estudo (teste ANOVA de uma via, $p=0,295$). A idade média foi de 49 anos. Também não houve associação entre o grupo experimental e as variáveis categóricas sexo e lado da ruptura do tendão (teste do qui-quadrado, sexo: $p=0,343$; lado: $p=0,301$).

Por outro lado, houve diferença significativa entre os grupos experimentais em relação ao escore AOFAS (teste ANOVA de uma via, $p=0,008$), sendo que este escore foi maior nos participantes do grupo Ruptura + CTM, quando comparado com aquele entre os participantes do grupo Ruptura (pós-teste de Tukey, $p<0,05$). No entanto, o escore no AOFAS observado entre os participantes do grupo Ruptura + Sutura não foi significativamente diferente daquele dos participantes do grupo Ruptura apenas e nem daquele dos participantes do grupo Ruptura + CTM (pós-teste de Tukey, $p>0,05$) (figura 10).

Em relação ao escore ATRS BrP, também houve diferença significativa entre os grupos experimentais (teste ANOVA de uma via, $p<0,001$), sendo que este escore foi maior nos participantes dos grupos Ruptura + Sutura e Ruptura + CTM, quando comparado com aquele dos participantes do grupo Ruptura (pós-teste de Tukey, $p<0,05$), porém, sem diferença significativa entre eles ($p>0,05$) (figura 11).

Quanto ao escore na ultrassonografia, houve diferença significativa entre os grupos experimentais em relação a este escore (teste ANOVA de uma via, $p=0,042$), todavia, no teste de múltiplas comparações, comparando dois grupos de cada vez, não foi possível observar diferença significativa entre eles (pós-teste de Tukey, $p>0,05$) (figura 12).

Tabela 1: Resultados da comparação entre os grupos experimentais em relação à idade, sexo, lado de lesão do tendão e avaliação do tendão por meio dos escores AOFAS, ATRS BrP e na ultrassonografia.

Variável	Grupo experimental			Valor de p
	Ruptura (n=5)	Ruptura+sutura (n=5)	Ruptura+Células tronco (n=5)	
Idade	56,60±4,14	44,80±6,09	46,40±6,04	0,295
Sexo				
Masculino	80,0 (4)	100,0 (5)	100,0 (5)	0,343
Feminino	20,0 (1)	0,0 (0)	0,0 (0)	
Lado				
Direito	60,0 (3)	20,0 (1)	20,0 (1)	0,301
Esquerdo	40,0 (2)	80,0 (4)	80,0 (4)	
Avaliação do tendão				
Escore no AOFAS	83,60±4,23b	92,00±1,87ab	98,40±0,75a	0,008
Escore no ATRS BrP	52,40±2,71b	70,20±2,91a	82,60±5,03a	<0,001
Escore no ultrassom	4,80±0,86a	8,40±0,98a	8,20±1,11a	0,042

Os resultados estão apresentados em média ± erro padrão da média ou em frequência relativa (frequência absoluta). Os valores de p apresentados são no teste ANOVA de uma via (variáveis quantitativas) ou no teste do qui-quadrado (variáveis categóricas). Letras diferentes na linha indicam diferença significativa entre os grupos experimentais (pós-teste de Tukey, $p < 0,05$). AOFAS: American Orthopaedic Foot And Ankle Society; ATRS BrP: Brazilian Version of the Achilles Tendon Total Rupture Score.

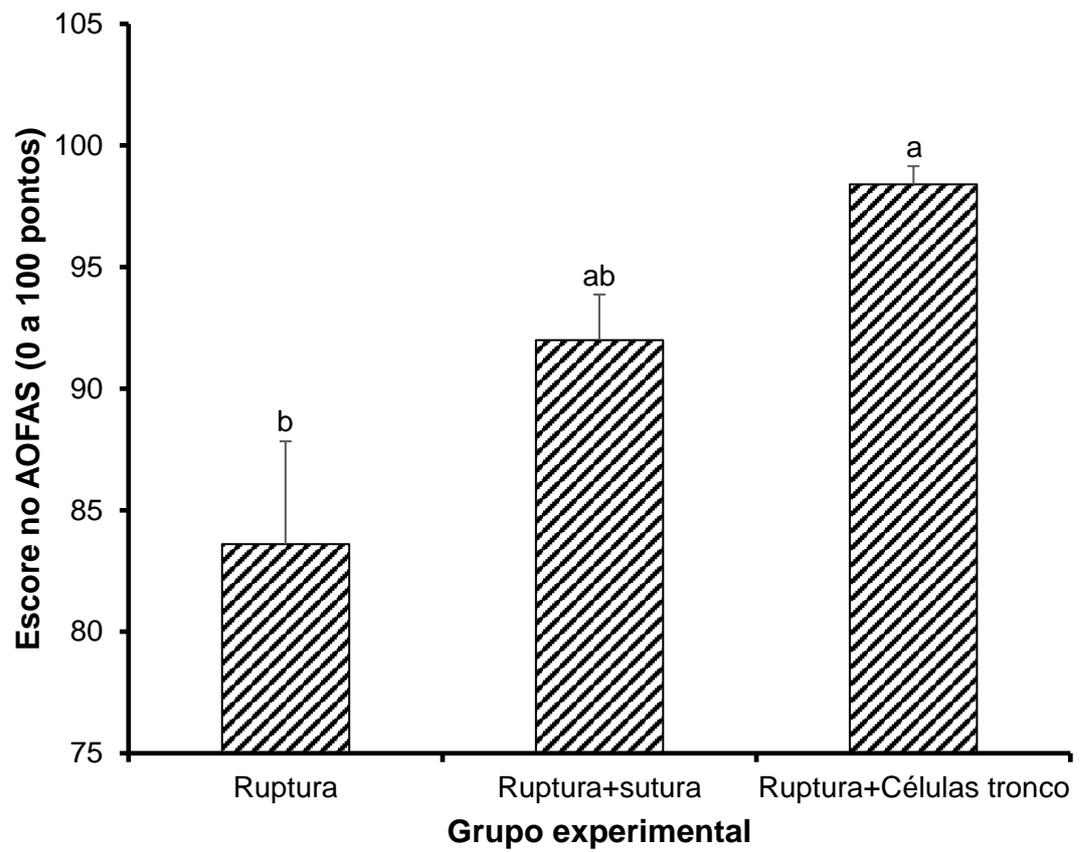


Figura 12: Gráfico apresentando o escore na escala AOFAS em cada grupo experimental. A coluna representa a média e a barra o erro padrão da média. Letras diferentes entre as colunas representa diferença significativa entre os grupos experimentais (pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).

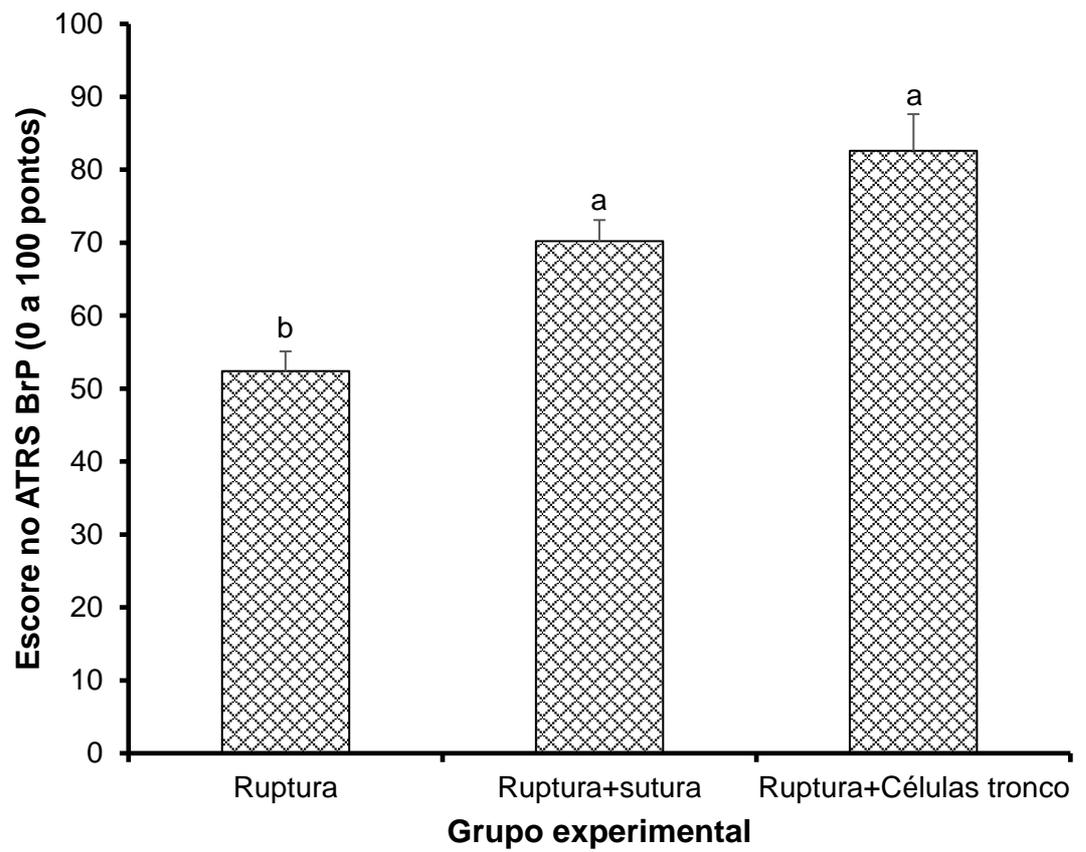


Figura 13: Gráfico apresentando o escore na escala ATRS BrP em cada grupo experimental. A coluna representa a média e a barra o erro padrão da média. Letras diferentes entre as colunas representa diferença significativa entre os grupos experimentais (pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).

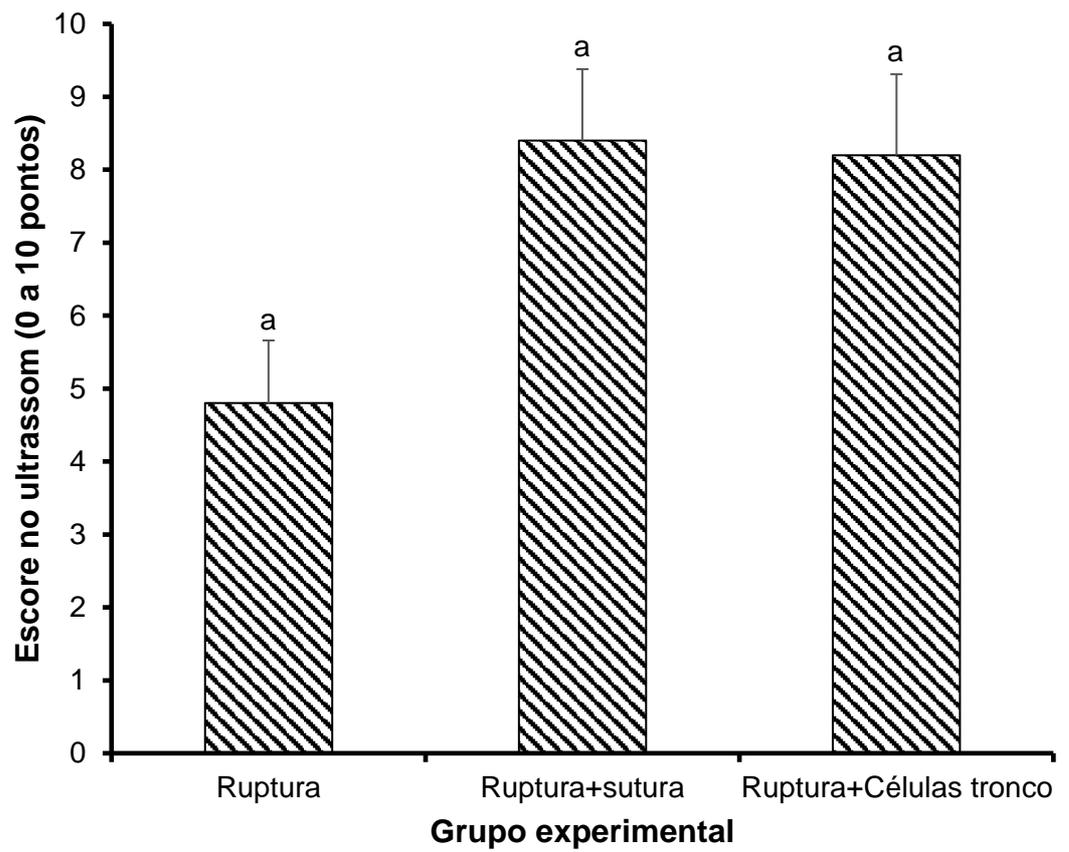


Figura 14: Gráfico apresentando o escore na ultrassonografia em cada grupo experimental. A coluna representa a média e a barra o erro padrão da média. Letras iguais entre as colunas indica que não houve diferença significativa entre os grupos experimentais (pós-teste de Tukey, $p > 0,05$).

6 DISCUSSÃO

Segundo Soroceanu *et al* (2012) as taxas de reruptura após o tratamento conservador nas rupturas agudas do tendão de Aquiles (menos de 72 horas do trauma) são similares ao grupo de pacientes submetidos ao tratamento cirúrgico com a vantagem de não apresentar complicações da ferida cirúrgica. Porém, como o tecido tendíneo apresenta baixa capacidade de regeneração por sua baixa vascularização, oxigenação e nutrição (ENWEMEKA, 1989) o que se observa é a formação de tecido fibroso cicatricial seja com o tratamento conservador ou cirúrgico.

Mesmo que seja similar a taxa de reruptura, o que de fato importa para o paciente é a sua capacidade laborativa e no presente trabalho, com a utilização de CTM no reparo do tendão sem a realização de procedimento cirúrgico obteve-se diferença significativa nos escores AOFAS e ATRS BrP entre os grupos Ruptura e Ruptura + CTM, pois as CT têm a capacidade de diferenciação em fenótipos de células tecido-específicas e a produção de matrix extracelular (NATHAN *et al*, 2003; BOSNAKOVSKI *et al*, 2005; BI *et al*, 2005; VISHNUBALAGI *et al*, 2004; JUNCOSA-MELVIN *et al*, 2006; STARNES *et al*, 2007). Juncosa-Melvin *et al*. (2006) utilizou CTM derivadas da medula óssea de coelhos na lesão do tendão patelar e observou melhora biomecânica e histológica do tecido após doze semanas. O tecido adiposo promove um tipo alternativo de células multipotentes para cultura de expansão e pode ainda promover benefício na forma da população do concentrado de células mononucleadas, entre as quais encontramos as CTM. (ZUK *et al*, 2002; FRASER *et al*, 2006). Okamoto *et al* (2010) utilizou CTM derivadas da medula óssea e células hematopoiéticas frescas retiradas do ilíaco de ratos e injetou em tendões lesionados e imobilizados e observou regeneração precoce do tendão. Segundo Vieira *et al* (2014), o uso de CTM derivadas do TA mostrou-se método eficaz no tratamento das rupturas agudas do tendão de Aquiles em coelhos pois manteve a arquitetura original do tendão pela disposição das fibras do colágeno na análise histológica.

Não foi observada diferença significativa entre os grupos Ruptura + Sutura e Ruptura + CTM em nenhum dos escores utilizados. As técnicas cirúrgicas percutâneas para reparo das rupturas agudas do tendão de Aquiles apresentam baixa taxa de complicações e melhora da aparência estética com menor agressão ao tecido possibilitando reabilitação em menor tempo (WEBB; BANNISTER, 1999) sendo o

mesmo método utilizado neste trabalho o que pode ser o fator responsável pela ausência de diferença entre os grupos.

A reabilitação após lesão tendínea e reparo é um processo que geralmente leva semanas. Durante este período, imobilização e proteção do movimento são necessários. (KVIST, 1994) Essa restrição põe o tendão em risco de complicações como adesões e pobre qualidade de reparo além do que as propriedades biomecânicas e mecânicas dos tendões cicatrizados nunca atingem aquelas de tendões intactos (WINTER *et al*, 1994) por isso atualmente preconiza-se, mesmo no tratamento conservador, a mobilidade precoce com proteção do membro lesionado. Essa metodologia foi utilizada neste trabalho mediante utilização de bota imobilizadora longa com descarga de peso precoce em todos os grupos. O uso de CTM favorece a produção celular tecido específica mas, assim como no trabalho de Chong *et al* (2007), a melhora biomecânica com uso da terapia celular não se mostrou significativa nas fases tardias de cicatrização (12 semanas) o mesmo observado neste trabalho em que não houve diferença significativa entre os grupos Ruptura + Sutura e Ruptura + CTM. Já entre os grupos Ruptura e Ruptura + CTM houve diferença. Parece então poder-se indicar a utilização de CTM em pacientes que não puderem ser submetidos a procedimento cirúrgico em hospital que não forneça reabilitação precoce para o paciente.

Vieira *et al* (2014) ao realizar análise histológica com duas e quatro semanas de tendões de coelhos de três grupos submetidos a procedimentos iguais ao do presente trabalho observou que a desorganização estrutural foi maior no grupo ruptura com 14 dias e entre os períodos houve maior desorganização nos grupos ruptura e ruptura + CTM. Daher *et al* (2011) ao realizar análise histológica do tendão de Aquiles de ratos submetidos à ruptura, sutura e injeção de CTM nos períodos de 2, 4 e 6 semanas, quando comparados ao grupo ruptura e sutura, observou que, com 2 semanas houve maior organização celular no grupo experimento, já com 4 e 6 semanas a organização foi similar ao grupo controle. A sutura do tecido facilita a orientação das fibras de colágeno para cicatrização o que está de acordo com trabalhos na literatura nos quais enfatizam inclusive a mobilização precoce. (SMITH; EVANS, 2001; LAWRENCE *et al*, 2005; GROTH; 2005) Correlacionando-se a histologia com a imagem ultrassonográfica (utilizada no presente trabalho) observa-se que, com 12 semanas, o tendão já se encontra na fase de remodelamento do processo cicatricial apesar de apresentar ainda alta celularidade e aparência fibrosa. Características estas que darão lugar a fibras de

colágeno alinhadas e diminuição do número de células por volta de um a dois anos da ruptura. Talvez por esse motivo, quanto ao escore na ultrassonografia, houve diferença significativa entre os grupos experimentais pois no grupo Ruptura as células estavam iniciando sua organização sem outros fatores como o fio de sutura (que atua como tutor para o direcionamento das fibras do colágeno) e as CTM as quais participam do reparo tendíneo por contribuição direta por diferenciação em fenótipos de células tecido-específicas e a produção de matriz extracelular.

Mas, apesar de haver diferença significativa entre os grupos estudados com relação ao exame de ultrassonografia, Möller *et al* (2002) observou em seu trabalho com uso de exame de Ressonância Nuclear Magnética e Ultrassonografia após tratamento conservador ou cirúrgico da ruptura aguda do tendão de Aquiles, que não houve correlação entre os achados dos exames e os parâmetros clínicos encontrados, ou seja, os pacientes apresentavam alterações nos exames mas clinicamente estavam sem sintomatologia o mesmo sendo observado neste trabalho mediante os resultados encontrados nos escores AOFAS e ATRS BrP.

O microambiente em que as CT residem *in vivo* fornece sinais (receptores e fatores solúveis secretados para comunicação célula-célula, matriz extracelular, estresse oxidativo e vascularização) que as direcionam para metabolizar, auto-renovar, diferenciar ou permanecerem inativas. Tanto os déficits celulares intrínsecos quanto o microambiente envelhecido, juntamente com as alterações sistêmicas associadas aos sinais hormonais e metabólicos associados à idade, podem inibir ou alterar as funções das CT tendíneas, resultando em menor condicionamento físico dessas células primitivas e, portanto, lesões mais frequentes e maus resultados do reparo tendíneo. (LUI; WONG, 2020).

A idade média dos pacientes do presente trabalho foi de 49 anos, o que condiz com o trabalho acima mas segundo Dressler *et al.* (2005), as CTM não perdem sua capacidade necessária para terapia celular de reparo com aumento da idade e, quando estocadas por um período de até 3 anos, continuam a promover reparo efetivo. Seu trabalho demonstra que, o microambiente é fator essencial para a função celular pois, mesmo sendo extraídas células de animais mais velhos, o meio de cultura influenciou seu potencial de replicação e função, o mesmo sendo observado neste trabalho pois, mesmo sendo retirada células-tronco de pacientes com idade superior a sessenta anos, capacidade de regeneração foi similar aos pacientes mais jovens.

7 CONCLUSÃO

Como discutido, apesar de em metanálises ter sido demonstrado que o tratamento conservador das rupturas agudas do tendão de Aquiles em humanos apresenta resultados similares ao tratamento cirúrgico em centros que disponham de reabilitação precoce, o tecido cicatricial é de qualidade inferior ao tecido não lesionado. A utilização de CTM pode ser opção de tratamento, principalmente para atletas, pela regeneração tecidual e recuperação significativa da função.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmad Z, Wardale J, Brooks R et al. Exploring the application of stem cells in tendon repair and regeneration. *Arthroscopy* ;28:1018–1029, 2012.

Amlang MH, Christiani P, Heinz P, Zwipp H. Percutaneous technique for Achilles tendon repair with the Dresden Instruments and results. *Unfallchirurg* 108(7):529-36, 2005.

Assal M, Jung M, Stern R et al. Limited open repair of Achilles tendon ruptures: a technique with a new instrument and findings of a prospective multicenter study. *J Bone Joint Surg Am.* 84-A(2):161 – 70, 2002.

Ayres M, Ayres Jr. M, Ayres DL, Santos AAS. *BioEstat. Aplicações estatísticas das Ciências Bio-médicas [programa de computador]. Versão 5.0. Belém (PA): Sociedade Mamirauá; 2007.*

Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med.*8:301–316, 2004.

Baumfeld D, Baumfeld T, Spiezia F, Nery C, Zambelli R, Maffulli N. Isokinetic functional outcomes of open versus percutaneous repair following Achilles tendon tears. *Foot Ankle Surg.* 10.1016/j.fas.2018.03.003, 2018.

Beskin JL, Sanders RA, Hunter SC, Hughston JC. Surgical repair of Achilles tendon ruptures. *Am J Sports Med.*15:1-8, 1987.

BeyerNardiN,daSilvaMeirellesL. Mesenchymalstemcells:isolation,invitro expansion and characterization. *Handb Exp Pharmacol.*:(174):249-82, 2006.

Bhandari M, Guyatt GH, Siddiqui F et al. Treatment of acute Achilles tendon ruptures: a systematic overview and metaanalysis. *CORR.* (400):190-200, 2002.

Bi Y, Ehirchiou D, Kilts TM, et al. Identification of tendon stem/ progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche. *Nat Med*.13:1219–1227, 2007.

Bi, Y., Ehirchiou, D., Kilts, T. M., Inkson, C. A., Embree, M. C., Sonoyama, W., et al. Identification of tendon stem/progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche. *Nat. Med.* 13 (10), 1219–1227. doi: 10.1038/ nm1630, 2007.

BidderM, TowlerDA, GelbermanRH, et al. Expression of mRNA for vascular endothelial growth factor at the repair site of healing canine flexor tendon. *J Orthop Res.*:18:247–52, 2000.

Bosnakovski D, Mizuno M, Kim G, et al. Isolation and multilineage differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Res*: 319:243–253, 2005.

Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, et al. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am*.80:985–996, 1998.

Bruns J, Kampen J, Kahrs J, et al. Achilles tendon rupture: experimental results on spontaneous repair in a sheep-model. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 8(6):364–9, 2000.

Burdett RG. Forces predicted at the ankle during running. *Med Sci Sports Exerc.* 14: 308, 1982.

Camassola, M.; De Macedo Braga, L.M.; Chagastelles, P.C.; Nardi, N.B. Methodology, biology and clinical applications of human mesenchymal stem cells. In: (Ed.). *Somatic Stem Cells*: Springer, 2012, p.491-504.

Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*: 9: 641–650, 1991.

Caplan AI. Review: mesenchymal stem cells: cell-based and constructive therapy in orthopedics. *Tissue Eng*.11:1198–1211, 2005.

Carr AJ, Norris SH: The blood supply of the calcaneal tendon. *J Bone Joint Surg.* 71B:100, 1989.

Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G, Kapoor N, Meyer P, Chiarieri D, McKenzie S, Broxmeyer HE, Moore MAS. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood*: 56: 289–301, 1980.

Chamberlain JR, Schwarze U, Wang PR, Hirata RK, Hankenson KD, Pace JM, Underwood RA, Song KM, Sussman M, Byers PH, Russell DW. Gene targeting in stem cells from individuals with osteogenesis imperfecta. *Science*: 303: 1198–1201, 2004.

Chen TM, Rozen WM, Pan W, Ashton MW, Richardson MD, Taylor GI. The arterial anatomy of the Achilles Tendon. *Clinical Anatomy* 22: 377-385, 2009.

Chong AK; Ang AD; Goh JC; Hui JH; Lim AY; Lee EH; Lim BH. . Bone marrow-derived mesenchymal stem cells influence early tendon-healing in a rabbit Achilles tendon model. *J Bone Joint Surg Am*; 89(1): 74-81, Jan. 2007.

Clain MR, Baxter DE. Achilles Tendinitis. *Foot Ankle Int.* 13:482, 1992.

Cowan CM, Shi YY, Aalami OO, et al. Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. *Nat Biotechnol*, 22:560–567, 2004.

Cretnik A, Kosanovic M, Smrkolj V. Percutaneous suturing of the ruptured Achilles tendon under local anesthesia. *J foot Ankle Surg.* 43(2):72-81, 2004.

Daher RJ, Chahine NO, Razzano P, Patwa SA, Sgaglione NJ, Grande DA. Tendon repair augmented with a novel circulating stem cell population. *Int J Clin Exp Med.* 4(3): 214-219, 2011.

Dahners LE. Growth and development of tendons. *Tendon Injuries: Basic Science and Clinical Medicine.* Springer, London. pp 22–24, 2005.

De Carvalho Schweich, L.; De Oliveira, E.J.T.; Pesarini, J.R.; Hermeto, L.C.; Camassola, M. Nardi, N.B.; Brochado, T.M.M.; Antonioli Silva, A.C.M.B.; Oliveira, R.J.; All-trans retinoic acid induces mitochondria-mediated apoptosis of human adipose-

derived stem cells and affects the balance of the adipogenic differentiation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 96, n., p. 1267-1274, 2017.

Del Buono, A., Volpin, A., Maffulli, N. Minimally invasive versus open surgery for acute Achilles tendon rupture: a systematic review. *Br. Med. Bull.* 109, 45–54, 2014.

Di RG, Iachininoto MG, Tritarelli A, et al. Myogenic potential of adipose-tissue-derived cells. *J Cell Sci.* 119:2945–2952, 2006.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 8: 315–317, 2006.

Donovan PJ, Gearhart J. The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature.* 414:92-97, 2001.

Dressler MR, Butler DL, Boivin GP. Effect of age on the repair ability of mesenchymal stem cells in rabbit tendon. *J of Orthopaedic Research.* 23:287-293, 2005.

Ding DC, Shyu WC, Lin SZ. Mesenchymal stem cells. *Cell Transplant.:* 20(1):5-14, 2011.

Enwemeka, C. S. Inflammation, cellularity and fibrillogenesis in regeneration tendon: Implications for tendon rehabilitation. *Physical Therapy*, v. 69, n.10, p. 816-825, 1989.

Fox JM, Blazina ME, Jobe FW, Kerlan RK, Carter VS, Shields CL Jr, Carlson GJ. Degeneration and rupture of the Achilles tendon. *Clin Orthop Relat Res.* 107: 221-4, 1975.

Foroutan N. Tendon Rupture as a Probable Side Effect of Ciprofloxacin: A Review Article. *Adv Pharmacoepidemiol Drug Saf*, Vol. 8 Iss. 1 No: 226, 2019.

Frank, C., Woo, S.L., Amiel, D., Harwood, F., Gomez, M., Akeson, W., 1983. Medial collateral ligament healing. A multidisciplinary assessment in rabbits. *American Journal of Sports Medicine* 11, 379–389, 1983.

Frank, C., McDonald, D., Bray, D., Bray, R., Rangayyan, R., Chimich, D., Shrive, N. Collagen fibril diameters in the healing adult rabbit medial collateral ligament. *Connective Tissue Research* 27, 251–263, 1992.

Frank, C., McDonald, D., Shrive, N. Collagen fibril diameters in the rabbit medial collateral ligament scar: a longer term assessment. *Connective Tissue Research* 36, 261–269, 1997.

Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, et al. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol.*24:150–154, 2006.

Gebauer M, Beil FT, Beckmann J, Sárváry AM, Ueblacker P, Ruecker AH, et al. Mechanical evaluation of different techniques for Achilles tendon repair. *Arch Orthop Trauma Surg.* 127:795-9, 2007.

Gomez, M. The physiology and biochemistry of soft tissue healing. In: Griffin, L. (Ed.), *Rehabilitation of the Injured Knee*, 2nd Edition. Mosby Company, St. Louis, MO, pp. 34–44, 1995.

Grinnell, F. Fibronectin and wound healing. *Journal of Cellular Biochemistry* 26, 107–116, 1984.

Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol:* 189: 54–63, 2001.

Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortessidis A, Simmons PJ. Molecular and cellular characterization of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci:* 116: 1827–1835, 2003.

Grove JE, Bruscia E, Krause DS. Plasticity of bone marrow-derived stem cells. *Stem Cells.*22:487–500, 2004.

Groth GN. Current practice patterns of flexor tendon rehabilitation. *J Hand Ther.* 18(2):169-74, 2005.

Haji A, Sahai A, Symes A, Vyas JK. Percutaneous versus open tendon Achilles repair. *Foot Ankle Int.* 25(4):215-8, 2004.

Harwood FL, Goomer RS, Gelberman RH, et al. Regulation of alpha(v)beta3 and alpha5- beta 1 integrin receptors by basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor-BB in intrasynovial flexor tendon cells. *Wound Repair Regen.*: 7:381-8, 1999.

Hiramatsu, K., Tsujii, A., Nakamura, N., Mitsuoka, T.: Ultrasonographic evaluation of the early healing process after achilles tendon repair. *Orthop. J. Sports Med.* 6, 2325967118789883, 2018.

Hopkins WG. Measures of reliability in sports medicine and science. *Sports Med.*;30:1–15, 2000.

Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, Muul L, Hofmann T. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci USA*: 99: 8932–8937, 2002.

Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, SlaperCortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*: 7: 393–395, 2005.

Integra LifeSciences Corporation. 2011. Disponível em: <http://www.primesurgery.com.br/pdf/achillon-tecnica-cirurgica.pdf>

Ippolito E, Natali PG, Postacchini F, Accini L, De Martino C. Morphological, immunochemical, and biochemical study of rabbit Achilles tendon at various ages. *J Bone Joint Surg (Am)*. 62A(4):583–598,1980.

Izadpanah R, Trygg C, Patel B, Kriedt C, Dufour J, Gimble JM, Bunnell BA. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem.*: 99: 1285–1297, 2006.

Jaakkola JI, Beskin JL, Griffith LH, Cernansky G. Early ankle motion after triple bundle technique repair vs. casting for acute Achilles tendon rupture. *Foot Ankle Int.* 22(12):979 – 84, 2001.

Jo'zsa, L., and Kannus, P. *Human Tendons: Anatomy, Physiology, and Pathology.* Champaign, IL: Human Kinetics, 1997.

J'ozsa L, Kvist M, B'alint BJ, Reffy A, J'arvinen M, Lehto M, Barzo M. The role of recreational sport activity in Achilles tendon rupture. A clinical, pathoanatomical, and sociological study of 292 cases. *Am J Sports Med.* 17:338-43, 1989.

Juncosa-Melvin N, Bovin GP, Gooch C, Galloway MT, West Jr, Dunn MG, Butler DL. The effect of autologous mesenchymal stem cells on the biomechanics and histology of gel-collagen sponge constructs used for rabbit patellar tendon repair. *Tissue Eng.* 12(2): 369-79. Feb., 2006.

Kannus P, J'ozsa L. Histopathological changes preceding spontaneous rupture of a tendon. A controlled study of 891 patients. *J Bone Joint Surg Am.* 73:1507-25, 1991.

Katz AJ, Tholpady A, Tholpady SS, Shang H, and Ogle RC. Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (haDAS) cells. *Stem Cells* 23, 412, 2005.

Khan RJ, Fick D, Keogh A et al. Treatment of acute Achilles tendon ruptures. A metaanalysis of randomized, controlled trials. *J Bone Joint Surg Am.* 87(10):2202-10, 2005.

Kitaoka HB, Alexander IJ, Adelaar RS, et al. Clinical rating systems for the ankle-hindfoot, midfoot, hallux, and lesser toes. *Foot Ankle Int.* 15:349–53, 1994.

Klein W, Lang DM, Saleh M: The use of the Ma-Griffith technique for percutaneous repair of the fresh ruptured tendo Achilles. *Chir Organi Mov* 1991, 76:223-228.

Kleinert, H.E., Serafin, D., Kutz, J.E., and Atasoy, E. Reimplantation of amputated digits and hands. *Orthop Clin North Am* 4, 957, 1973.

Korbling M, Estrov Z. Adult stem cells for tissue repair – a new therapeutic concept? *N Engl J Med*: 349: 570– 582, 2003.

Kvist M. Achilles tendo injuries in athletes. *Sports Med*. 18: 173, 1994.

Lagergren C, Lindholm A. Vascular distribution in the Achilles tendon: an angiographic and microangiographic study. *Acta Chir Scand*. 116:491,1959.

Lawrence TM, Woodruff MJ, Aladin A, Davis TR. An assessment of the tensile properties and technical difficulties of two- and four-strand flexor tendon repairs. *J Hand Surg Br*. 30(3):294-7, 2005.

Leppilahti J, Forsman K, Puranen J, Orava S. Outcome and prognostic factors of Achilles rupture repair using a new scoring method. *Clin Orthop Rel Res*. 346:152-61, 1998.

Lin TW, Cardenas L, Soslowsky LJ. Biomechanics of tendon injury and repair. *J Biomech* ;37:865–77, 2004.

Liu TM, Martina M, Hutmacher DW, Hui JH, Lee EH, Lim B. Identification of common pathways mediating differentiation of bone marrow- and adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells into three mesenchymal lineages. *Stem Cells*: 25: 750–760, 2007.

Lui, P. P., and Chan, K. M. Tendon-derived stem cells (TDSC): from basic science to potential roles in tendon pathology and tissue engineering applications. *Stem Cell Rev*. 7 (4), 883–897. doi: 10.1007/s12015-011-9276-0, 2011.

Lui, P. P. Markers for the identification of tendon-derived stem cells in vitro and tendon stem cells in situ – update and future development. *Stem Cell Res. Ther*. 6, 106. doi: 10.1186/s13287-015-0097-y, 2015.

Lui PPY, Wong CM. Biology of tendon stem cells and tendon in aging. *Front. Genet*. 10: 1338, 2020.

Ma GW, Griffith TG: Percutaneous repair of acute closed ruptured Achilles tendon: a new technique. *Clin Orthop Relat Res*.128:247-255, 1977.

Mahler F, Fritschy D. Partial and complete ruptures of the Achilles tendon and local corticosteroid injections. *Br J Sports Med.* 26:7-14, 1992.

Markarian, C.F.; Frey, G.Z.; Silveira, M.D.; Milani, A.R.; Ely, P.B.; Horn, A.P.; Nardi, N.B.; Camassola, M. Isolation of adipose-derived stem cells: a comparison among different methods. *Biotechnology letters*, v. 36, n. 4, p. 693-702, 2014.

Mason ML, Allen HS. The rate of healing of tendons. *Ann Surg.* b;113(3):424-59, 1940.

Montgomery, R.D. Healing of muscle, ligaments, and tendons. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)* 4, 304–311, 1989.

Morberg, P., Jerre, R., Sward, L., and Karlsson, J. Long-term results after surgical management of partial Achilles tendo ruptures. *Scand J Med Sci Sports* 7, 299, 1997.

Mortensen NH, and Pedersen B. Wound complications after suturing of Achilles tendon ruptures. *UgeskrLaeger* 152(44):3248-50, 1990.

Möller M, Kälebo P, Tidebrant G, Movin T, Karlsson J. The ultrasonographic appearance of the ruptured Achilles tendon during healing: a longitudinal evaluation of surgical and nonsurgical treatment, with comparisons to MRI appearance. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 10(1):49–56, 2002.

Morrisson SJ, Kimble J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature.* 441: 1068-1074, 2006.

Nathan S, Das DS, Thambyah A, et al. Cell-based therapy in the repair of osteochondral defects: a novel use for adipose tissue. *Tissue Eng.*9:733–744, 2003.

Nakamura N, Hart DA, Boorman RS, Kaneda Y, Shrive NG, Marchuk LL, et al. Decorin antisense gene therapy improves functional healing of early rabbit ligament scar with enhanced collagen fibrillogenesis in vivo. *Journal of Orthopaedic Research*;18: 517-523, 2000.

Nourissat G.; Berenbaum F; Duprez D. Tendon injury: from biology to tendon repair. *Nat Rev Rheumatol*, v. 11, n. 4, p. 223-33, Apr ISSN 1759-4804 (Electronic) 1759-4790, 2015.

O'Broin ES, Earley MJ, Smyth H, Hooper AC. Absorbable sutures in tendon repair: a comparison of PDS with prolene in rabbit tendon repair. *J Hand Surg.* 20(4):505-8, 1995.

O'Brien M. Anatomy of tendons. In: Maffulli N, Renstrom P, Leadbetter WB, editors. *Tendon Injuries*. London: Springer;pp. 3-13, 2005.

Okamoto N, Kushida T, Oe K, Umeda M, Ikehara S, Iida H. Treating Achilles Tendon Rupture in Rats with Bone-Marrow-Cell Transplantation Therapy. *J Bone Joint Surg Am.* 92: 2776-84, 2010.

Park A; Hogan MV; Kesturu GS; James R; Balian G; Chhabra AB. Adipose-derived mesenchymal stem cells treated with growth differentiation factor-5 express tendon-specific markers. *Tissue Eng Part A*; 16(9): 2941-51. Sep, 2010.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*: 284: 143–147, 1999.

Pountos I, Jones E, Tzioupis C, McGonagle D, Giannoudis PV. Growing bone and cartilage. The role of mesenchymal stem cells. *J Bone Joint Surg Br*: 88: 421–426, 2006.

Prockop DJ. Marrow stromal cells as stemcells for non hematopoietic tissues. *Science*.: 276(5309):71-4, 2007.

Pufe T, Petersen WJ, Mentlein R, Tillmann BN. The role of vas- culature and angiogenesis for the pathogenesis of degenerative tendons disease. *Scand J Med Sci Sports* 15:211–222, 2005.

Richardson LC, Reitman R, Wilson M. Achilles tendon ruptures: functional outcome of surgical repair with a “pull-out” wire. *Foot Ankle Int.* 24(5):439-43, 2003.

Rickert M, Jung M, Adiyaman M, Richter W, and Simank HG, A growth and differentiation factor-5 (GDF-5)-coated suture stimulates tendon healing in an Achilles tendon model in rats. *Growth Factors* 19, 115, 2001.

Rosenbaum AJ, Wicker JF, Dines JS, Bonasser L, Razzano P, MS Dines DM, Grande DA. Histologic States of Healing Correlate with restoration of Tensile Strength in a Model of Experimental Tendon Repair. *HSSJ* 6: 164-170, 2010.

Rui, Y. F., Lui, P. P., Li, G., Fu, S. C., Lee, Y. W., and Chan, K. M. Isolation and characterization of multipotent rat tendon-derived stem cells. *Tissue Eng. Part A.* 16 (5), 1549–1558. doi: 10.1089/ten.TEA.20090529, 2010.

Scott SH, Winter DA. Internal forces of chronic running injury sites. *Med Sci Sports Exerc.* 22: 357,1990.

Sethe S, Scutt A, Stolzing A. Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing Res Rev.*;5(1):91-116, 2006.

Smith JW. Blood supply of tendons. *Am J Surg* 109:272–276, 1965.

Smith AM, Evans DM. Biomechanical assessment of a new type of flexor tendon repair. *J Hand Surg Br.* 26(3):217-9, 2001.

Smith RK, Korda M, Blunn GW, et al. Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. *Equine Vet J.*35:99–102, 2003.

Smith A. A glossary for stem-cell biology. *Nature* 441: 1060. 2006

Shott, S. *Statistics for health professionals.* London: W.B. Saunders Company, 1990.

Soldatis JJ, Goodfellow DB, Wilber JH. End-to-end operative repair of Achilles tendon rupture. *Am J Sports Med.* 25:90-95, 1997.

Soroceanu A, Sidhwa F, Aarabi S, Kaufman A, Glazebrook M. Surgical Versus Nonsurgical Treatment of Acute Achilles Tendon Rupture: a Meta-analysis of Randomized Trials. *J Bone Joint Surg Am.* 94:2136-43, 2012.

Starnes, T., Huang, D., Kesturu, G., James, R., Balian, G., and Chhabra, A.B., GDF-5 induced tendon repair and regeneration. AAOS Annual Meeting San Diego, 2007.

Strem BM, Hicok KC, Zhu M, et al. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med.*54:132–141, 2005.

Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 126: 663–676, 2006.

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 131: 861–872, 2007.

Thein TB, Becker JH, and Theis JC. Rehabilitation after surgery for flexor tendon injuries in the hand. *Cochrane Database System Ver. 4:* CD003979, 2004.

Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res;* 14: 213–222, 1961.

Uysal AC, and Mizuno H. Tendon regeneration and repair with adipose-derived stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther.* Nov 26, 2009.

Vailas AC, Tipton CM, Laughlin HL, Tchong TK, Matthes RD. Physical activity and hypophysectomy on the aerobic capacity of ligaments and tendons. *J Appl Physiol.* 44:542-546, 1978.

Vieira, MH.; Oliveira, RJ.; Eca, LP.; Pereira, IS.; Hermeto, LC.; Matuo, R; Fernandes, WS.; Silva, RA.; Antonioli, AC. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells to treat Achilles tendon injuries. *Genet. Mol. Res.* 13, 10434–10449, 2014.

Vishnubalaji R, Al-Nbaheen, Kadalmani B, Aldahmash A, Ramesh T. Comparative investigation of the differentiation capability of bone-marrow and adipose-

derived mesenchymal stem cells by qualitative and quantitative analysis. *Cell Tissue Res*; 347: 419-427, 2012.

Watt FM, Hogan BL. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science*. 287: 1427–1430, 2000.

Webb JM, Bannister GC,. Percutaneous repair of the ruptured tendo Achillis. *The Journal of Bone & Joint Surgery (Br)*. 81-B (5) : 877-880, 1999.

Willits K, Amendola A, Bryant D, Mohtadi NG, Giffin JR, Fowler P, Kean CO, Kirkley A. Operative versus nonoperative treatment of acute Achilles tendon ruptures: a multicenter randomized trial using accelerated functional rehabilitation. *J Bone Joint Surg Am*. Dec 1;92(17):2767-75, 2010.

Winter E, Weise K, Weller S, and Ambacher T. Surgical repair os Achilles tendon rupture. Comparison of surgical with conservative treatment. *Arch Orthop Trauma Surg*. 117:364, 1998.

Woo, S.L., Buckwalter, J.A. AAOS/NIH/ORS workshop. Injury and repair of the musculoskeletal soft tissues. Savannah, Georgia, June 18–20, 1987. *Journal of Orthopaedic Research* 6, 907–931, 1988.

Woo, S.L., An, K., Frank, C., Livesay, G., Ma, A., Zeminski, J., Wayne, J., Myers, B. Anatomy, biology, and bio- mechanics of tendon and ligament. In: Buckwalter, J., Einhorn, T., Simon, S. (Eds.), *Orthopaedic Basic Science: Biology and Biomechanics of the Musculoskeletal System*, 2nd Edition.. American Academy of Orthopaedic Surgeons, Rosemont, IL, pp. 582–616. 2000a.

Woo, S.L., Debski, R.E., Zeminski, J., Abramowitch, S.D., Saw, S.S., Fenwick, J.A. Injury and repair of ligaments and tendons. *Annual Review of Biomedical Engineering* 2, 83–118, 2000b.

Wood A. Ethics and embryonic stem cell research. *Stem Cell Rev*. 1: 317–324. 2005

Young RG, Butler DL, Weber W, Caplan AI, Gordon SL, Fink DJ. Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. *J Orthop Res.*16(4):406-13.Jul, 1998.

Zaidi N, Nixon AJ. Stem cell therapy in bone repair and regeneration. *Ann N Y Acad Sci.*1117:62–72, 2007.

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng:* 7: 211–228, 2001.

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 13:4279–4295, 2002.

Zuk PA, Benhaim P, Hedrick MH. Stem cells from adipose tissue. In: Lanzer R, Blau H, Melton D, et al, eds. *Handbook of stem cells. Volume 2. Adult and fetal stem cells.* New York: Academic Press Inc.425 447, 2004.

ANEXO I

ESCALA AOFAS (AMERICAN ORTHOPAEDIC FOOT AND ANKLE SOCIETY)

¹ Parâmetro	Pontos
1. Dor (40 pontos)	
Nenhuma	40
Leve, ocasional	30
Moderada, diária	20
Intensa, quase sempre presente	0
2. Função (50 pontos)	
2.1 Limitação das atividades e necessidade de suporte	
Sem limitação, sem suportes	10
Sem limitações às atividades diárias, limitação recreacional, sem suportes	7
Limitação das atividades diárias e recreacionais, bengala	4
Limitação importante das atividades diárias, muleta, andador, cadeira	0
2.2 Distância máxima de marcha (quarteirões)	
Maior do que 6	5
De 4 a 6	4
De 1 a 3	2
Menor do que 1	0
2.3 Superfície de marcha	
Sem dificuldade em qualquer superfície	5
Alguma dificuldade em terrenos irregulares, escadas ou ladeiras	3
Dificuldade intensa em terrenos irregulares, escadas ou ladeiras	0
2.4 Anormalidade da marcha	
Nenhuma ou leve	8
Óbvia	4
Marcante	0
2.5 Mobilidade sagital (flexão + extensão)	
Normal ou restrição mínima (30° ou mais)	8
Restrição moderada (15° a 29°)	4
Restrição intensa (menor que 15°)	0
2.6 Mobilidade do retro-pé (inversão e eversão)	
Normal ou restrição leve (75 a 100%)	6
Restrição moderada (25 a 74%)	3
Restrição intensa (menor do que 25%)	0
2.7 Estabilidade do tornozelo e retro-pé (antero-posterior + varo-valgo)	
Estável	8
Instável	0
3. Alinhamento (10 pontos)	
Bom – pé plantigrado com tornozelo e retro-pé alinhados	10
Regular – pé plantigrado, algum desalinhamento, sem dor	5
Mau – pé não plantigrado, desalinhamento importante e sintomático	0

ANEXO II

ESCORE TOTAL DE RUPTURA DO TENDÃO DE AQUILES (ATRS BrP)

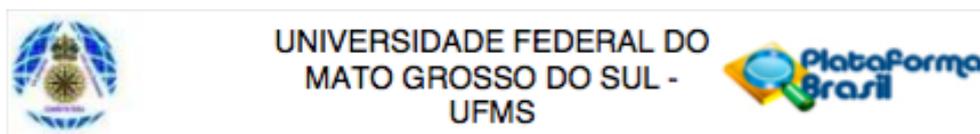
Classifique suas limitações atuais; 0 é uma limitação grave, 10 é sem limitação, circule sua resposta para as seguintes perguntas

1. Você está limitado por causa da diminuição da força na panturrilha/ tendão de Aquiles / pé?										
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2. Você está limitado por causa de fadiga na panturrilha / tendão de Aquiles / pé?										
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
3. Você está limitado devido à rigidez na panturrilha / tendão de Aquiles / pé?										
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
4. Você está limitado por causa de dor na panturrilha / tendão de Aquiles / pé?										
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
5. Você está limitado durante as atividades da vida diária?										
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
6. Você está limitado ao andar em superfícies irregulares?										
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
7. Você está limitado ao andar rapidamente uma escada ou inclinação ?										
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
8. Você está limitado durante atividades que incluem corrida?										
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
9. Você está limitado durante atividades que incluem saltar?										
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
10. Você está limitado na realização de trabalho físico pesado?										
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

ANEXO III**PONTUAÇÃO DO REPARO DO TENDÃO DE AQUILES**

Parâmetro	Pontos
Área anecóica de defeito do tendão	
Ausente	2
0% - < 50%	1
50% - 100%	0
Área intratendínea hiperecócica	
0% - <25%	3
25% - < 50%	2
50% - < 75%	1
75% - 100%	0
Continuidade do padrão fibrilar intratendinoso	
Completa	3
Incompleta	1
Ausente	0
Edema peritendíneo	
Ausente	2
Presente	0
	10

ANEXO IV



Continuação do Parecer: 2.257.780

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem adequações.

Considerações Finais a critério do CEP:

O presente projeto, seguiu nesta data para análise da CONEP e só tem o seu início autorizado após a aprovação pela mesma.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_973964.pdf	06/08/2017 18:15:04		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	brochura.doc	06/08/2017 18:13:42	Maria Helena Costa Vieira	Aceito
Orçamento	orcamento.doc	06/08/2017 18:12:16	Maria Helena Costa Vieira	Aceito
Outros	CETROGEN.pdf	06/08/2017 18:11:34	Maria Helena Costa Vieira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	GEP.doc	06/08/2017 18:03:26	Maria Helena Costa Vieira	Aceito
Declaração de Pesquisadores	responsabilidadeorcamentaria.docx	06/08/2017 18:00:31	Maria Helena Costa Vieira	Aceito
Outros	prontuarios.docx	06/08/2017 17:44:02	Maria Helena Costa Vieira	Aceito
Outros	chefeservico.docx	06/08/2017 17:43:43	Maria Helena Costa Vieira	Aceito
Outros	bancodados.docx	06/08/2017 17:40:21	Maria Helena Costa Vieira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	06/08/2017 17:38:56	Maria Helena Costa Vieira	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	materialbiologico.docx	06/08/2017 17:37:55	Maria Helena Costa Vieira	Aceito
Cronograma	fundectcronograma.pdf	06/08/2017 17:37:36	Maria Helena Costa Vieira	Aceito
Folha de Rosto	folharosto.docx	06/08/2017 17:30:27	Maria Helena Costa Vieira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

ANEXO V

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA

PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeito da terapia celular com células tronco mesenquimais no tratamento da lesão do tendão de Aquiles em humanos

Pesquisador: Maria Helena Costa Vieira

Área Temática: Genética Humana:

(Haverá alterações da estrutura genética de células humanas para utilização in vivo.);
Novos procedimentos terapêuticos invasivos;

Versão: 3

CAAE: 73178417.5.0000.0021

Instituição Proponente: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

Patrocinador Principal: FUND. DE APOIO E DE DESENV. DO ENSINO, CIENCIA E TECN. DO ESTADO DO MS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.799.335

Considerações Finais a critério da CONEP:

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - Conep, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Protocolo aprovado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_973964.pdf	10/07/2018 12:16:13		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	brochuraCONEP.doc	08/07/2018 14:34:36	Maria Helena Costa Vieira	Aceito
Outros	cartarespostaCONEP.doc	08/07/2018 14:33:57	Maria Helena Costa Vieira	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	declaracaobiorepositorio.doc	04/05/2018 22:52:52	Maria Helena Costa Vieira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcleCONEP.docx	04/05/2018 22:52:03	Maria Helena Costa Vieira	Aceito
Orçamento	orcamentodetalhadoCONEP.docx	27/03/2018 20:25:02	Maria Helena Costa Vieira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	anunciaversoGEP.pdf	26/03/2018 11:50:45	Maria Helena Costa Vieira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	anunciafrenteGEP.pdf	26/03/2018 11:50:05	Maria Helena Costa Vieira	Aceito
Declaração de	materialbiologicoCONEP.doc	26/03/2018	Maria Helena Costa	Aceito

Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	materialbiologicoCONEP.doc	11:48:45	Vieira	Aceito
Orçamento	orcamento.doc	06/08/2017 18:12:16	Maria Helena Costa Vieira	Aceito
Outros	CETROGEN.pdf	06/08/2017 18:11:34	Maria Helena Costa Vieira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	GEP.doc	06/08/2017 18:03:26	Maria Helena Costa Vieira	Aceito
Declaração de Pesquisadores	responsabilidadeorcamentaria.docx	06/08/2017 18:00:31	Maria Helena Costa Vieira	Aceito
Outros	prontuarios.docx	06/08/2017 17:44:02	Maria Helena Costa Vieira	Aceito
Outros	chefeservico.docx	06/08/2017 17:43:43	Maria Helena Costa Vieira	Aceito
Outros	bancodados.docx	06/08/2017 17:40:21	Maria Helena Costa Vieira	Aceito
Cronograma	fundectcronograma.pdf	06/08/2017 17:37:36	Maria Helena Costa Vieira	Aceito
Folha de Rosto	folharosto.docx	06/08/2017 17:30:27	Maria Helena Costa Vieira	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

BRASILIA, 03 de Agosto de 2018

Assinado por:
FRANCISCA VALDA DA SILVA
(Coordenador)

ANEXO VI



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



RESOLUÇÃO Nº 202, DE 04 DE SETEMBRO DE 2018.

A PRESIDENTE DO COLEGIADO DE CURSO DOS CURSOS DE MESTRADO E DOUTORADO EM SAÚDE E DESENVOLVIMENTO NA REGIÃO CENTRO-OESTE da Faculdade de Medicina da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, no uso de suas atribuições legais, resolve, **ad referendum**:

Aprovar o Projeto de Pesquisa, vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, intitulado: "EFEITO DA TERAPIA CELULAR COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS NO TRATAMENTO DA LESÃO DO TENDÃO DE AQUILES EM HUMANOS" sob a responsabilidade da aluna de Doutorado MARIA HELENA COSTA VIEIRA, RGA 20161862, e orientação da Profª. Andreia Conceicao Milan Brochado Antonioli da Silva.

ALEXANDRA MARIA ALMEIDA CARVALHO



Documento assinado eletronicamente por **Alexandra Maria Almeida Carvalho, Presidente de Colegiado**, em 04/09/2018, às 10:19, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufms.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 0734406 e o código CRC 54D260C1.

ORDENAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E DESENVOLVIMENTO NA REGIÃO CENTRO-OESTE

Av Costa e Silva, s/nº - Cidade Universitária
Fone:
CEP 79070-900 - Campo Grande - MS

Referência: Processo nº 23104.000046/2018-01

SEI nº 0734406

ANEXO VII

Nº 152, Segunda-Feira, 20 de novembro de 2017

**Resolução nº 68, de 16 de novembro de 2017.**

O Presidente do Colegiado Executivo do Hospital Universitário "Maria Aparecida Pedrossian" da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, no uso de suas atribuições legais e regimentais, conforme a Lei n. 12.550 de 15 de dezembro de 2011,

artigo 6º do Regimento Interno da EBSERH, artigos 46 e 47, em reunião do Colegiado Executivo realizada no dia 14 de novembro de 2017,

CONSIDERANDO a Portaria Interministerial nº 2.400, de 02 de outubro de 2007, que estabelece os requisitos para certificação de unidades hospitalares como Hospitais de Ensino;

Resolve:

Aprovar o Projeto de Pesquisa: Efeitos da terapia celular com células-tronco mesenquimais no tratamento da lesão do tendão de Aquiles.

Pesquisadora Responsável: Maria Helena Costa Vieira.

Orientadora: Andreia C. M. Brochado Antonioli Silva.

Prazo de Execução: novembro de 2017 a dezembro de 2019.

CLÁUDIO CÉSAR DA SILVA

ANEXO VIII

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO/TCLE

Prezado(a) Senhor(a)

Gostaríamos de convidá-lo a participar da pesquisa “Efeito da terapia celular com células-tronco mesenquimais (CTM) no tratamento da lesão do tendão de Aquiles em Humanos. Você tem tempo para refletir, e a decisão final se gostaria ou não de participar da pesquisa é sua. Lembre-se que, à medida que surgirem dúvidas, você poderá perguntar ao pesquisador responsável.

Este estudo será conduzido pelos pesquisadores Maria Helena Costa Vieira, Andréia Conceição Milan Brochado Antonioli Silva e Rodrigo Juliano Oliveira e visa conhecer os efeitos da aplicação das células-tronco na ruptura do tendão de Aquiles em Humanos. O tratamento não cirúrgico, segundo a história, está associado a um alto risco de nova ruptura do tendão, variando de 13 a 30%, atrofia da musculatura da perna, mas com a vantagem de não apresentar complicações da ferida cirúrgica. O tratamento cirúrgico das rupturas do tendão de Aquiles resulta em menor porcentagem de nova ruptura (0 a 6%), movimentação precoce e melhor retorno ao esporte, mas com o risco das complicações da ferida (0 a 21%). Devido à grande possibilidade de nova ruptura estimularam a investigação de métodos para melhorar a cicatrização do tendão que promovesse melhor reparo, mais consistente com a formato original do tendão.

Nesta pesquisa em específico, serão selecionados quinze pacientes com ruptura do tendão de Aquiles com menos de cinco dias da lesão que já tiverem realizados os exames pré-operatórios (exames laboratoriais e ultrassonografia do tornozelo). Todos os pacientes responderão a questionário de avaliação da dor, função e alinhamento do membro lesionado. Cinco pacientes (grupo 2), com diagnóstico de ruptura do tendão de Aquiles com alguma condição clínica que contraindique o procedimento cirúrgico, serão convidados, após realização do risco cirúrgico, à coleta de pequena quantidade de tecido adiposo (gordura) da região do abdômen no Centro Cirúrgico (HUMAP/EBSERH). Esse tecido será coletado para extrair dele células que serão cultivadas no CETROGEN

(Centro de Estudos em Células Tronco, Terapia Celular e Genética Toxicológica) do Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian (HUMAP-UFMS) para se transformarem em células formadoras de tendão. Após 30 dias (tempo do cultivo celular), essas células serão injetadas no local do tendão lesionado. Essa injeção será realizada no ambulatório de Ortopedia do HUMAP/EBSERH com todos os cuidados de assepsia e antisepsia.

Os outros dez pacientes serão subdivididos em 2 grupos de cinco, não aleatórios (pois somente serão incluídos no grupo 1 os pacientes que tiverem contraindicação clínica para o procedimento) em que no grupo 1 será realizada somente a imobilização do membro. Já o grupo 3 será realizado tratamento cirúrgico com sutura do tendão conforme atualmente praticado em pacientes com indicação cirúrgica.

O tratamento específico em cada grupo será realizado como segue abaixo:

Grupo 1 - pacientes com ruptura aguda do tendão submetidos a imobilização com bota imobilizadora longa com o pé em posição de eqüino de 20 graus por 6 semanas com elevação da parte posterior do pé de 2,5cm (uso de calço feito com algodão ortopédico e ataduras de crepe) e mais 4 semanas com o pé em posição neutra. O paciente pode pisar neste período.

Grupo 2 - pacientes com ruptura aguda do tendão submetidos a imobilização com bota imobilizadora longa com o pé em posição de eqüino de 20 graus por 6 semanas com elevação da parte posterior do pé de 2,5cm (uso de calço feito com algodão ortopédico e ataduras de crepe) e mais 4 semanas com o pé em posição neutra. Após aproximadamente três semanas, após a obtenção da quantidade ideal de células, o paciente será chamado a comparecer no ambulatório de ortopedia para realização da injeção local de CTM (após obtenção da quantidade ideal de células). Estas serão aspiradas em seringa de 1ml para injeção intralesional nos tendões. O paciente pode pisar neste período.

Grupo 3 - pacientes com ruptura aguda do tendão de Aquiles submetidos à sutura e imobilização com bota imobilizadora longa com o pé em posição de eqüino de 20 graus por 6 semanas com elevação da parte posterior do pé de 2,5cm (uso de calço feito com algodão ortopédico e ataduras de crepe) e mais 4 semanas com o pé em posição neutra. O paciente pode pisar neste período.

O paciente será submetido a uma escala de avaliação pré e pós-operatória (após doze semanas do início do tratamento) na qual serão verificados três itens: dor, aspectos funcionais e alinhamento do membro submetido ao procedimento. Além disso será realizado exame de imagem (ultrassonografia do tornozelo) no pós-operatório.

O tempo de tratamento será o mesmo em todos os grupos.

Os **benefícios** que se esperam encontrar nos paciente submetidos à injeção local das Células Tronco Mesenquimais são:

- Obter um tendão com força similar ou superior aos pacientes submetidos à sutura do tendão sem a necessidade de procedimento cirúrgico.
- Menor risco de reruptura pois será formado novo tecido tendíneo no local lesionado, diferente do que ocorre quando não se opera, pois forma-se somente tecido fibroso com força inferior ao tendão.

Reforço a idéia de que você não está sendo convidado(a) a fazer o procedimento cirúrgico completo de lipoaspiração abdominal, e sim, autorizando que algumas de suas células de gordura sejam coletada de uma determinada região abdominal para posteriormente serem utilizadas no cultivo e no transplante.

Os riscos próprios à coleta dessas células poderão ser pequenos sangramentos gerando hematomas no pós-operatório, sendo que o pesquisador e equipe se responsabilizam em prontamente atender qualquer situação que se fizer necessário. Já em relação ao uso das células tronco, a literatura consultada não apresenta nenhum risco ou efeito adverso visto que o material é autólogo, ou seja, do retirado e transplantado para o próprio paciente. Os riscos quanto à injeção das células tronco podem estar relacionados à aplicação como infecção no local, alergias mas todos os cuidados de assepsia e antissepsia bem como coleta de informações prévias do paciente a respeito de alergias a medicações serão realizados.

Quanto aos riscos relacionados ao procedimento cirúrgico propriamente dito a cirurgia é de médio porte, sendo realizada por via aberta, por equipe competente e experiente. Porém, como qualquer procedimento invasivo, podem haver possíveis reações no pós-operatório tais como hematoma, calor persistente ou vermelhidão ao redor da incisão cirúrgica, deiscência dos pontos, mas toda equipe é qualificada para a realização do procedimento e tratamento das possíveis complicações.

A equipe estará prontamente a postos caso seja necessário, sendo direito do participante receber assistência e acompanhamento especializado de forma integral, pelo tempo que for necessário, caso esses eventos adversos aconteçam. Ressaltando que toda e qualquer prestação de assistência acontecerá sem ônus de qualquer espécie ao participante. É de responsabilidade do pesquisador e do HUMAP/EBSERH, a realização de todo e qualquer forma de suporte ao participante.

Será garantido ao participante o atendimento no pós-operatório imediato e tardio, os pacientes receberão acompanhamento especializado e orientações primárias quanto à realização de suas atividades de vida diária.

A reabilitação será mantida pelo tempo que for necessária, sem custos para os participantes da pesquisa (reabilitação fisioterápica atualmente oferecida pelo SUS). Lembrando que os profissionais participantes serão suficientemente habilitados e cientes das peculiaridades do histórico de cada paciente.

Qualquer despesa da pesquisa, referente ao participante e seu acompanhante, tais como transporte e alimentação nos dias que forem necessárias sua presença para consultas e exames extras serão ressarcidas. Ainda, fique sabendo que se você aceitar participar, poderá desistir do estudo a qualquer momento sem prejuízos médicos ou pessoais, informando esta decisão à mim pessoalmente ou pelo telefone que encontra-se mais abaixo. Lembrando também que terá direito a indenização caso ocorra qualquer tipo de dano decorrente da participação desta pesquisa.

Qualquer intercorrência decorrente do procedimento cirúrgico ou experimento será prontamente avaliada e corrigida conforme resolução da CONEP no. 466/2012 e ficará, sob responsabilidade do pesquisador, tratamento integral e contínuo, sem ônus aos participante.

Não participam da pesquisa pessoas menores de 18 anos. Não haverá qualquer compensação financeira para os que decidirem participar da pesquisa e os benefícios serão obtidos quando os resultados da pesquisa forem usados pelos médicos que buscam novos tratamentos para a ruptura do tendão de Aquiles por alternativas inovadoras e mais eficientes. Os dados obtidos nesse estudo serão armazenados e publicados em revistas, jornais, eventos, teses, porém em nenhum momento serão divulgados nomes, ou seja, os dados da pesquisa são anônimos e apenas o pesquisador e você, terão acesso a este documento em que consta o seu nome.

Para perguntas ou problemas referentes ao estudo ligue para Maria Helena Costa Vieira (67) 98165-1556. Para perguntas sobre seus direitos como participante no estudo você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFMS (CEP), no telefone (67)3345-7187, endereço Cidade Universitária, caixa postal 549, CEP 79070-900, Campo Grande – MS.

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul foi criado no âmbito desta Instituição pela Instrução de Serviço 005, de 18 de fevereiro 1997, e reconhecido pela Reitoria através da Portaria 781, de 3 de dezembro de 1988, estando credenciado para exercer suas finalidades junto a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) do Ministério da Saúde desde o dia 18 de março de 1997. O CEP é um órgão consultivo, educativo e fiscalizador.

Como já informado, sua participação no estudo é voluntária. Caso não queira participar da pesquisa, você não perderá qualquer benefício ao qual você tem direito.

Declaro que li e entendi este formulário de consentimento e todas as minhas dúvidas foram esclarecidas e que sou voluntário a fazer parte deste estudo. Declaro que estou recebendo uma via assinada deste termo de consentimento.

Nome do participante

Assinatura do participante

Data ___/___/___ Telefone (opcional) _____

Assinatura do pesquisador responsável

Maria Helena Costa Vieira

