

**Rosangela Alquieri Fedato**

**EFEITOS DA UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO SOBRE TENDINOPATIA  
DE AQUILES EM RATOS**

**Monografia apresentada para conclusão do  
Curso de Especialização em  
Cirurgia do Tornozelo e Pé.  
Orientador: Dr. João Luiz Vieira da Silva**

**2014**

## **Abstract**

The purpose of this study was to examine the pathological changes in the Achilles tendon and its paratenon after intratendinous corticosteroid injections and to reveal the effects of this drug on healthy tendon. We also sought for the effects of these injections compared with compression with a clamp on the Achilles tendons of the rats. Fifty-two Achilles tendons in 26 male Wistar rats were included in the study. Betamethasone injections were applied to the left tendons at different intervals, while the right tendons served for compression with mosquito clamps for varied periods. At the end of 30 days, all of the tendons were excised and examined histopathologically according to a semiquantitative scoring system. Histopathologic evaluation demonstrated some degree of degeneration in both groups. Statistical analysis showed no significant difference among the two groups, but in macroscopic evaluation, the tendons in the betamethasone group demonstrated enlargement and strong adhesion to the subcutaneous tissue. We conclude that intratendinous betamethasone injections are as harmful as compression with a clamp and can be used as a degeneration-producing model in further studies. Enlargement of the tendon mass and strong adhesion to the subcutaneous tissue can be due to injection of the betamethasone partly outside the tendon.

## **1. INTRODUÇÃO**

Distúrbios tendinosos são comuns na prática clínica, podendo desencadear morbidade significativa através da redução da mobilidade ou prática de atividades físicas devido aos sintomas dolorosos. Anatomicamente, os tendões são estruturas pouco vascularizadas e, portanto têm baixo potencial de cicatrização tanto em lesões agudas quanto em crônicas.

O processo cicatricial humano é capaz de reparar a maioria das lesões através da formação de tecido fibroso, sendo seu principal componente o colágeno. No entanto, suas fibras permanecem aleatoriamente dispostas, fazendo com que propriedades mecânicas e bioquímicas como elasticidade e resistência não sejam iguais ao tendão intacto, resultando em um processo patológico com repercussão clínica.

Estratégias para um reparo bem sucedido de tecido tendinoso, com células-tronco mesenquimais (MSCs), foram descritas em vários estudos. O uso de MSCs, com compósitos de colágeno utilizados para reparo do tendão patelar, por exemplo, resultou em uma maior resistência tensional aos tendões.

As primeiras descrições, em modelos não humanos, mostram a capacidade das células-tronco das células-tronco mesenquimais da medula óssea em apresentar alterações morfológicas nucleares e alinhamento longitudinal para sua diferenciação em tenócitos. As propriedades dos tendões poderiam ser melhoradas pela combinação de MSCs com um biomaterial composto sintetizado in vitro utilizando biorreatores. A adição de um colágeno tipo I ajudou a assimilar rigidez ao material sendo resistente a uma série de forças em tendões patelares in vivo. Mesmo assim, existe uma carência de estudos que explorem, com maior aprofundamento, a diferenciação em tenócito de MSCs humanas de tecido adiposo ou medula óssea. Esta área de pesquisa merece uma análise mais minuciosa. O recente isolamento de células-tronco multipotentes de tendões pode lançar luz sobre este assunto. O objetivo do presente estudo é avaliar a resposta da utilização de células-tronco de tecido pulpar de dentes decíduos humanos com um suporte de PBS no tratamento de tendinopatia induzida por corticóide no tendão de Aquiles de ratos e avaliar se há diferenças cicatriciais entre o grupo que fez uso de células-tronco e o grupo controle.

## **2. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS**

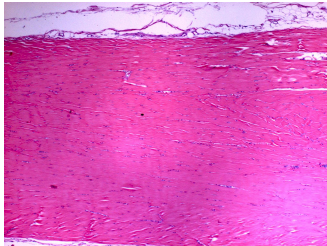
Este estudo tipo coorte foi realizado em parceria com a Universidade Positivo de Curitiba, após aprovação pelo Comitê de Ética em uso de Animais e em conformidade com termos institucionais comuns às instituições e de acordo com as normas previstas na Lei Federal no 11.794, de 8 de outubro de 2008, resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

Esta pesquisa utilizou células-tronco dentárias obtidas por meio do Projeto de Pesquisa registrado no Sistema Nacional de Informação sobre Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (SISNEP) sob o número CAAE: 0060.0.094.094-10e aprovada no Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Positivo, sob o protocolo no. 071/2010.

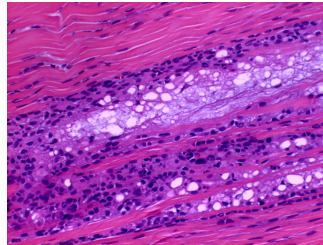
As MSC foram preparadas para transplante e então suspensas na concentração de  $2 \times 10^5$  células por 100 $\mu$ l. Em seguida, 0,5ml de suspensão celular foi acondicionada em seringas de 1 ml e mantidas em caixas térmicas na temperatura de 4°C para transporte até o centro cirúrgico do biotério.

O experimento foi composto por vinte e dois membros direitos de vinte e dois ratos. A tendinopatia foi induzida com betametasona 0,1ml na região do tendão de Aquiles direito. Foram realizadas quatro aplicações em intervalos regulares de sete dias.

Dois animais foram eutanasiados antes da tendinopatia, para obtenção da histologia normal e dois após a indução para comprová-la. (figura 1 e 2).



**Fig. 1 Aspecto histológico normal  
Histológico da Tendinopatia Induzida**



**Fig. 2 Aspecto**

Esperou-se o período de uma semana e então os animais foram divididos em dois grupos. Ao Grupo I foi aplicada 0,5 ml de solução de PBS. Ao Grupo II foi aplicada uma solução de células-tronco e PBS ( $2 \times 10^5$  de células-tronco diluídas em 0,5ml de PBS).

Aguardou-se 28 dias e então todos os animais foram submetidos ao procedimento de eutanásia para obtenção de peças anatomopatológicas para estudo histológico.

As amostras foram fixadas em formalina neutra tamponada 10% (Sigma) e incorporadas em parafina. Os cortes foram realizados com 5  $\mu\text{m}$ , deparafinizados e coradas com Hematoxilina e Eosina (HE) e corante Tricrômio de Masson (MT).

As lâminas foram visualizadas em um microscópio Olympus BX41 e foi utilizado o sistema de captura de imagens CoolSNAP-Procf para fazer o registro fotográfico das imagens. As imagens foram analisadas por um histologista para avaliar as peculiaridades de cada grupo.

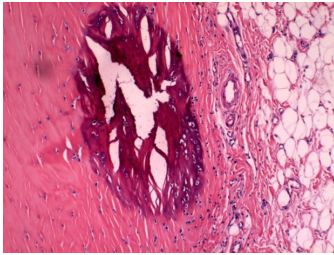
### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Observou-se histologia normal com fibras colágenas alinhadas e orientadas, característica do tecido conjuntivo denso que constitui o tendão e sem presença de lesão nos animais que foram eutanasiados ao início do experimento (Figura 1).

Em todas as lâminas dos animais do estudo que sofreram tendinopatia, o aspecto histológico de fibrose foi observado. A intensa deposição de fibras colágenas densas, modeladas ou não, com fibroblastos isolados típicos esteve presente em todos os animais (Figura 2).

Observa-se que a quantidade de deposição de tecido fibroso varia nos membros do mesmo grupo, mas é similar entre os grupos. Podemos notar que a quantidade de fibroblastos ao redor da lesão apresentava variabilidade de um grupo para o outro.

Entretanto, foi observada uma maior presença de vasos sanguíneos entorno da lesão no grupo em que foi utilizado células-tronco (Figura 3).



**Fig. 3 Área de maior concentração vascular em torno da lesão**

#### **4. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Apesar de um discreto exsudato inflamatório ser observado em uma única lâmina de um único grupo (Grupo III), não houve nenhum tipo de processo inflamatório maior que indicasse rejeição às células-tronco de origem humana.

O processo cicatricial avaliado histologicamente foi semelhante entre os grupos estudados. Tanto no grupo controle (em que foi administrada somente solução salina após a tendinopatia) quanto no grupo que recebeu a suspensão com células tronco a avaliação tecidual demonstrou a mesma composição. O único aspecto diferencial notado foi a presença maior de neovasos nas peças em que foram utilizadas células-tronco.

Portanto, sugere-se a continuidade do estudo, principalmente através de maior amostragem e maior tempo para reavaliação histológica e mecânica do tendão após a lesão.

Com os presentes resultados pode-se inferir um possível benefício da utilização de células tronco através da melhor vascularização tendínea, mas ainda sem evidências para a prática clínica.

## **REFERÊNCIAS**

YOUNG, M, StemCell Applications in Tendon Disorders: A Clinical Perspective. **Hindawi** Publishing Corporation, Stem Cells International 2012.

TATARIE ET AL. Delleterious effects of local corticosteroids injections on the Achilles tendon of rats. **Arch Orthop Trauma Surg**. 2001, *vol. 121* , p333 – 337

GIBLE, J. ET AL. In vitro Differentiation Potential of Mesenchymal Stem Cells. **Transfus Med Hemother** 2008, *vol. 35*, p228–238

Z. Yin, X. ET AL. "Stem cells for tendon tissue engineering and regeneration," **Expert Opinion on Biological Therapy**. 2010, *vol. 10, no. 5*, p. 689–700.

