

UNIVERSIDADE DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM MEDICINA
REGENERATIVA E QUÍMICA MEDICINAL

SANDRO BARALDI MOREIRA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO CELULAR OSTEOGÊNICO
APÓS CULTIVO 3D DE CÉLULAS TRONCO DA BURSA SUBACROMIAL E DA
MEDULA ÓSSEA DO ÚMERO PROXIMAL DE HUMANO.

Araraquara, SP

2020

SANDRO BARALDI MOREIRA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO CELULAR OSTEOGÊNICO
APÓS CULTIVO 3D DE CÉLULAS TRONCO DA BURSA SUBACROMIAL E DA
MEDULA ÓSSEA DO ÚMERO PROXIMAL DE HUMANO.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal da Universidade de Araraquara – UNIARA – como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

ORIENTADOR: Prof. Dr. André Capaldo Amaral

Araraquara, SP

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

M839a Moreira, Sandro Baraldi

Avaliação do potencial de diferenciação celular ostogênico após cultivo 3D de células tronco da Bursa sobacromial e medula óssea do úmero proximal de humano/Sandro Baraldi Moreira. – Araraquara: Universidade de Araraquara, 2020.

61f.

Dissertação (Mestrado)- Curso de Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal – Universidade de Araraquara

Orientador: Prof. Dr.André Capaldo Amaral

1. Medicina regenerativa. 2. Células tronco mesenquimais.
3. Ortopedia. 4. Ombro. 5. Lesão do manguito rotador. 6. Esferoides Celulares. I. Título.

CDU 577.1:66



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
BIOTECNOLOGIA EM MEDICINA REGENERATIVA
E QUÍMICA MEDICINAL – PPGb-MRQM



SANDRO BARALDI MOREIRA

Dissertação apresentada a Universidade de Araraquara - UNIARA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Araraquara, 14 de fevereiro de 2020.

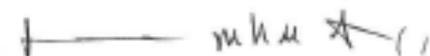
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. ANDRÉ CAPALDO AMARAL (Orientador)
Universidade de Araraquara - UNIARA



Prof. Dr. LUIS HENRIQUE MONTREZOR
Universidade de Araraquara - UNIARA



Prof. Dr. RODRIGO BEZERRA DE MENEZES REIFF
Universidade Federal de São Carlos - UFSCar

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a toda minha família pelo apoio incondicional, amor, união e compreensão pelo tempo dispendido. Em especial, aos meus pais, Alcides e Eliana, minha tia Silvana, minha esposa Larissa, meus dois filhos, Lucas e Lara e meus sogros, Tânia e José Polis.

AGRADECIMENTO

Agradeço ao Prof. Dr. André Capaldo Amaral pelo exemplo profissional, apoio, incentivo e orientação deste trabalho acadêmico.

A UNIARA, pela oportunidade profissional de lecionar no curso de medicina e fazer parte do programa de pós-graduação em Biotecnologia.

A toda equipe do LECER, Laboratório de Ensaio Celulares e Engenharia Regenerativa, em especial às biólogas Gabriela Gomes Cardoso Gastaldi e Renata Aquino de Carvalho.

Aos examinadores da banca, Dr. Rodrigo Bezerra de Menezes Reiff e Dr Luiz Henrique Montezor.

A equipe de Ombro e Cotovelo do Hospital Servidor Estadual do Estado de São Paulo por me proporcionarem no ano de 2013 todo aprendizado nas patologias do ombro e cotovelo. Dr. Rômulo Brasil Filho, Dr. Cantídeo S. F. Filho, Dr. Fabiano R. Ribeiro, Dr. Antônio C. T. Junior, Dr. Miguel P. Costa, Dra. Fernanda M. B. Porto e Dr. José Alano B. de Lima.

Ao departamento de Ortopedia e Traumatologia do HC-FMRP-USP, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, pelos treinamentos e ensinamentos em Ortopedia e Traumatologia.

A equipe cirúrgica do Hospital Carlos Fernando Malzoni da cidade de Matão-SP, local de trabalho e realização da cirurgia.

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo,
qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim”.

Chico Xavier 1910- 2002

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMO.....	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	14
2.1 MANGUITO ROTADOR DO OMBRO	14
2.2 TENDINOPATIAS DO MANGUITO ROTADOR	17
2.3 MEDICINA REGENERATIVA.....	22
2.4 TERAPIA CELULAR NAS LESÕES DO MANGUITO ROTADOR.....	26
3. OBJETIVOS.....	30
3.1 OBJETIVO GERAL	30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 SUJEITO.....	31
4.2 EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DAS CÉLULAS TRONCO DA MEDULA ÓSSEA DO ÚMERO PROXIMAL (CTMs-MOh).....	31
4.3 EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DAS CÉLULAS TRONCO DA BURSA SUBACROMIAL (CTMs-BSh)	32
4.4 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E DETERMINAÇÃO DO PERFIL MESENQUIMAL DAS CTMs.....	33
4.5 MANUTENÇÃO EM CULTIVO.....	33
4.6 CONSTITUIÇÃO DOS ESFEROIDES CELULARES	34
4.7 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA	34
5. RESULTADOS	36
5.1 SUJEITO.....	36
5.2 EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DAS CÉLULAS TRONCO DA MEDULA ÓSSEA DO ÚMERO PROXIMAL (CTMs-MOh) E CÉLULAS TRONCO DA BURSA SUBACROMIAL (CTMs-BSh).	37
5.3 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E DETERMINAÇÃO DO PERFIL MESENQUIMAL DAS CTMs.....	41
5.4 CONSTITUIÇÃO DOS ESFEROIDES CELULARES	43

5.5 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA DAS CTMs-MOh e CTMs-BSh	45
6. DISCUSSÃO.....	48
7. CONCLUSÃO.....	51
8. ANEXOS.....	52
Anexo A: Aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UNIARA (10 de Abril de 2019)	52
Anexo B: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	53
9. REFERÊNCIAS.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CTMs	Células Tronco Mesenquimais
CTEs	Células Tronco Embrionárias
CTMs-MOh	Células Tronco Mesenquimais da Medula Óssea Humana
CTMs-BSh	Células Tronco Mesenquimais da Bursa Subacromial Humana
PRP	Plasma Rico em Plaquetas
AMO	Aspirado de Medula Óssea
CMO	Concentrado de Medula Óssea
iPSC	<i>“induced pluripotent stem cell”</i>
DMEM	<i>Dulbecco’s Modified Eagle Medium</i>
SBF	Soro Bovino Fetal
PBS 1x	Solução Tampão Fosfato-Salino
UCLA	<i>University of California at Los Angeles Shoulder Rating Scale</i>
EVA	Escala de Avaliação Visual da Dor
BC	<i>buffy coat</i>
RM	Ressonância Magnética
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Peças anatômicas do cingulo escapulo umeral humano nas vistas superior, posterior e anterior. Músculos que compõem o manguito rotador no ombro: músculo do supraespinhal*, infraespinhal **, redondo menor *** e subescapular **** 14
- Figura 2** - Corte histológico das camadas da entese do manguito rotador no ombro. FC: Fibrocartilagem. FC-NC: fibrocartilagem não calcificada. FC-C: fibrocartilagem calcificada. Vasos sanguíneos estão ausentes na fibrocartilagem. 15
- Figura 3** - Representação esquemática macroscópica e microscópica da histologia tendínea do manguito rotador do ombro. Os tendões do manguito rotador que se inserem na tuberosidade umeral, pertencentes ao cingulo escapulo-umeral, são constituídos histologicamente (A) pelo componente celular, o tenócito, e a matriz extracelular (B). A matriz extracelular é formada principalmente de fibras de colágeno tipo I (C), dispostas linearmente por subunidades de tropo colágeno, constituídos por sua vez de sequências de aminoácidos..... 17
- Figura 4** - Teoria do ciclo da tendinose. Desenvolvimento de uma tendinopatia crônica devido ao inadequado reparo dos tendões e insuficiente restauração da arquitetura original das fibras de colágeno. Um aumento da demanda no tendão leva a um reparo inadequado do colágeno, morte do tenócitos, redução da produção de colágeno e predisposição para novas lesões. .. 19
- Figura 5** - Representação esquemática da medicina regenerativa. Emprega ferramentas e dispositivos baseados em células progenitoras, moléculas sinalizadoras do processo de reparação tecidual e a bioengenharia dos suportes. 23
- Figura 6** - Otimização das fases do processo de cicatrização tecidual: fases inflamatória, proliferativa e de remodelação. Encurtamento temporal sob aplicação das ferramentas da medicina regenerativa. 23
- Figura 7** Cascata de reparação tecidual natural: Fases inflamatória, proliferativa e de maturação, durante as quais células progenitoras são recrutadas ao sítio de lesão a fim de se proliferarem, promoverem a revascularização, secreção de matriz extracelular e remodelarem o tecido regenerado. 25
- Figura 8** - Célula Tronco Mesenquimal pode se autorreplicar, proliferar, assim como se diferenciar em outras linhagens celulares do sistema musculoesquelético (células progenitoras multipotentes) repovoando o tecido lesado. 27
- Figura 9** - Células Tronco Mesenquimais participam da regeneração tecidual por diferentes vias. Elas se diferenciam na linhagem celular específica do tecido lesado e repovoam os nichos de células perdidas (A). Elas também influenciam indiretamente a regeneração tecidual através da secreção de fatores de crescimento, que promovem a revascularização e neoanginogênese, proliferação e diferenciação celular dentro do tecido (B), E por fim, modulam o processo inflamatório (C)..... 27
- Figura 10** - Imagens de radiografia do ombro esquerdo nas incidências Anteroposterior (A), Perfil (B) e Axilar (C), demonstrando ausência de alterações ósseas. 36
- Figura 11** - Imagens de RM ombro esquerdo, ponderado em T2, demonstrando uma lesão pequena e completa em espessura do tendão do supraespinhal em sua inserção na tuberosidade maior umeral, sinalizada pela seta branca nos cortes coronal (A) e sagital (B).. 37
- Figura 12** - Posicionamento em “cadeira de praia”. Face lateral do braço esquerdo *. Cabeça do paciente**. Referências anatômicas do ombro esquerdo como a articulação acromioclavicular, acrômio (seta azul) e espinha da escápula (seta vermelha) demarcad..... 38
- Figura 13** - Visão artroscópica do momento da captura de uma amostra de bursa subacromial (*) com uma pinça grasper de artroscópica. Abaixo da bursa e da pinça grasper, o tendão do supraespinhal **. 38

- Figura 14** - Visão artroscópica da lesão do tendão supraespinhal pela face subacromial, com a ótica pelo portal posterior (A) e pelo portal lateral (B). Visualizada a rotura do tendão supraespinhal *, que deveria estar inserido na tuberosidade umeral..... 39
- Figura 15** - Imagem radiográfica por escopia da etapa de aspiração de sangue da medula óssea do úmero proximal do ombro esquerdo. Cânula de lipoaspiração pelo pertuito de inserção da âncora até a região metafisária *. Ótica do artroscópico posicionada pelo portal lateral **.....39
- Figura 16** - Aspiração de sangue da medula óssea do úmero proximal no ombro esquerdo pelo portal artroscópico anterolateral. Aspiração com uma cânula metálica de lipoaspiração (seta azul) acoplada a uma seringa de 60 ml *. Ótica do artroscópico posicionada pelo portal posterior **.....40
- Figura 17** - Resultado da centrifugação do sangue da medula óssea umeral com solução de Ficoll. Tubo de ensaio com as seguintes camadas separadas: camada plasmática (A), uma camada intermediária contendo a maior concentração de células mononucleares (*buffy coat*-seta branca), camada da solução Ficoll (B) e camada constituída de eritrócitos e granulócitos (C).....41
- Figura 18** - Foto por microscopia com 10x de aumento, 4º dia pós-lavagem, da cultura de células extraídas da bursa subacromial (A) e da medula óssea (B). Setas azuis indicam células de morfologia fusiforme e aderidas na garrafa, enquanto setas pretas indicam células não aderidas..... 41
- Figura 19** - Foto por microscopia com 10x de aumento, 11º dia pós-lavagem, da cultura de células extraídas da bursa subacromial (A) e da medula óssea (B). Nota-se o aspecto morfológico fusiforme de ambas as fontes, porém uma expansão intensa de células..... 42
- Figura 20** - Fotos por microscopia ótica (20x) em meio de diferenciação adipogênica (A e B), com a presença de células alongadas e fusiformes não diferenciadas (setas azuis) e células com concentração citoplasmática de glóbulos de gordura coradas com O 43
- Figura 21** - Fotografia do contra molde * e do molde de agarose** contendo poços de cultivo celular para formação de aglomerados, esferoides celulares com diâmetro de 500 µm cada. . 43
- Figura 22** - Foto por microscopia ótica de esferoides celulares de CTMs cultivados em moldes de agarose nos aumentos 4x (A) e 10x (B) no primeiro dia de semeadura. Cada esferoide apresenta 500 µm de diâmetro. No quarto dia de semeadura, é possível visualizar os mesmos esferoides nos aumentos 4x (C) e 10x (D), porém com menores diâmetros, decorrentes das interações e compactações celulares em conformação 3D 44
- Figura 23** - Foto por microscopia ótica de 10x de aumento de esferoides celulares de CTMs-BSh no primeiro dia (A) e quarto dia (B) após transferência dos esferoides (seta branca) aos poços de cultivo isentos de meio específico. É possível notar esferoides de dimensões distintas, resultantes da fragmentação durante a transferência, o desprendimento celular dos esferoides e a ocupação destas células no substrato, representando o processo de adesão celular. Este processo é mais intenso no quarto dia pós-transferência (B), com menor diâmetro dos esferoides, maior taxa de ocupação celular, espraiamento e adesão celular.....45
- Figura 24** - Foto por microscopia ótica com aumentos de 10x e 40x de CTMs-MOh (A e B) e de CTMs-BSh (C e D) após quatorze dias em meio de diferenciação osteogênica coradas com Alizarina Red. Na figura A é possível notar duas regiões de matriz óssea corada 46
- Figura 25** - Representação gráfica da densidade ótica (DO), estabelecida por espectrofotometria por absorbância do Cálcio a 410 nm, das culturas celulares CTMs-MOh e CTMs-BSh 14 dias após a indução de diferenciação osteogênica. *p≤0,05 47

RESUMO

Em ortopedia, uma das entesopatias mais frequentes é a lesão do manguito rotador no ombro. Apesar do avanço tecnológico e cirúrgico de reparo tendíneo, altos índices de falha na cicatrização são observados. No intuito de melhorar e potencializar a regeneração tendínea, a medicina regenerativa determina um papel cada dia mais promissor. O objetivo deste trabalho foi avaliar e comparar o potencial de diferenciação osteogênica após o cultivo 3D de células tronco mesenquimais (CTMs) obtidas de duas fontes do ombro de humano: medula óssea umeral (CTMs-MOh) e bursa subacromial (CTMs-BSh). Para tal, as CTMs do ombro de um voluntário foram extraídas durante o procedimento cirúrgico de reparo artroscópico. Estas células foram isoladas, expandidas e caracterizadas quanto ao perfil mesenquimal pelo potencial de diferenciação adipogênica e osteogênica. Após caracterização, foram constituídos esferoides multicelulares pelo método de superfície não aderente, transferidos e cultivados em meio de indução de diferenciação osteogênica por 14 dias. A diferenciação foi estabelecida por meio da análise qualitativa histológica da produção de matriz óssea pelo método colorimétrico com *Alizarina Red* e quantitativa pela dosagem de Cálcio da matriz mineralizada. Foram verificados que a extração de CTMs da fonte bursal foi mais eficiente que da medula óssea devido maior contingente celular e que ambas as fontes, após cultivo 3D, apresentaram diferenciação osteogênica, com superioridade da fonte medular. Concluiu-se que as CTMs-MOh apresentaram maior potencial de diferenciação osteogênica que as CTMs-BSh após o cultivo 3D.

Palavras-chave: Medicina Regenerativa; Células Tronco Mesenquimais; Ortopedia, Ombro; Lesão do Manguito Rotador; Esferoides Celulares.

ABSTRACT

In orthopedics, one of the most frequent enthesopathies is rotator cuff injury to the shoulder. Despite technological and surgical advancement of tendon repair, high rates of healing failure are observed. In order to improve and enhance tendon regeneration, regenerative medicine determines an increasingly promising role. The aim of this study was to evaluate and compare the osteogenic differentiation potential after 3D culturing of mesenchymal stem cells (MSCs) obtained from two sources of the human shoulder: humeral bone marrow (MSCs-MOh) and subacromial bursa (MSCs-BSh). To this end, shoulder volunteer MSCs were extracted during the arthroscopic repair surgical procedure. These cells were isolated, expanded and characterized for mesenchymal profile by the potential for adipogenic and osteogenic differentiation. After characterization, multicellular spheroids were constituted by the non-adherent surface method, transferred and cultured in osteogenic differentiation induction medium for 14 days. The differentiation was established by histological qualitative analysis of bone matrix production by Alizarin Red colorimetric method and quantitative by mineralized matrix Calcium dosage. It was verified that the extraction of MSCs from the bursal source was more efficient than the bone marrow due to a larger cell contingent and that both sources, after 3D cultivation, presented osteogenic differentiation, with superiority of the medullary source. It was concluded that MSM-MOh presented higher osteogenic differentiation potential than MSM-BSh after 3D cultivation.

Keywords: Regenerative Medicine; Mesenchymal Stem Cells; Orthopedics, Shoulder; Rotator Cuff Injury; Cellular spheroids; 3D Cell Culture

1. INTRODUÇÃO

Uma das queixas mais comuns de pacientes no consultório médico ortopédico é a dor no ombro. A lesão do manguito rotador é uma causa importante de dor e incapacidade funcional, principalmente no idoso (WILLIAMS et al., 2004). A principal etiologia para a ruptura tendínea é de origem degenerativa, ou seja, com o envelhecimento do corpo humano há uma diminuição na qualidade e na resistência da entese, interface tendão osso na tuberosidade umeral, que evolui para desinserção do manguito rotador, causando dor e disfunção (GOMOLL et al., 2004; RILEY, 2004).

Apesar do grande avanço mecânico das técnicas cirúrgicas de reparo do manguito rotador e do aprimoramento tecnológico dos implantes ortopédicos, tais como: fios de sutura de alta resistência; âncoras; passadores de sutura tendínea e diferentes conformações de reparo: fileira simples e dupla fileira (BICOS et al., 2007; COLE et al., 2007; FEALY et al., 2006; MA et al., 2004; MAHAR et al., 2005; MAZZOCCA et al., 2005; REED; GLOSSOP; OGILVIE-HARRIS, 1996; SMITH et al., 2006; ZHENG; HARRIS; ANDREWS, 2008); altas taxas de falha na cicatrização tendínea têm sido reportadas, entre 38% a 94%, principalmente nas lesões grandes e extensas do manguito rotador (BOILEAU et al., 2005; GALATZ et al., 2004; YOO; CHO; RHEE, 2013; KIM et al., 2014; NAMDARI et al., 2014; BISHOP et al., 2006; TASHJIAN et al., 2010).

Acredita-se que uma das razões para esses altos índices de falha após reparo tendíneo decorra das alterações degenerativas intrínsecas do tendão, sobretudo relacionada à baixa celularidade e suprimento sanguíneo na entese. No intuito de potencializar a cicatrização do tendão na tuberosidade umeral, seja como coadjuvante durante o procedimento cirúrgico ou até mesmo numa etapa preventiva à cirurgia, a medicina regenerativa tem desempenhado um papel cada dia mais promissor (RODEO et al., 2007; IDEO et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2010; SCHMITT et al., 2012; ZHAO et al., 2013; LI et al., 2015; DINES et al., 2017, XIN et al., 2017).

Dentre as estratégias adotadas pela medicina regenerativa se sobressai a terapia celular, caracterizada pela utilização de células tronco mesenquimais (CTMs). Estas se caracterizam pelo potencial de diferenciação numa variedade de células de tecidos no adulto, tais como tenócitos, condrócitos, osteoblastos e fibroblastos, bem como secreção de múltiplos fatores de crescimento para estabelecer um ambiente regenerativo. Os benefícios estão relacionados à capacidade de autorrenovação, de diferenciação multilinhagem e da modulação do microambiente, resultante da síntese e liberação de citocinas e fatores de crescimento,

atuando de forma autócrina e parácrina (PATEL; SHAH; SRIVASTAVA, 2013). Ao desempenhar essas funções, as CTMs agem sinergicamente aos eventos orquestrados do processo de reparo tecidual, contribuindo com a modulação do processo inflamatório, com o processo de revascularização, com a restauração da matriz extracelular e também com o repovoamento por células diferenciadas específicas do tecido (AMINI et al., 2012; SCHMITT et al., 2012; HENKEL et al., 2013; LIU et al., 2013; COX et al., 2015; MITCHELL et al., 2016; ROSENTHAL; BADYLAK, 2016).

Diversos estudos em modelos animais e ainda escassos ensaios clínicos têm apontado que o aporte biológico no reparo tendíneo com fatores de crescimento e CTMs aumenta a regeneração tendínea, com superioridade na cicatrização e menor índice de reruptura tendínea do manguito rotador. (HERNIGOU et al., 2014; VAUDREUIL; VO; SOWA, 2017; LOPEZ-VIDRIERO et al., 2010; SÁNCHEZ MÁRQUEZ et al., 2011; RANDELLI et al., 2011; GULOTTA et al., 2009; ISAAC et al., 2012; MILANO et al., 2013).

Dentre as fontes de obtenção de CTMs do ombro de humanos, a medula óssea é uma fonte viável. Durante a cirurgia de reparo do manguito rotador, elas podem ser obtidas da cabeça umeral sem prejuízo ao paciente e ao andamento da cirurgia (MAZZOCCA et al., 2010). Outra fonte de obtenção de CTMs é a bursa subacromial. Ela representa o tecido sinovial extra articular, localizado anatomicamente entre o manguito rotador e o acrômio e promove um mecanismo de deslizamento entre estas estruturas, além de propriedades biológicas (UTSUNOMIYA et al., 2013; STEINERT et al., 2015).

Tradicionalmente para estudos *in vitro*, as células são cultivadas em cultura 2D, dispostas em monocamadas. No entanto, a cultura em 3D é considerada mais fisiológica que a 2D por mimetizar mais precisamente as propriedades de estrutura e microambiente celular *in vivo*. (JOCKENHOEVEL et al., 2001; CHEN et al., 2002; CHEN et al., 2013; PUENTE; LUDEÑA, 2014; COSTA et al., 2016; DUVAL et al., 2017; HO et al., 2017). Não obstante, a técnica em 3D surge como uma estratégia da medicina regenerativa na etapa de entrega dessas células no ambiente de lesão tecidual.

Embora esteja estabelecido o papel promissor da medicina regenerativa nas lesões do manguito rotador do ombro, pouco se sabe sobre as fontes de CTMs após o cultivo em esferoides celulares potencialmente provedoras de suporte biológico à regeneração osteotendínea. Espera-se, com os conhecimentos gerados nessa pesquisa, contribuir com a melhor compreensão do potencial destas fontes celulares e com a apropriada parametrização da terapia celular no tratamento das lesões do manguito rotador em humanos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 MANGUITO ROTADOR DO OMBRO

O cingulo do membro superior é composto por quatro articulações: a glenoumeral, acromioclavicular, escapulo torácica e esterno clavicular. O ombro é uma articulação complexa pelo seu delicado equilíbrio entre mobilidade e estabilidade. A articulação glenoumeral possui estabilizadores estáticos e dinâmicos. Os restritores dinâmicos são os músculos do manguito rotador e tendão da cabeça longa do bíceps. Compõem os tendões do manguito rotador o supraespinhal, infraespinhal, redondo menor e subescapular, conforme ilustrado na figura 1. Estes quatro tendões se inserem nas tuberosidades maior e menor do úmero proximal e permitem as mobilidades de elevação, rotação interna, externa, adução, abdução e circundação do ombro, em sinergismo com outros grupos musculares.

Figura 1 - Peças anatômicas do cingulo escapulo umeral humano nas vistas superior, posterior e anterior. Músculos que compõem o manguito rotador no ombro: músculo do supraespinhal*, infraespinhal **, redondo menor *** e subescapular ****.



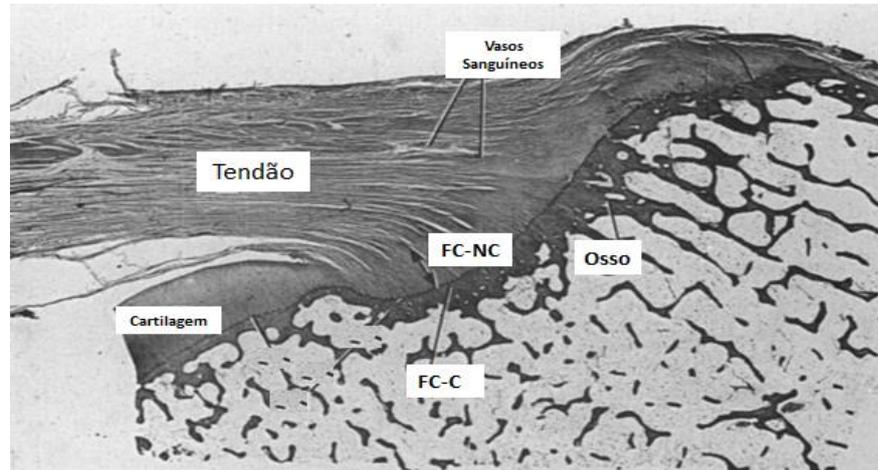
Fonte: Gobbi; Espregueira-Mendes; Lane; Karahan (2017, p. 218)

Dor no ombro representa a terceira queixa ortopédica mais comum (UMER; QADIR; AZAM, 2012). A tendinopatia do manguito rotador é uma causa frequente de dor no ombro, sendo o tendão do supraespinhal o mais acometido. Seu ventre muscular se origina na borda posterior da escápula, superior à espinha da escápula e se insere na tuberosidade maior do úmero. O tendão do supraespinhal está sujeito às forças de tensão e compressão entre o úmero e o arco coracoacromial, formado pelo coracóide, acrômio e ligamento coracoacromial. É em sua inserção que ocorre a maioria de suas lesões.

Histologicamente, conforme figura 2, a entese do tendão do supraespinhal é dividido em quatro zonas: Zona I, tendão propriamente dito, é constituída de colágeno tipo I e pequena

quantidade de decorin. Zona II, também conhecida como fibrocartilagem não mineralizada, contém colágenos II e III, com pequena quantidade dos tipos I, IX e X. Na Zona III, ocorre uma mineralização da fibrocartilagem, com deposição de colágenos II, X e agrecan. A zona IV é formada por fibras de colágeno I ancoradas no osso (DEAN BJ et al., 2012).

Figura 2 - Corte histológico das camadas da entese do manguito rotador no ombro. FC: Fibrocartilagem. FC-NC: fibrocartilagem não calcificada. FC-C: fibrocartilagem calcificada. Vasos sanguíneos estão ausentes na fibrocartilagem.



Fonte: Adaptado de Benjamin et al. (1986).

Tanto o desenvolvimento quanto a maturação da entese são pouco compreendidos. Sabe-se que após o reparo cirúrgico, ocorre uma cicatriz fibrosa, sem um gradiente organizacional de colágeno e de mineralização, com capacidade mecânica inferior à fibrocartilagem nativa. Alguns processos no desenvolvimento e maturação da entese são gradualmente elucidados, como a importância da carga muscular e a presença de fatores gênicos moleculares de transcrição, tais como scleraxis (Secex) e Sox9, envolvidos na diferenciação de células progenitoras em tenócitos e condrócitos. No entanto, ainda não está claro como as atividades celulares são coordenadas neste processo (JENSEN P.T., LAMBERTSEN K.L., FRICH L.H., 2017).

Na entese, o componente celular sofre mudanças graduais de diferenciação, representado nas zonas correspondentes. Na Zona I estão presentes os tenócitos alongados. Zona II, células arredondadas, os fibrocondrócitos. Zona III, condrócitos hipertróficos dispostos em coluna e por fim, na Zona IV, tecido ósseo denso. Acredita-se que a mineralização ocorre com a expressão do colágeno tipo X pelos condrócitos hipertróficos, mais presente na fibrocartilagem mineralizada (ossificação endocondral). À medida que as células se diferenciam, elas mudam a expressão do tipo colágeno, criando o gradiente de

matriz extracelular mineralizada de uma entese madura (JENSEN P.T., LAMBERTSEN K.L., FRICH L.H., 2017).

O conceito atual da etiologia das tendinopatias do manguito rotador, principalmente no tendão supraespinhal, decorre de cargas e estresse que excedem a capacidade de reparo tendíneo pelos tenócitos (componente celular) e estes falham na deposição de matriz extracelular organizada em fibras de colágeno tipo I de maior resistência tênsil. A principal etiologia acredita-se ser de origem degenerativa do tendão, desencadeando as tendinopatias agudas, subagudas e crônicas, representadas pelas tendinoses e rupturas parciais e totais em sua inserção. Sabe-se que a maioria das rupturas ocorre no ponto de maior estresse mecânico, na face articular da inserção do supraespinhal (SPARGOLI, 2018).

Ainda quanto à etiologia das tendinopatias, apesar de causa degenerativa, é necessário listar fatores intrínsecos como idade, vascularização e componente genético e fatores sistêmicos como condições autoimunes e inflamatórias, diabetes. Dentre fatores extrínsecos destacam-se traumas, síndrome do impacto, forma de acrômio e alterações cinemáticas da escápula (CARDOSO et al., 2019).

Microscopicamente, nas tendinopatias ocorrem alterações metabólicas nos tenócitos e na matriz extracelular. Com a hipóxia, há uma reinervação com aumento de nociceptores e neurotransmissores como substância P e glutamato, além de uma neovascularização. Os tenócitos perdem sua forma original, alguns entram em apoptose, outros assumem um fenótipo fibrocondrogênico (metaplasia condroide), incapazes de restaurar uma organização da matriz extracelular de colágeno tipo I, em que passa a predominar colágeno tipo III, com menor resistência tensil. Também ocorre degeneração com infiltração gordurosa muscular (SPARGOLI, 2018).

Quanto ao tratamento das tendinopatias, na ausência de rupturas tendíneas, recorre-se ao tratamento incruento, baseado principalmente no uso de medicamentos orais e terapias manuais para alívio dos sintomas e melhora da função. Na presença de rupturas ou falha do tratamento conservador, está bem estabelecido o tratamento cirúrgico de reparo do tendão no osso através da técnica cirúrgica aberta ou artroscópica. A fim de melhorar os resultados cirúrgicos e reduzir os índices de falha na cicatrização tendínea com o evento de rerupturas, soluções biológicas de reforço têm sido apresentadas pela medicina regenerativa (RANDELLI et al., 2016).

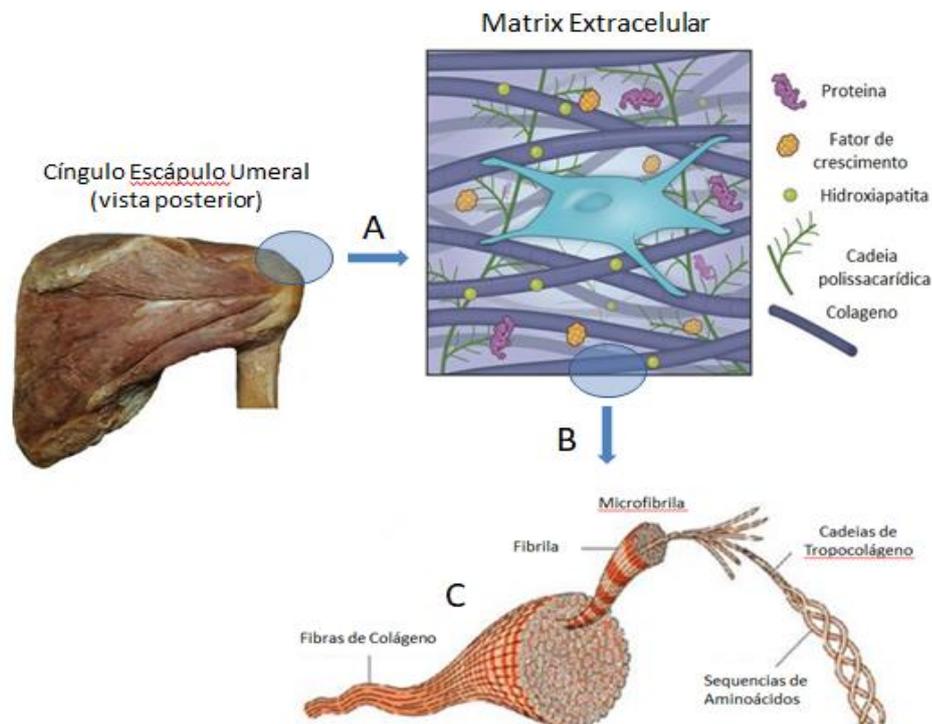
Portanto, no intuito de melhorar o microambiente no sítio de reparo, promover a ativação de vias de sinalização e o recrutamento de células progenitoras envolvidos no processo fisiológico de reparo tendíneo, evitar a formação de uma cicatriz na entese com

menor resistência tensil; investigações com fatores de crescimento, engenharia de tecidos e terapia celular com CTMs têm sido apresentadas no âmbito da nova ciência da medicina regenerativa.

2.2 TENDINOPATIAS DO MANGUITO ROTADOR

Histologicamente, conforme ilustrado na figura 3, um tecido é constituído por células, matriz extracelular e uma substância fluída, o fluido extracelular que banha este tecido. O tendão é formado pelo componente celular, tenócitos, que produzem e interagem com a matriz extracelular, formada basicamente de fibras de colágeno tipo I. As fibras colágenas são compostas de subunidades de tropo colágeno polimerizadas linearmente. São as sequências de aminoácidos da cadeia α (glicina, prolina, hidroxiprolina e hidroxilisina) que permitem a classificação em mais de 20 tipos de colágeno. A resistência às forças de tensão ocorre graças às fibras resistentes e inelásticas formadas pelas proteínas de colágeno.

Figura 3 - Representação esquemática macroscópica e microscópica da histologia tendínea do manguito rotador do ombro. Os tendões do manguito rotador que se inserem na tuberosidade umeral, pertencentes ao cingulo escapulo-umeral, são constituídos histologicamente (A) pelo componente celular, o tenócito, e a matriz extracelular (B). A matriz extracelular é formada principalmente de fibras de colágeno tipo I (C), dispostas linearmente por subunidades de tropo colágeno, constituídos por sua vez de sequências de aminoácidos.



Fonte: O próprio autor.

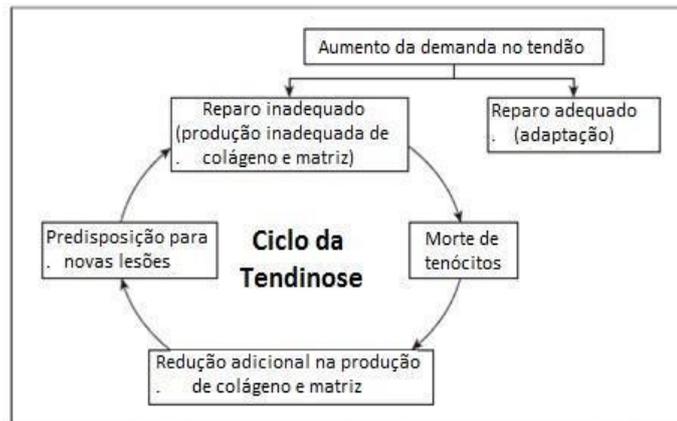
Os tendões são a interface entre o músculo e osso. Eles apresentam baixa taxa metabólica, são pouco vascularizados e celularizados (KANNUS, 2000). São submetidos às forças mecânicas de tração pela função que desempenham. Esta relativa baixa vascularização predispõe a uma recuperação mais retardada quando lesado. Quando há uma falha nos mecanismos fisiológicos de reparo tendíneo diante do estresse, ocorre a tendinopatia, um desarranjo na matriz extracelular, condição esta dolorosa (CARDOSO et al., 2019).

Tendinopatias representam aproximadamente 30% das queixas musculoesqueléticas. Clinicamente, a tendinopatia pode levar à cronicidade e dor. Embora alívio da dor seja importante no tratamento do paciente, as modalidades atuais de tratamento baseiam-se no alívio imediato da dor com o uso de medicamentos anti-inflamatórios, infiltrações de corticosteroides e imobilização. Estas terapias são questionáveis quanto à fundamentação sobre a histofisiopatologia das tendinopatias e não primam pelo rearranjo tecidual das fibras de colágeno, prerrogativa da medicina regenerativa (GALANG et al., 2015).

Apesar da fisiopatologia principal da tendinopatia ser de origem degenerativa e não inflamatória, a principal modalidade de tratamento continua ser infiltração de corticoide. Sabe-se que o uso intratendíneo de corticoide enfraquece o tendão e predispõe às rupturas (MACMAHON et al., 2009). Outra desvantagem, quando aplicado no subcutâneo, pode levar à atrofia gordurosa da camada da derme e despigmentação epitelial. Sistemicamente, pode suprimir hormônios adrenocorticotróficos e dificultar o controle glicêmico em pacientes diabéticos.

Alguns termos são usados para descrever desordens tendíneas: tendinites, tendinoses e rupturas. Por tendinite, entende-se um processo agudo, inflamatório. Termo em abandono pela ausência ou mínima presença de citocinas inflamatórias nas desordens dolorosas, preferindo-se o termo tendinopatia. Por tendinose, entende-se uma condição subaguda ou crônica com desarranjo das fibras de colágeno, em que houve uma falha no processo de reparo tendíneo promovido pelos tenócitos (figura 4). Já rupturas, evolução desfavorável final das tendinopatias, podem ser de espessura parcial ou total do tendão.

Figura 4 - Teoria do ciclo da tendinose. Desenvolvimento de uma tendinopatia crônica devido ao inadequado reparo dos tendões e insuficiente restauração da arquitetura original das fibras de colágeno. Um aumento da demanda no tendão leva a um reparo inadequado do colágeno, morte dos tenócitos, redução da produção de colágeno e predisposição para novas lesões.



Fonte: Adaptado de Leadbetter (1992).

Outro termo relacionado é a entesopatia. Entese é a porção do tendão que se ancora no osso. No ombro, os tendões do manguito rotador se inserem nas tuberosidades maior e menor umeral através da entese, uma fibrocartilagem que transmite e dissipa as forças de tração musculares do tendão ao osso.

As modalidades de tratamento das tendinopatias sob a concepção da medicina regenerativa baseiam-se na preservação e reorganização das fibras de colágeno tendíneas. Perfazem as seguintes técnicas de tratamento: fenestrações percutâneas com agulha, proloterapia, plasma rico em plaquetas (PRP) e aspirado de medula óssea (AMO) contendo células progenitoras, células tronco mesenquimais.

A primeira técnica, também conhecida por “*dry needle*”, com o auxílio da ultrassonografia, busca criar sangramentos em áreas de degeneração tendínea, estimular a angiogênese e proliferação fibroblástica, recrutamento de fatores de crescimento e assim, promover a reparação tendínea.

A proloterapia envolve a injeção de uma solução hiperosmolar de dextrose ao redor do tendão, solução irritativa e capaz de aumentar a síntese de colágeno no tendão pelos fibroblastos. O exato mecanismo não está bem elucidado.

Plasma rico em plaquetas é um produto autólogo e de fácil obtenção a partir do sangue periférico do paciente, que permite uma concentração supra fisiológica de plaquetas. Sabe-se que além do papel na hemostasia, as plaquetas participam do reparo tecidual ao liberar, de seus α grânulos quando ativados, diversas citocinas e fatores de crescimento (TGFb, PDGF, TGFb, IGF I, bFGF, VEGF) com atividades angiogênicas, pró-inflamatórias e quimiotáticas

para fibroblastos, células endoteliais e progenitoras dos tenócitos, além de estímulo para formação e deposição de matriz extracelular tendínea.

A terapia baseada no aspirado de medula óssea (AMO) tem por objetivo a aplicação intralesional de células progenitoras presentes na medula óssea, geralmente aspiradas através de perfurações na asa do íliaco, sendo deste sítio doador, maior volume obtido e menor morbidade comparada a outras fontes ósseas.

Das dezenas de milhões de células nucleadas do AMO, aproximadamente 0,01% a 1% são células tronco hematopoiéticas e 0,001% a 0,01% são células tronco mesenquimais, respectivamente caracterizadas pela expressão do antígeno CD34+ e Unidades Formadoras de Colônia, CFU-F (MURPHY et al., 2015). Em modelos animais, o uso combinado de PRP e CTMs têm mostrado superioridade na osteo-integração do reparo tendíneo (TENG et al., 2016; CANAPP et al., 2016).

Na prática clínica, poucos trabalhos têm relatado o uso de CTMs obtidas de aspirado de medula óssea no tratamento de lesões do manguito rotador.

Mazzocca e colaboradores (2010), em um estudo coorte com 23 pacientes, propuseram a obtenção segura, eficaz e rápida de concentrado de medula óssea, contendo células tronco mesenquimais, obtidas do úmero proximal durante cirurgia artroscópica de reparo do manguito rotador. Pelos orifícios de entrada das âncoras, através de um abocath 14, coletaram uma média 23 ml de sangue nos quais, após centrifugação com sucrose a 17,5%, obtiveram uma fração de $12,1 \pm 0,86 \times 10^6$ células nucleadas /ml, comparáveis à fonte de crista ilíaca para obtenção de células tronco mesenquimais.

Ellera Gomes e colaboradores (2012) investigaram o reparo do manguito rotador acrescido de células tronco mononucleadas da medula óssea autóloga de quatorze pacientes. Aspirado 100 ml medula óssea da crista ilíaca e obtido 10 ml gradiente com células mononucleares separadas com Filcoll. Obtiveram uma concentração média de $3,81 \times 10^8$ células mononucleadas. Concluíram que o reparo do manguito rotador seguido da implantação de concentrado de aspirado de medula óssea na borda do tendão roto e no “*footprint*” é uma alternativa segura e promissora na busca por uma melhor cicatrização tendínea do manguito rotador.

Beitzel e colaboradores (2013) compararam a coleta de CTMs do úmero proximal e do fêmur distal, durante cirurgias artroscópica do ombro de 55 pacientes e de joelho de 29 pacientes. A quantidade de células nucleadas por volume de concentrado de medula óssea nas duas localidades foi semelhante. Com relação ao úmero proximal, obtiveram $38,7 \times 10^6$ células nucleadas/ml e uma média de volume aspirado de 22,5 ml.

Utsunomiya e colaboradores (2013) isolaram e caracterizaram células tronco mesenquimais obtidas de diferentes fontes do ombro de humanos durante o reparo artroscópico do manguito rotador. Foram estudados quatro fontes no ombro de 16 participantes: sinóvia da glenoumeral, bursa subacromial, margem tendínea do supraespinhal roto e resíduos tendíneos inseridos na tuberosidade umeral. Concluíram que a bursa subacromial é uma excelente fonte de células tronco mesenquimais.

Hernigou e colaboradores (2014) relataram um estudo caso controle com 45 pacientes submetidos ao reparo artroscópico do manguito rotador acrescido de 12 ml de concentrado de medula óssea de crista ilíaca (CMO) com uma média de 54×10^3 (> 4200 CFU-F/ml x 12ml) contendo células tronco mesenquimais ao final do reparo no “*footprint*”. Concluíram uma melhora significativa na cicatrização e menor índice de re-ruptura no grupo dos pacientes tratados cirurgicamente com reforço biológico de CMO (13% de re-ruptura) comparado ao grupo controle sem aporte biológico (56%) num seguimento de 10 anos.

Steinert e colaboradores (2015) caracterizaram CTMs derivadas da bursa subacromial e as comparou com CTMs da medula óssea da cabeça femoral, em pacientes submetidos à artroplastia quadril. Concluíram que são similares quanto aos potenciais de proliferação e diferenciação condrogênica, osteogênica e adipogênica.

Centeno e colaboradores (2015) em um estudo prospectivo com 102 pacientes, 115 ombros, observaram resultados encorajadores da terapia de concentrado de medula óssea (CMO) no tratamento de osteoartrite glenoumeral e lesão manguito rotador. A terapia de infiltração de CMO obtido da crista ilíaca juntamente com plasma rico em plaquetas apresentou uma melhora substancial na dor e função do ombro destes pacientes.

Hernigou e colaboradores (2015) relataram a diminuição na concentração de CTMs na tuberosidade umeral nos pacientes submetidos ao reparo cirúrgico do manguito rotador. Nos 200 pacientes estudados, concluíram que a diminuição da quantidade de CTMs era estatisticamente correlacionada com os seguintes fatores: atraso entre início dos sintomas e reparo cirúrgico da lesão, número de tendões envolvidos, tamanho da lesão, infiltração gordurosa muscular e o aumento da idade do paciente. Nos pacientes menores que 55 anos, prevaleceu uma queda de 30 a 50%. Nos pacientes acima de 65 anos, prevaleceu uma diminuição maior que 70% na concentração de CTMs comparado ao grupo controle de 75 pacientes sem lesão.

Mora e colaboradores (2015), num artigo de revisão sobre terapia com CTMs em distúrbios do manguito rotador, concluíram que o uso clínico ainda é limitado. Embora

estudos em animais tenham demonstrado resultados promissores, a terapia nas lesões do manguito rotador deve ser considerada uma técnica experimental.

Nagura e colaboradores (2016) estudaram células progenitoras derivadas das margens do tendão supraespinhal roto de nove pacientes submetidos à cirurgia. As células foram isoladas e sua expansibilidade e potencial multilinhagem foram analisados *in vitro*. Caracterizaram nos fragmentos tendíneos descartados no ato cirúrgico a presença de CTMs e que estas apresentavam um padrão de diferenciação condrogênica para deposição de matriz de colágeno similar à ossificação endocondral da entese.

Schwab e colaboradores (2018) apresentaram um estudo caso controle sobre a implantação de tenócitos autólogos na tendinopatia do subescapular do ombro de um nadador, após falha no tratamento conservador. Concluíram que no atleta houve uma melhora significativa na função e na morfologia do tendão após a implantação, guiada por ultrassom, de tenócitos autólogos expandidos *in vitro* pós-biópsia do tendão palmar longo.

Campbell e colaboradores (2019) compararam a presença de CTMs de duas fontes no úmero proximal de 20 pacientes submetidos ao reparo artroscópico do manguito rotador. Coletaram fragmento ósseo do *footprint* umeral com uma rugina, média de 100 mg de osso, e fragmentos tendíneos da margem rota do supraespinhal, média de 60 mg. Concluíram um maior número de CTMs derivadas do tendão que do tecido ósseo. Portanto, uma importante fonte potencial de CTMs na formação da nova entese após reparo cirúrgico.

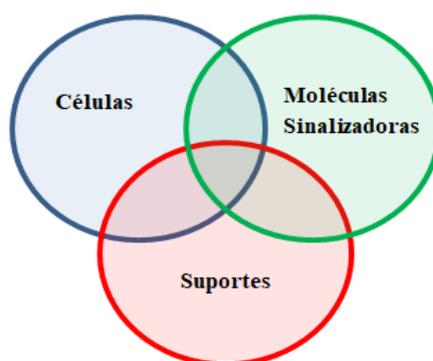
2.3 MEDICINA REGENERATIVA

O conceito de regeneração tecidual é antigo. A primeira referência data da mitologia grega, escrito por Hesíodo e Ésquilo. Prometeu, um titã que fora castigado por Zeus por ter roubado o fogo de Héstia e dado aos mortais, foi amarrado numa rocha e uma águia consumia seu fígado, que se regenerava no dia seguinte, por 30 mil anos. É no século 19 que ocorre um significativo avanço no conhecimento sobre o tema. A palavra “*Stem cell*” (“*stammzelle*”, German) data deste período por Haeckel e em 1907, o estudo da primeira célula tronco por Ross Granville Harison. O primeiro transplante de medula óssea com sucesso ocorreu em 1968 com Thomas e colaboradores. Em 1869, Goujon demonstrou a capacidade regenerativa da medula óssea ao reconstruir tecido ósseo. O termo Células Tronco Mesenquimais (CTMs) foi descrito primeiramente por Dr. Arnold Caplan em 1991. Em 1992, a primeira descrição do termo Medicina Regenerativa em artigo científico. Em 1996, criação do primeiro animal clonado, a ovelha Dolly. Em 1999, primeiro órgão produzido em laboratório, uma bexiga. Na

primeira década do século 21, Shinya Yanaka e Kazutoshi Takahashi usaram um retrovírus para reprogramar o código genético de um fibroblasto e introduziram um novo termo “*induced pluripotent stem cell*” (iPSC), expandindo as possibilidades terapêuticas da medicina regenerativa (HARRELL et al., 2015).

A medicina regenerativa é um campo da ciência amplo, diverso e envolvente. Emprega conhecimentos básicos de biólogos, engenheiros, fisioterapeutas e médicos. Incorpora ferramentas da engenharia de tecidos (“*scaffolds*”), biologia celular e molecular (figura 5), no intuito de acelerar a cascata natural de reparação tecidual.

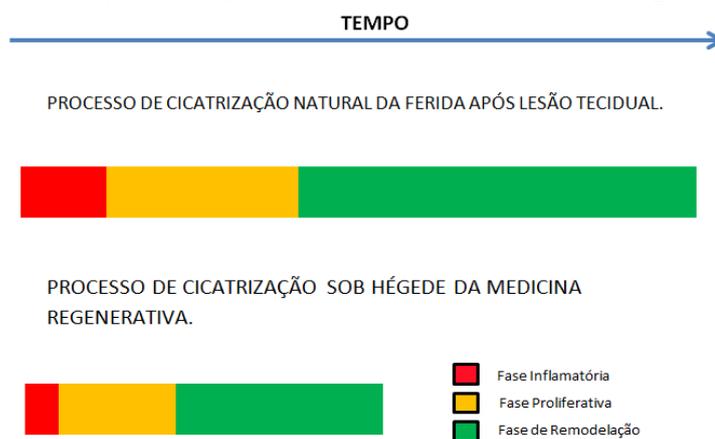
Figura 5 - Representação esquemática da medicina regenerativa. Emprega ferramentas e dispositivos baseados em células progenitoras, moléculas sinalizadoras do processo de reparação tecidual e a bioengenharia dos suportes.



Fonte: O próprio autor.

Os objetivos da aplicação de terapias biológicas sob a concepção da medicina regenerativa é acelerar as fases do processo regenerativo (CLARKE et al., 2018), conforme representação temporal na figura 6 e melhorar a qualidade da cicatrização tecidual com a restauração do tecido mais próximo possível do nativo (MAZZOCCA et al., 2010).

Figura 6 - Otimização das fases do processo de cicatrização tecidual: fases inflamatória, proliferativa e de remodelação. Encurtamento temporal sob aplicação das ferramentas da medicina regenerativa.

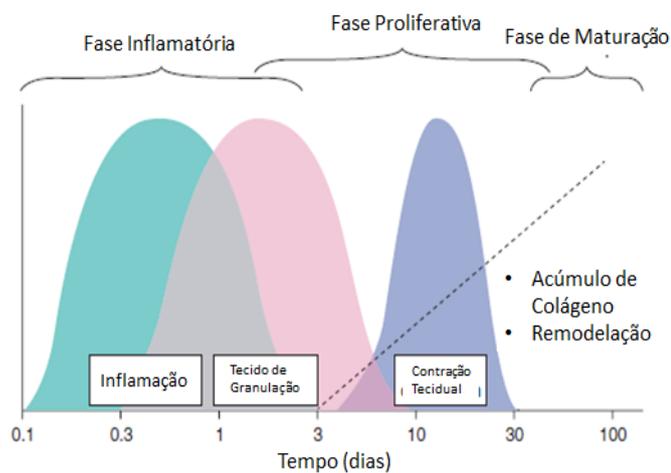


Fonte: Adaptado de Clarke et al. (2018).

As melhores práticas na medicina regenerativa utilizam preparações de plaquetas, plasma rico em plaquetas (PRP) e células tronco mesenquimais (CTMs), classicamente obtidas de aspirado da medula óssea (AMO) da crista íliaca ou de tecido adiposo do paciente. Primam pela introdução supra fisiológica no sítio de lesão tecidual de citocinas e fatores de crescimento das plaquetas, neutrófilos pró-inflamatórios e de células progenitoras.

A cascata de reparação é ilustrada na figura 7. Consiste nas fases inflamatória, proliferativa e de remodelação. Basicamente na fase inicial, 1 a 3 dias, atuam citocinas e fatores de crescimento liberados pelas plaquetas, neutrófilos e fagócitos para degradação do tecido lesado e recrutamento e ativação de células tronco mesenquimais, como fibroblastos e células endoteliais. Na fase seguinte, 1 a 10 dias, neovascularização e proliferação das células teciduais com produção de matriz extracelular, colágeno principalmente. Na última fase, 10 a 30 dias, a deposição, maturação e remodelamento da matriz extracelular com restabelecimento da arquitetura e função tecidual.

Figura 7 - Cascata de reparação tecidual natural: Fases inflamatória, proliferativa e de maturação, durante as quais células progenitoras são recrutadas ao sítio de lesão a fim de se proliferarem, promoverem a revascularização, secreção de matriz extracelular e remodelarem o tecido regenerado.



Fonte: Adaptado de Mautner et al. (2011).

Ainda sobre medicina regenerativa, a engenharia de tecidos tem contribuído com os avanços da mesma. Ela busca solucionar questões relevantes e complexas na regeneração dos diferentes tecidos do corpo humano e restaurar a estrutura e função do órgão. É fundamental o entendimento biológico das etapas de reparo tecidual compreendidas pela ciência básica da histologia e fisiologia a fim de se desenvolver biomateriais que irão interagir e otimizar esses processos ou evitar falhas de preenchimento ou cicatrizes não funcionais nos tecidos. Como

exemplo, o infarto resulta numa área de cicatriz, fibrose, que reduz a função miocárdica. Falhas ósseas pós-trauma, perda tecidual após infecção; formação de uma pseudofibrocartilagem tendínea na entese após reparo do manguito rotador no úmero. A engenharia de tecidos busca criar soluções físicas e biológicas para estas situações.

Idealmente, um biomaterial mimetiza a macro e microestrutura da matriz extracelular do tecido, permite a angiogênese, o carreamento de fatores de crescimento, a atuação e diferenciação de células tronco mesenquimais e a incorporação de um tecido sadio neste biomaterial (LAURENCIN et al., 2019). Estes biomateriais podem ser feitos de polímeros naturais como hidro gel de colágeno, quitosan, alginato, ácido hialurônico e polímeros sintéticos como poliéster; metal como titânio e combinados. Um requisito geral para todos os suportes de biomateriais é reproduzir um ambiente de matriz extracelular para apoiar o crescimento celular (HAYCOCK J. W. 2011).

A impressão em três dimensões (3D) vem superar limitações da engenharia de tecidos ao reproduzir com maior precisão a microestrutura do tecido alvo. Avanços na engenharia de tecidos em 3D também permitem a geração de “organoides” *in vitro*. Organoides são grupamentos celulares específicos dispostos em 3D, esferoides celulares, com capacidade de auto renovação e que mimetizam a função e a morfologia do órgão (CLARKE et al., 2018). Os esferoides são uma espécie de ambiente artificial que permite que as células cresçam e interajam umas com as outras e com seus arredores em todas as dimensões.

Apesar da cultura celular em duas dimensões ser rotina nos estudos de laboratórios pelo mundo, a cultura 3D é mais relevante e requer uma abordagem e expertise multidisciplinar. Culturas dispostas em 3D permitem a interação entre células, proliferação, migração, apoptose e uma série de eventos moleculares sob uma organização espacial que reproduzem com maior confiabilidade a anatomia e fisiologia tecidual. Os esferoides celulares podem ser facilmente visualizados por microscopia de luz, fluorescência e confocal, não precisam de *scaffolds* e têm sido utilizados na modelagem de estudos de crescimento e metástase de tumores sólidos, além de vários estudos terapêuticos (HAYCOCK J. W., 2011).

As CTMs aceleram e melhoram a qualidade do tecido regenerado, no entanto, o microambiente hostil do tecido lesado, com presença de fatores pró-apoptóticos, estresse oxidativo, baixa nutrição e fatores locais de hipóxia, é uma importante barreira para o pleno desempenho das CTMs, desde sua implantação, aderência, sobrevivência e proliferação. Existem algumas estratégias para contornar esta barreira e amplificar o potencial terapêutico da CTMs (SHOJAEI F. et al., 2019).

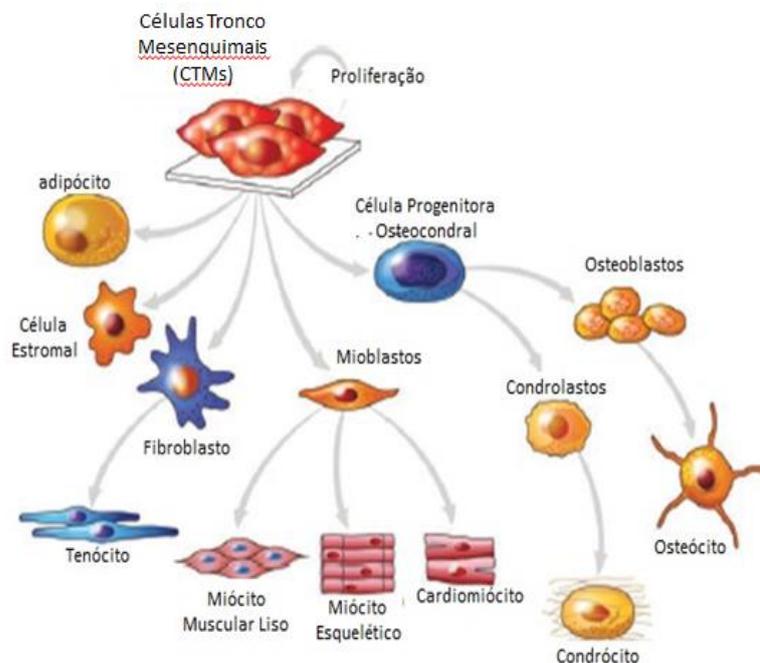
Como dito anteriormente, a utilização de *scaffolds* permite a entrega e a migração das CTMs para o ambiente desejado. Outra estratégia são os esferoides celulares de CTMs. Cultivadas em 3D, aumentam os efeitos parácrinos das células aprisionadas e a secreção de citocinas pró-angiogênicas e anti-inflamatórias. Os esferoides também melhoram a migração, proliferação e taxa de sobrevivência celular que levam à maior angiogênese, proliferação e deposição de matriz extracelular (SHOJAEI F. et al., 2019).

A primeira geração de “ortobiológicos”, ferramentas da medicina regenerativa no tratamento de lesões do sistema músculo esquelético, pode ser representada pela proloterapia. Descrito em meados de 1930, o método baseia-se na injeção de soro fisiológico na lesão a fim de alterar o microambiente, limitar a inflamação e permitir a sinalização mais efetiva de moléculas sinalizadoras da cascata de regeneração. Também há a viscusuplementação com o uso de ácido hialurônico intra-articular nas osteoartroses. Gerações mais recentes de “ortobiológicos” envolvem produtos autólogos como o Plasma Rico em Plaquetas (PRP) e Aspirado de Medula Óssea (AMO). E por fim, a mais recente e promissora, a terapia celular com células tronco mesenquimais (HARRELL et al., 2015).

2.4 TERAPIA CELULAR NAS LESÕES DO MANGUITO ROTADOR

Células tronco mesenquimais possuem a capacidade de auto renovação e habilidade de diferenciação em diferentes tipos celulares do mesenquima, incluindo osteoblasto, condrócitos, tenócitos e adipócitos (figura 8). “*In vitro*”, estas células podem expressar características fenotípicas de diferentes linhagens mesenquimais, como cartilagem, osso, músculo, tendão e tecido adiposo. O emprego destas células em um tecido lesado com baixa capacidade regenerativa permitiria a regeneração tecidual pela reposição celular (CLARKE et al., 2018).

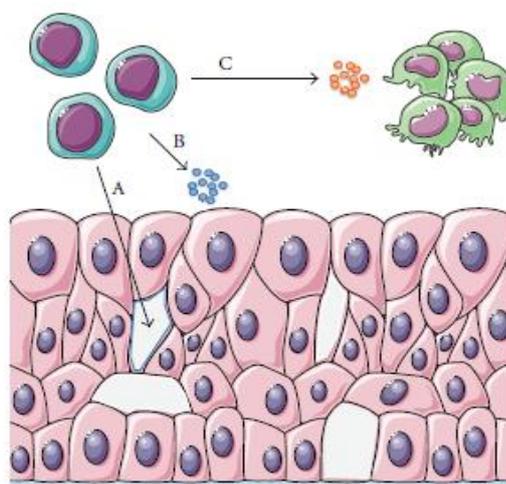
Figura 8 - Célula Tronco Mesenquimal pode se autorreplicar, proliferar, assim como se diferenciar em outras linhagens celulares do sistema musculoesquelético (células progenitoras multipotentes) repovoando o tecido lesado.



Fonte: Adaptado de Malanga; Ibrahim (2018, p. 17).

Não somente pelo potencial de diferenciação celular, estas células também exercem um efeito parácrino nas células residentes no tecido (figura 9), induzindo indiretamente a neoangiogênese, proliferação e diferenciação celular através de citocinas e fatores de crescimento, além de uma atividade imunomodulatória do processo inflamatório tecidual (RANDELLI et al., 2016).

Figura 9 - Células Tronco Mesenquimais participam da regeneração tecidual por diferentes vias. Elas se diferenciam na linhagem celular específica do tecido lesado e repovoam os nichos de células perdidas (A). Elas também influenciam indiretamente a regeneração tecidual através da secreção de fatores de crescimento, que promovem a revascularização e neoangiogênese, proliferação e diferenciação celular dentro do tecido (B), E por fim, modulam o processo inflamatório (C).



Fonte: Schmitt et al. (2012).

De acordo com a Sociedade Internacional de Terapia Celular são necessários três critérios para identificar uma célula tronco mesenquimal: aderência ao plástico das garrafas de cultura (poliestireno), expressão de antígenos de superfície CD 105, CD 73 e CD 90, com ausência dos CD 45, CD 34, CD 14/11b, CD 19 e antígenos do sistema imune HLA, além da habilidade de diferenciação em osteoblastos, condroblastos e adipócitos (BEREBICHEZ-FRIDMAN; MONTERO-OLVERA, 2018).

Estas células precursoras podem ser encontradas e isoladas em qualquer tecido humano, no entanto, as principais fontes com baixa morbidade do sítio doador são o aspirado de medula óssea e tecido adiposo. Por serem autólogas, apresentam a vantagem de não desenvolverem rejeição imunológica do enxerto.

As células tronco podem ser classificadas de acordo com o potencial de diferenciação: Pluripotentes, tais como células tronco embrionárias (CTEs) e “*induced pluripotent stem cells*” (iPSCs); as quais podem se diferenciar em qualquer célula do corpo. Multipotentes, tais como células tronco mesenquimais e hematopoiéticas, as quais podem se diferenciar em mais de um tipo celular, porém com um potencial menor que as pluripotentes (KANNUS P, 2000).

A terapia com células tronco mesenquimais tem sido aplicada em distúrbios do membro superior. Patologias do manguito rotador no ombro são difíceis de tratar devido à baixa vascularização do tendão, que na maioria das tendinopatias, progride para cronificação e ruptura. Existe uma fibrocartilagem altamente especializada de transição entre o tendão e osso na inserção do manguito rotador e que dificilmente é restabelecida após o reparo. O tratamento cirúrgico basicamente aproxima o tendão roto na tuberosidade umeral e uma cicatriz fibrosa é formada, porém com propriedades mecânicas inferiores a entese original, sem o gradiente de rigidez entre tendão e osso, responsável pela dissipação do estresse mecânico na entese.

A medicina regenerativa através de fatores de crescimento, terapia com células tronco mesenquimais e o desenvolvimento de *scaffolds* pela engenharia de tecidos, busca recriar este gradiente de tensão entre as camadas da fibrocartilagem a fim de uma entese mais próxima da original. (LAURENCIN et al., 2019). Apesar de promissora, existem preocupações quanto à segurança e efeitos adversos da terapia celular. Riscos de ossificação ectópica e formação de tumores principalmente quando utilizadas células pluripotentes (LIU et al., 2017).

A perspectiva da terapia com CTMs pode ser o tratamento futuro de muitas doenças ortopédicas, incluindo osteoartrite, lesões osteocondrais, traumas musculares ou ligamentares,

tendinoses, bem como patologias do menisco e do manguito rotador. A medicina regenerativa representa uma nova fronteira da ortopedia, com soluções elegantes e minimamente invasivas na restauração de patologias do sistema musculoesquelético (LAURENCIN et al., 2019).

Em 2016, Randelli e colaboradores confirmaram, isolaram, caracterizaram e cultivaram “*in vitro*” CTMs derivadas das margens de tendão roto do supraespinhal durante cirurgias artroscópica de reparo manguito rotador. Utsunomiya e colaboradores (2013) também isolaram CTMs de diferentes sítios peri articulares do ombro, exceto da medula óssea, e concluíram que células tronco derivadas da bursa subacromial apresentavam maior potencial de diferenciação celular e uma excelente fonte de CTMs para ser aplicada no reparo do manguito rotador.

Poucos ensaios clínicos têm sido publicados até o momento sobre o uso de terapia celular para reforço em cirurgias de reparo do manguito rotador (ELLERA GOMES et al., 2012; HERNIGOU et al., 2014; CENTENO et al., 2015; MORA et al., 2015; SCHWAB et al., 2018). Mazzocca e colaboradores (2010) e Beitzel e colaboradores (2013) mostraram que o úmero proximal pode ser uma fonte de CTMs e que a coleta pode ser feita durante o procedimento cirúrgico artroscópico de reparo do manguito rotador, permitindo num único tempo o reforço biológico do reparo. No entanto, novas pesquisas são necessárias para definir a segurança e reprodutibilidade dos procedimentos na rotina das cirurgias do ombro.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar e comparar o potencial de diferenciação celular osteogênico após cultivo 3D de células tronco mesenquimais (CTMs) obtidas de duas fontes do ombro de humano: região bursal e medula óssea umeral.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Reproduzir e aprimorar o método de extração e isolamento das CTMs-MOh durante a cirurgia de reparo artroscópico da lesão do manguito rotador do ombro em humano.
- Avaliar histologicamente a constituição e a transferência de esferoides multicelulares de CTMs em meio de cultivo padrão de diferenciação osteogênico.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 SUJEITO

Uma paciente com idade de 39 anos, submetida à cirurgia eletiva de reparo artroscópico de lesão do manguito rotador do ombro esquerdo após falha do tratamento conservador, foi elegível ao estudo. O procedimento cirúrgico foi realizado pelo cirurgião ortopédico especialista, autor deste projeto. Foi selecionado um voluntário sem infecção ativa ou recente, sem cirurgias ou fraturas prévias, sem lesões vasculares ou neurológicas acometendo o membro superior e sem morbidades tais como: Diabetes Melito, hepatite, SIDA, uso prévio de quimioterapia ou radioterapia, coagulopatias ou uso crônico de anticoagulantes, imunodeficiências ou uso de corticoide e de outros medicamentos que acarretam alterações hematológicas.

Previamente ao procedimento cirúrgico, a paciente foi devidamente informada sobre os procedimentos de coleta de amostras de sangue da medula óssea umeral e da bursa subacromial durante a cirurgia, sem prejuízo ao andamento da cirurgia. Sua participação como voluntária foi confirmada após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (anexo B), seguindo as normas previstas pela resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde. O projeto foi aprovado (anexo A) após submissão ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Araraquara (CEP-UNIARA) para adquirir o parecer de execução da pesquisa (Número do Parecer: 3.255.760).

4.2 EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DAS CÉLULAS TRONCO DA MEDULA ÓSSEA DO ÚMERO PROXIMAL (CTMs-MOh)

Durante a cirurgia do reparo artroscópico do manguito rotador do ombro, com a paciente sob anestesia geral, foi realizado o procedimento de extração das CTMs-MOh de acordo com o protocolo descrito por Mazzocca e colaboradores (2010), porém com algumas alterações, como uso de Ficoll para separação dos componentes do sangue da medula, o uso de uma cânula de lipoaspiração para aspiração do sangue da medula óssea e o desligamento do sistema de irrigação artroscópico com soro fisiológico 0,9%. Após visualização da lesão do supraespinhal e cruentização da tuberosidade umeral com lâmina de shaver abrasiva, foi realizada a pré-perfuração óssea no local de inserção das âncoras carregadas com fios de sutura. Após esta etapa cirúrgica, antes do rosqueamento da âncora, foi introduzida uma cânula de lipoaspiração 3 mm x 15 cm através do pertuito na cortical umeral até a região

epifisária proximal, aproximadamente 2 cm de profundidade. Nesse momento, foi desligado o sistema de irrigação artroscópico realizado com soro fisiológico 0,9%, e um volume de 30 ml de medula foi aspirado numa seringa de 60 ml, lavada internamente com 2 ml de heparina. A amostra de medula óssea foi transferida para um tubo falcon de 50 ml à temperatura resfriada em recipiente térmico contendo gelo e encaminhada até o Laboratório de Ensaios Clínicos Celulares e Engenharia Regenerativa da Universidade de Araraquara (LECER/UNIARA) para iniciação do processo de extração celular.

No laboratório, o aspirado de sangue da medula óssea foi cuidadosamente introduzido num recipiente contendo solução Ficoll e centrifugado por 5 min a 205 G. Pela diferença de densidade, foram obtidas as seguintes camadas de superior para inferior: plasma, *buffy coat* contendo células mononucleares, Ficoll e a camada vermelha, contendo eritrócitos e granulócitos. É no *buffy coat* que se concentram as células tronco mesenquimais.

O volume do *buffy coat* aspirado foi submetido à contagem celular em contador automático (BIO-RAD TC 20 TM Automated cell Counter). Em seguida, foi introduzido em garrafas para cultura de células (75 cm³ - KASVI), acondicionadas em estufa de cultura celular por 72 h. As células foram lavadas duas vezes com solução tampão fosfato-salino (PBS 1x) para remoção das hemácias e demais células não aderidas. O meio de cultivo foi trocado três vezes por semana, a fim de manter sob condições ideais de cultivo as células aderidas nas garrafas.

4.3 EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DAS CÉLULAS TRONCO DA BURSA SUBACROMIAL (CTMs-BSh)

Para extração de CTMs-BSh foi utilizado o protocolo descrito por Steinert e colaboradores (2015). Durante a inspeção artroscópica da região subacromial, faz-se necessária a ressecção parcial da bursa para visualização da lesão do manguito rotador, rotina no procedimento, sendo esta parte da bursa desprezada. Este material de descarte foi transferido, de forma asséptica, para um recipiente contendo 10 ml de PBS 1x e encaminhado até o LECER/UNIARA para início do processo de extração celular. A amostra de bursa subacromial foi inserida em uma solução 8 mg/ml de colagenase tipo I (1mg/ml - Sigma-Aldrich), realizada a digestão enzimática da amostra tecidual, a qual permaneceu incubada a 37°C sob suave agitação por 45 minutos. Depois desse período, a enzima foi inativada pela adição de meio de cultura celular *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM - Sigma-Aldrich), acrescido de 10% de soro bovino fetal (SBF) e 1% de penicilina/estreptomicina

(Sigma-Aldrich). A amostra foi centrifugada a 300 G por 3 minutos. O pélete obtido foi ressuspendido em meio de cultura celular (DMEM) e a suspensão introduzida em garrafas para cultura de células (75 cm³ - KASVI) e acondicionadas, a partir de então, em estufa de cultura celular. Depois de 72 horas, o meio de cultura foi removido para o descarte de fragmentos da matriz extracelular e das células não aderidas e substituídas por novo meio para a manutenção do cultivo.

4.4 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E DETERMINAÇÃO DO PERFIL MESENQUIMAL DAS CTMs

A caracterização morfológica e a determinação do perfil mesenquimal das células isoladas, por meio do potencial de diferenciação multilinhagem (adipogênica e osteogênica), foram realizadas no Laboratório de Ensaios Celulares e Engenharia Regenerativa da UNIARA (LECER/UNIARA).

Para as análises de caracterização morfológica e do potencial de diferenciação adipogênica e osteogênica, as CTMs em cultivo, em sua 2^a passagem, foram semeadas em placas de 35 mm e submetidas às condições ideais de cultivo, em meios específicos de indução para cada linhagem estabelecida, por um período de 14 dias. O meio de diferenciação osteogênica é composto por: meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), 10 mM de β -glicerofosfato, 0,1 μ M de dexametasona e 50 μ M de ácido ascórbico. O meio de diferenciação adipogênica é constituído de meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SBF, 0,5 μ M de isogutil-metilxantina, 1 μ M de dexametasona, 200 μ M de indometacina, 10 μ M de insulina.

O emprego do meio DMEM isento de suplementação foi aplicado para o controle negativo. Após o período de diferenciação, as culturas foram submetidas aos métodos de coloração com *Alizarina Red* (ARS-Sigma) e por *Oil Red* (ORO-Sigma), para a detecção de diferenciação osteogênica e adipogênica, respectivamente.

4.5 MANUTENÇÃO EM CULTIVO

As células foram mantidas em cultivo, em todas as fases do experimento, em estufa de cultura de células (Panasonic), à temperatura de 37°C, com ambiente umidificado e ar atmosférico contendo 5% de CO₂. Os subcultivos foram realizados quando as garrafas alcançaram 80% de confluência. A remoção das células foi efetuada pela adição de solução de tripsina/EDTA (0,25% - GIBCO), seguida pelo fracionamento do pélete e ressuspensão em

meio de cultivo. Cultivos celulares na 2ª passagem foram utilizadas para os experimentos de caracterização morfológica e determinação do perfil mesenquimal. Cultivos celulares em sua 4ª passagem foram submetidos à constituição dos esferoides celulares.

4.6 CONSTITUIÇÃO DOS ESFEROIDES CELULARES

Para a constituição dos esferoides celulares foi utilizado o método de superfície não aderente em moldes de agarose, que inviabiliza a adesão celular e proporciona o estabelecimento de interações célula-célula que culminam na constituição dos aglomerados multicelulares. Para o preparo dos moldes foram utilizados 100 ml de PBS 1x para 2g de agarose. A solução foi fundida em micro-ondas por aproximadamente 1 minuto e 10 segundos em potência máxima até obter homogeneidade. A solução então foi esfriada e inserida em um contramolde. Quando a solução solidificou, foram retirados os moldes de agarose contendo micropoços com 500 µm de diâmetro. Para esterilização, os moldes foram mantidos em etanol 70% por 30 minutos e mantidos em radiação UV no fluxo laminar por mais 30 minutos. Os moldes foram então imersos em meio de cultura e armazenados em geladeira por 1 semana antes da celularização.

Após remoção da garrafa de cultivo das células em sua 4ª passagem, estas foram semeadas (2×10^5 células/molde) nos moldes. O cultivo foi mantido por um período de 5 dias necessário à formação dos esferoides.

4.7 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICO

As células foram submetidas ao protocolo de indução de diferenciação osteogênica utilizando a mesma metodologia descrita para a caracterização do perfil mesenquimal das células tronco. Após a constituição dos esferoides celulares, estes foram cuidadosamente transferidos para poços de cultivo celular em meio DMEM isento de meio específico de indução por mais 05 dias para o processo de adesão celular. Foi então iniciado o processo de diferenciação celular em meio osteogênico por um período de 14 dias. Em seguida, os poços foram lavados com PBS 1x, fixados com paraformaldeído 10% e corados com *Alizarina Red* para determinação do potencial osteogênico.

Após 24 h de secagem dos poços corados com *Alizarina Red*, foi adicionado ácido acético 10% e submetidos a agitação a 80 rpm por 30 minutos. Em seguida, foram transferidos para outros poços e adicionados hidróxido de amônia. Foi então realizada a

leitura em absorvância a 410 nm. Os dados foram analisados estatisticamente através do teste T-student, com nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1 SUJEITO

S.A.C., sexo feminino, 39 anos, com dores ombro esquerdo há 8 meses e piora dos sintomas nos 3 meses que antecederam a cirurgia de reparo manguito rotador foi voluntária ao estudo. Interrogada sobre antecedentes da moléstia atual, negou traumas, tabagismo, uso de medicamentos e morbidades. Relatou 30 sessões de fisioterapia para ombro sem melhora do quadro álgico. O termo de esclarecimento livre e esclarecido foi assinado pela mesma.

Ao exame físico, não apresentava alterações à inspeção estática e dinâmica, com boa mobilidade articular. Não referia dor à palpação da acromioclavicular. Quanto aos testes semiológicos do manguito rotador, apenas os do tendão supraespinhoso encontravam-se positivos. Quanto às escalas de Avaliação Funcional do Ombro e de dor, UCLA (*University of California at Los Angeles Shoulder Rating Scale*) e EVA (Escala de Avaliação Visual da Dor) respectivamente, apresentavam pontuação 15 (variação de 0 a 35) e 9 (variação de 0 a 10).

Aos exames de imagem, as radiografias do ombro esquerdo nas incidências anteroposterior, perfil e axilar não apresentavam alterações (figura 10).

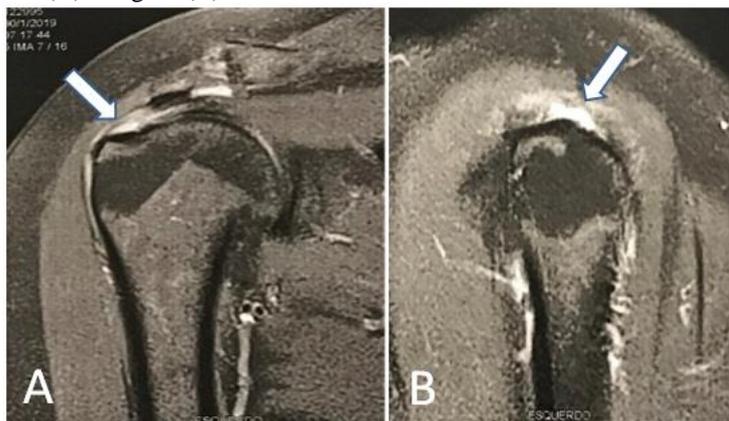
Figura 10 - Imagens de radiografia do ombro esquerdo nas incidências Anteroposterior (A), Perfil (B) e Axilar (C), demonstrando ausência de alterações ósseas.



Fonte: O próprio autor.

As imagens de Ressonância Magnética (RM) do ombro, nos planos coronal e sagital, demonstravam uma lesão pequena (< 1 cm) e de espessura completa do tendão do supraespinhal, localizada no terço médio do tendão em sua inserção na tuberosidade umeral (figura 11).

Figura 11 - Imagens de RM ombro esquerdo, ponderado em T2, demonstrando uma lesão pequena e completa em espessura do tendão do supraespinhal em sua inserção na tuberosidade maior umeral, sinalizada pela seta branca nos cortes coronal (A) e sagital (B)



Fonte: O próprio autor.

5.2 EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DAS CÉLULAS TRONCO DA MEDULA ÓSSEA DO ÚMERO PROXIMAL (CTMs-MOh) E CÉLULAS TRONCO DA BURSA SUBACROMIAL (CTMs-BSh).

A cirurgia de reparo artroscópico do manguito rotador do ombro esquerdo da paciente foi realizada na posição “cadeira de praia”, conforme evidenciada na figura 12. Uma vez posicionada, foram feitas a degermação, antissepsia e colocação dos campos cirúrgicos. A demarcação com azul de metileno das referências ósseas permitiu o planejamento dos portais artroscópico para realização da cirurgia.

Figura 12 - Posicionamento em “cadeira de praia”. Face lateral do braço esquerdo *. Cabeça da paciente**. Referências anatômicas do ombro esquerdo como a articulação acromioclavicular, acrômio (seta azul) e espinha da escápula (seta vermelha) demarcada com azul de metileno.

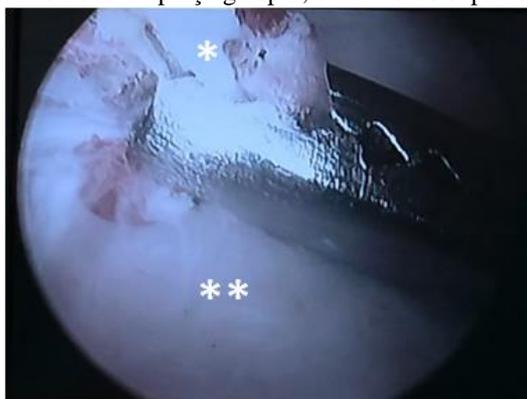


Fonte: O próprio autor.

Durante a inspeção artroscópica intra-articular do ombro esquerdo, a lesão do tendão supraespinhal foi visualizada. Uma lesão compatível com as imagens da RM. Não foram identificados outras lesões na superfície articular, nos tendões do subescapular, redondo menor, cabo longo do bíceps e infraespinhal.

Posicionada então a ótica de videoartroscopia para a face bursal do manguito rotador, foi realizada a bursectomia parcial para visualização da lesão do supraespinhal, conforme etapas habituais na cirurgia de reparo tendíneo. Os fragmentos de bursa resultantes deste procedimento, realizado inicialmente com a lâmina de *shaver* e posteriormente com uma pinça grasper artroscópica (Figura 13), foram utilizados para a extração e isolamento das CTMs-BSh no laboratório, descritos anteriormente.

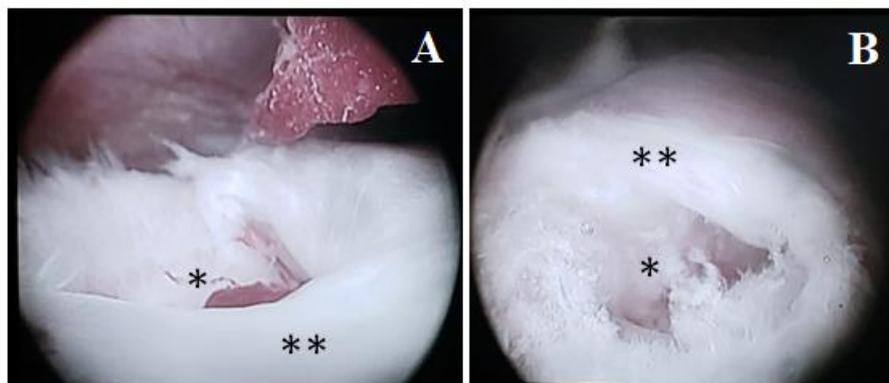
Figura 13 - Visão artroscópica do momento da captura de uma amostra de bursa subacromial (*) com uma pinça grasper de artroscópica. Abaixo da bursa e da pinça grasper, o tendão do supraespinhal **.



Fonte: O próprio autor.

Após bursectomia parcial, foi possível a visualização da lesão do tendão supraespinhal tanto pelos portais artroscópicos posterior e lateral do ombro, conforme ilustrado na figura 14.

Figura 14 - Visão artroscópica da lesão do tendão supraespinhal pela face subacromial, com a ótica pelo portal posterior (A) e pelo portal lateral (B). Visualizada a rotura do tendão supraespinhal *, que deveria estar inserido na tuberosidade umeral.



Fonte: O próprio autor.

Prosseguindo com a cirurgia, foi realizada a limpeza e a cruentização do local de inserção do supraespinhal (*footprint*) com lâmina shaver abrasiva artroscópica e a pré-perfuração na tuberosidade maior umeral no local de inserção da âncora. Previamente à inserção da mesma, foi introduzida a cânula de lipoaspiração acoplada a uma seringa de 60 ml, através do pertuito na cortical umeral até a região epifisária proximal, aproximadamente 2 cm de profundidade (figuras 15 e 16). Nesse momento foi desligado o sistema de irrigação artroscópica e um volume de 30 ml de sangue da medula foi aspirado.

Figura 15 - Imagem radiográfica por escopia da etapa de aspiração de sangue da medula óssea do úmero proximal do ombro esquerdo. Cânula de lipoaspiração pelo pertuito de inserção da âncora até a região metafisária *. Ótica do artroscópico posicionada pelo portal posterior **.



Fonte: O próprio autor.

Figura 16 - Aspiração de sangue da medula óssea do úmero proximal no ombro esquerdo pelo portal artroscópico anterolateral. Aspiração com uma cânula metálica de lipoaspiração (seta azul) acoplada a uma seringa de 60 ml *. Ótica do artroscópico posicionada pelo portal posterior **.

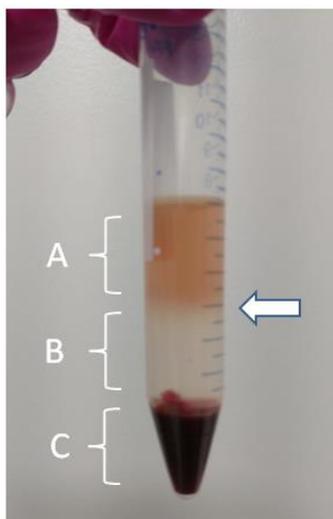


Fonte: O próprio autor.

A amostra de sangue da medula óssea foi transportada até o laboratório para início do processo de extração celular.

No laboratório, o aspirado da medula óssea foi submetido ao protocolo de isolamento e pela diferença de densidade, foram separados os seus componentes. O aspirado convencional de MO apresenta uma camada plasmática superiormente; uma camada intermediária fina (*buffy coat*- BC) contendo a concentração de células mononucleares; a camada de Ficoll e a camada da série vermelha (eritrócitos e granulócitos) no fundo do tubo. É no *buffy coat* que se concentram as CTMs. O resultado do processo de isolamento do sangue da medula óssea obtido neste experimento é exibido na figura 17. Como pode ser observado na referida figura, não houve a formação de um BC expressivo na fase de transição entre o plasma (A) e o Ficoll (B). O aspirado da região correspondente ao BC foi submetido à contagem celular, identificando a concentração de $1,1 \times 10^7$ células/ml. Após contagem, o contingente celular foi submetido ao protocolo previamente descrito de extração das CTMs.

Figura 17 - Resultado da centrifugação do sangue da medula óssea umeral com solução de Ficoll. Tubo de ensaio com as seguintes camadas separadas: camada plasmática (A), uma camada intermediária contendo a maior concentração de células mononucleares (*buffy coat*-seta branca), camada da solução Ficoll (B) e camada constituída de eritrócitos e granulócitos (C).

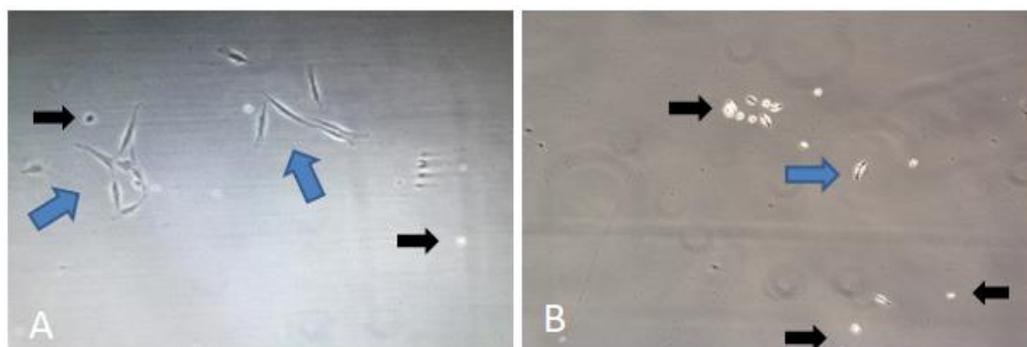


Fonte: O próprio autor.

5.3 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E DETERMINAÇÃO DO PERFIL MESENQUIMAL DAS CTMs

Após o processo de extração celular das duas fontes no ombro da voluntária foram possíveis o isolamento e a expansão dos contingentes celulares. No 4º dia após a semeadura das células (Figura 18), caracterizando a fase de isolamento por adesão preferencial, foram visualizadas, em ambas as fontes de extração, porém com maior predominância na fonte bursal, células espalhadas, esparsas e aderidas, de morfologia fusiforme na superfície da garrafa de cultivo. Foi possível também visualizar células não espalhadas e não aderidas, em maior quantidade, na fonte medular.

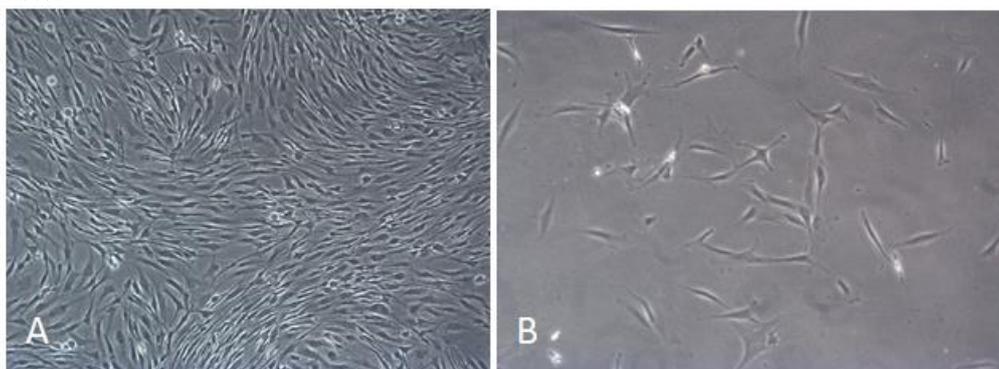
Figura 18 - Foto por microscopia com 10x de aumento, 4º dia pós-lavagem, da cultura de células extraídas da bursa subacromial (A) e da medula óssea (B). Setas azuis indicam células de morfologia fusiforme e aderidas na garrafa, enquanto setas pretas indicam células não aderidas.



Fonte: O próprio autor.

Quanto à expansão celular, houve êxito em ambas as fontes celulares. Conforme demonstrado na figura 19, realizada no 11^o dia após plaqueamento, identifica-se confluência (taxa de ocupação na superfície de cultivo) distinta entre as fontes celulares. Fica evidente a maior confluência na cultura de células derivadas da bursa subacromial quando comparada à da medula óssea.

Figura 19 - Foto por microscopia com 10x de aumento, 11^o dia pós-lavagem, da cultura de células extraídas da bursa subacromial (A) e da medula óssea (B). Nota-se o aspecto morfológico fusiforme de ambas as fontes, porém uma expansão intensa de células derivadas da bursa subacromial (A) e menos intensa de células extraídas da medula óssea.



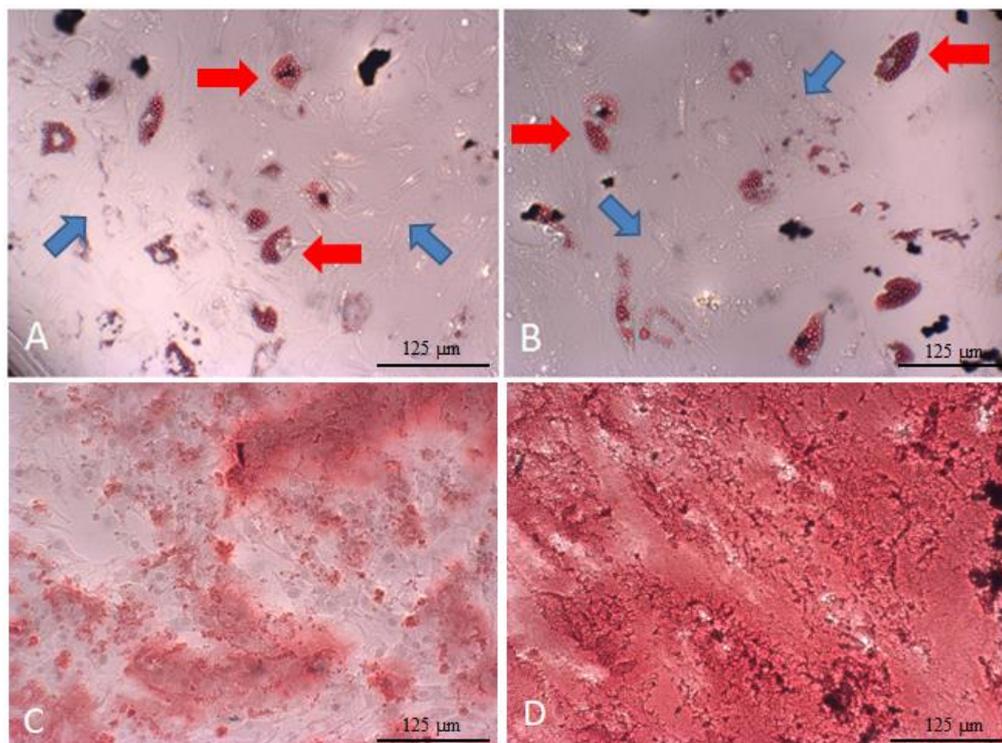
Fonte: O próprio autor.

Um dos instrumentos estabelecidos para a determinação do perfil mesenquimal das células extraídas foi a identificação do potencial de diferenciação adipogênica e osteogênica das duas fontes estabelecidas neste estudo. Os resultados decorrentes destas análises são apresentados na figura 20.

Na figura 20 A e B, é possível a visualização de células contendo concentrados de glóbulos de gordura após o cultivo celular em meio de diferenciação adipogênica de células extraídas e expandidas da bursa subacromial (20 A) e da medula óssea (20 B). Ainda é possível notar a semelhança no comportamento de diferenciação das duas fontes em meio de cultura adipogênico.

Na figura 20 C e D, temos o resultado do cultivo celular das duas fontes, bursa subacromial e medula óssea, respectivamente, em meios de cultura de indução osteogênica. Foi possível visualizar a coloração vermelha que representa matriz extracelular mineralizada corada com *Alizarina Red*. Ressalta-se a diferença no grau de coloração entre as fontes, sugerindo maior grau de deposição de matriz mineralizada na garrafa de origem medular (20 D) quando comparada à fonte da bursa subacromial (20 C).

Figura 20 - Foto por microscopia ótica (20x) em meio de diferenciação adipogênica, com a presença de células alongadas e fusiformes não diferenciadas (setas azuis) e células com concentração citoplasmática de glóbulos de gordura coradas com *Oil Red* (seta vermelha). No campo A, cultura de células tronco mesenquimais da bursa subacromial e no campo B, cultura de células tronco mesenquimais da medula óssea (B).

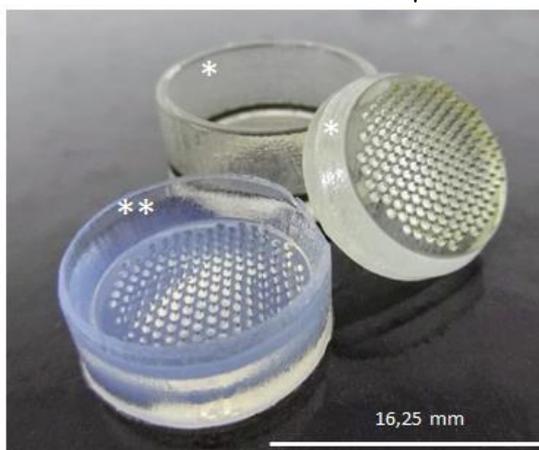


Fonte: O próprio autor.

5.4 CONSTITUIÇÃO DOS ESFEROIDES CELULARES

Na figura 21, são representados o contramolde e o molde de agarose. Cada molde de agarose possui um diâmetro de 16,2 mm e contém 164 micro poços de 500 μm de diâmetro cada para a formação de aglomerados multicelulares.

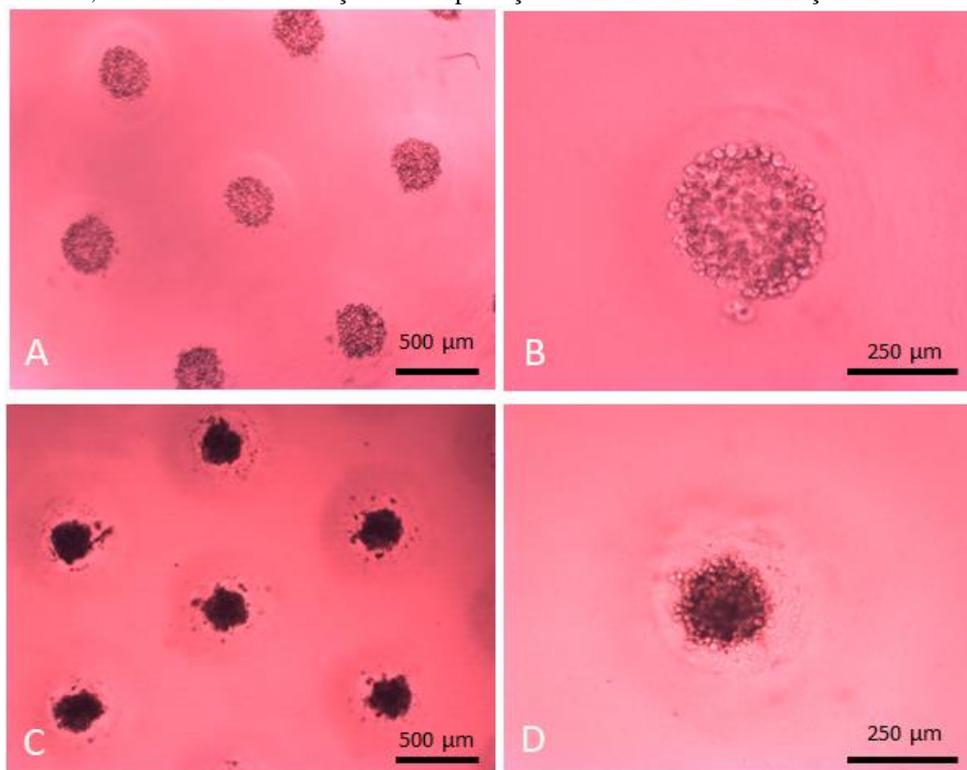
Figura 21 - Fotografia do contra molde * e do molde de agarose** contendo poços de cultivo celular para formação de aglomerados, esferoides celulares com diâmetro de 500 μm cada.



Fonte: O próprio autor.

Conforme representado na figura 22, é possível observar a dinâmica de formação dos esferoides celulares, com imagens do primeiro (22 A e B, com aumentos de 4x e 10x respectivamente) e do quarto dia após semeadura nos poços (22 C e D, com aumentos de 4x e 10x respectivamente). É possível notar a aglomeração e compactação dos esferoides no transcorrer dos 5 dias de cultivo.

Figura 22 - Foto por microscopia ótica de esferoides celulares de CTMs cultivados em moldes de agarose nos aumentos 4x (A) e 10x (B) no primeiro dia de semeadura. Cada esferoide apresenta 500 μm de diâmetro. No quarto dia de semeadura, é possível visualizar os mesmos esferoides nos aumentos 4x (C) e 10x (D), porém com menores diâmetros, decorrentes das interações e compactações celulares em conformação 3D.

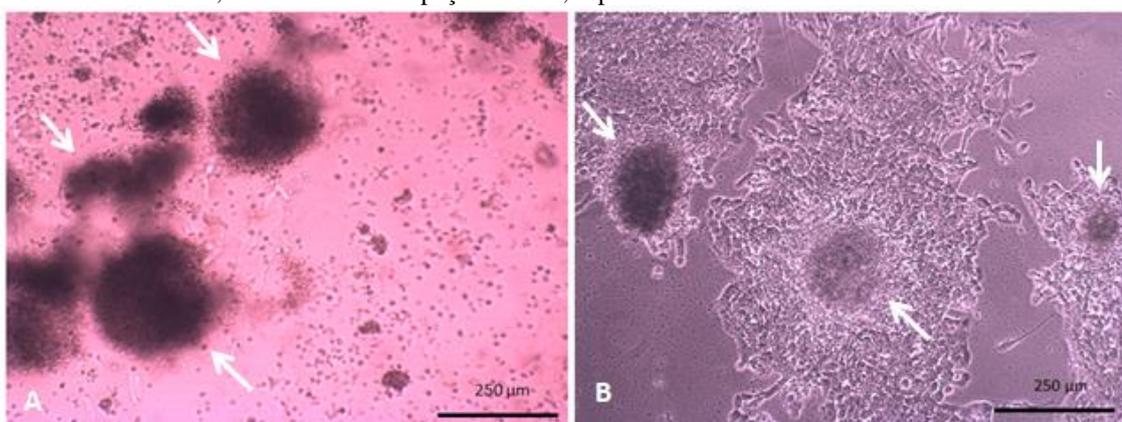


Fonte: O próprio autor.

Após constituição dos esferoides celulares, é demonstrada na figura 23 o carreamento dos esferoides celulares nos poços de cultivo, o que clinicamente corresponde à etapa da terapia celular de entrega dos esferoides no sítio da lesão. É possível visualizar no primeiro dia após a transferência (23 A), esferoides celulares bem definidos circundados por aglomerados celulares menores e com conformação não esferoidal, provavelmente resultantes da fragmentação de esferoides durante o processo de transferência. Também é possível notar o desprendimento celular dos esferoides e ocupação destas células pelo poço. No quarto dia após a transferência (23 B) foram observados aglomerados multicelulares, com conformações esferoidais ou ovaladas, com diâmetro reduzido em relação ao primeiro dia e circundados por

células aderidas e espalhadas. Tais evidências são compatíveis com o processo de desagregação dos esferoides e expansão celular, já em conformação bidimensional, pela superfície dos poços. Desta forma, cada esferoide passa a constituir um núcleo de celularização individualizado. Ressalta-se que estes achados foram similares em ambas fontes celulares, demonstrando um potencial característico de repovoamento celular de um ambiente após carreamento celular tridimensional sob forma de esferoides.

Figura 23 - Foto por microscopia ótica de 10x de aumento de esferoides celulares de CTMs-BSh no primeiro dia (A) e quarto dia (B) após transferência dos esferoides (seta branca) aos poços de cultivo isentos de meio específico. É possível notar esferoides de dimensões distintas, resultantes da fragmentação durante a transferência, o desprendimento celular dos esferoides e a ocupação destas células no substrato, representando o processo de adesão celular. Este processo é mais intenso no quarto dia pós-transferência (B), com menor diâmetro dos esferoides, maior taxa de ocupação celular, espalhamento e adesão celular.



Fonte: O próprio autor

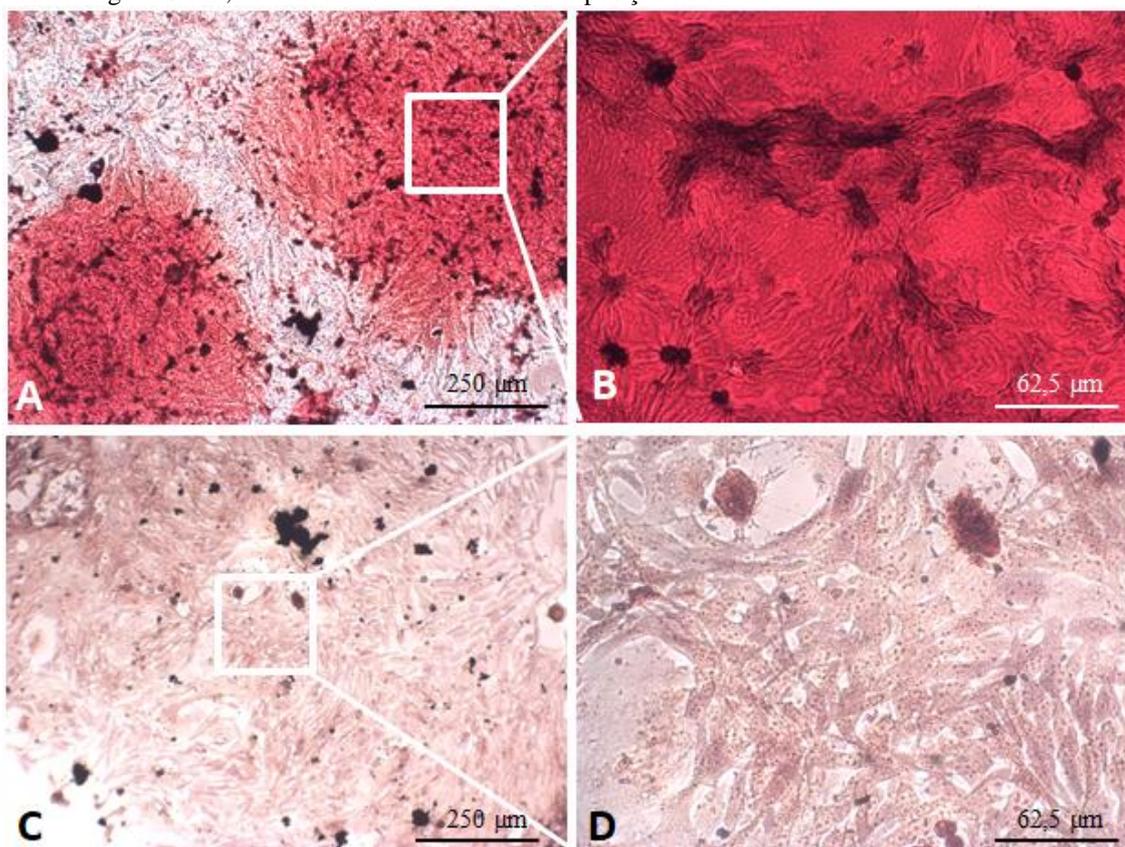
5.5 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA DAS CTMs-MOh e CTMs-BSh

Após etapa de adesão dos esferoides celulares e expansão celular bidimensional, no 5^o dia foi adicionado aos poços meio específico de indução osteogênico pelo período de 14 dias, com trocas três vezes por semana. Ao fim deste período, as culturas das CTMs-MOh e CTMs-BSh foram fixadas e coradas com *Alizarina Red* para determinação e quantificação da matriz extracelular mineralizada (figura 24).

As figuras 24 A e B representam o perfil histológico de coloração das culturas de CTMs-MOh e 24 C e D, CTMs-BSh. Observa-se, nas culturas de CTMs-MOh (25 A), uma grande confluência celular, com a formação de regiões coradas em vermelho provavelmente correspondentes à constituição de núcleos de ossificação. Imagens ampliadas (24 B) demonstram a existência de regiões escuras, correspondentes a aglomerados celulares, imersos em uma densa matriz extracelular óssea mineralizada. Ressalta-se a formação de

pequenas estriações, por vezes com conformação radicular a partir dos pequenos aglomerados celulares, que se assemelham aos canalículos característicos do sistema Haversiano do tecido ósseo mineralizado maduro. As culturas decorrentes da diferenciação das CTMs-BSh (24 C) também demonstram elevada confluência celular. Em contrapartida, não exibiram os núcleos de ossificação características da medula óssea. Imagens com maior ampliação (24 D) demonstram pequenos núcleos circunscritos de coloração avermelhada, correspondentes à matriz mineralizada, rodeados por células aderidas não envoltas em matriz óssea.

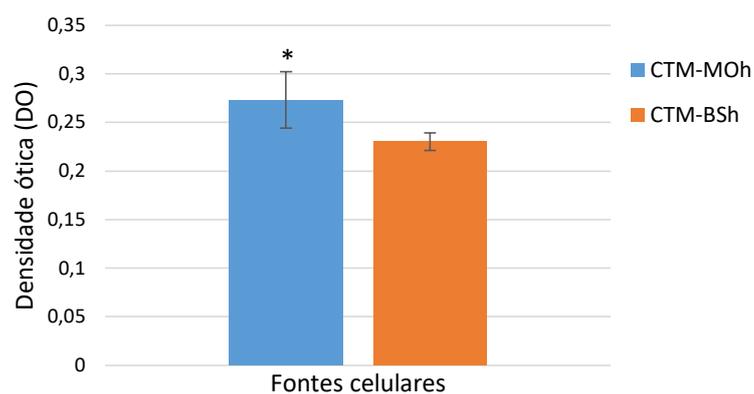
Figura 24 - Foto por microscopia ótica com aumentos de 10x e 40x de CTMs-MOh (A e B) e de CTMs-BSh (C e D) após quatorze dias em meio de diferenciação osteogênica coradas com *Alizarina Red*. Na figura A é possível notar duas regiões de matriz óssea corada e na figura B, nota-se intensa atividade osteogênica pela deposição de densa matriz extracelular mineralizada, com arranjos lamelares que se assemelham aos sistemas de Havers. Na figura C e D, nota-se menor intensidade de deposição de matriz mineralizada.



Fonte: O próprio autor.

Conforme gráfico da figura 25, da análise quantitativa das dosagens de Cálcio por absorvância, a média da densidade ótica nos poços contendo CTMs-MOh foi de 0,273 com desvio padrão de 0,029. Nos poços contendo CTMs-BSh, a média foi de 0,230 com desvio padrão de 0,009, com diferença estatística entre elas ($p \leq 0,05$).

Figura 25 - Representação gráfica da densidade ótica (DO), estabelecida por espectrofotometria por absorvância do Cálcio a 410 nm, das culturas celulares CTMs-MOh e CTMs-BSh 14 dias após a indução de diferenciação osteogênica. * $p \leq 0,05$



Fonte: O próprio autor.

Diante destes resultados, é possível inferir que ambas as fontes celulares possuem capacidade de diferenciação osteogênica em meio específico de indução pela deposição de matriz mineralizada e que CTMs-MOh apresentam maior potencial de diferenciação que CTMs-BSh após o cultivo 3D.

6. DISCUSSÃO

A principal etiologia das lesões do manguito rotador em humanos é de origem degenerativa. Portanto, a incidência destas lesões é maior em pacientes de idade mais avançada. Hernigou e colaboradores (2015), em um estudo contendo 125 pacientes submetidos ao reparo cirúrgico do manguito rotador, relataram uma diminuição da concentração de CTMs na medula óssea umeral e relacionaram essa queda, dentre outros fatores, com o aumento da idade dos pacientes. A idade média dos pacientes submetidos ao tratamento cirúrgico em seu estudo foi de 61,2 anos. Considerando este aspecto, foi preconizada a eleição de um voluntário mais jovem a fim de se obter CTMs com maior facilidade. A voluntária deste estudo apresentava 39 anos. Em contrapartida, mesmo diante dessa suposta vantagem, verificou-se que não foi obtida, de uma forma expressiva, a camada de células mononucleares chamada de *buffy coat*, após centrifugação do aspirado de medula óssea umeral.

Em relação aos protocolos de extração celular das CTMs da bursa subacromial no ombro de humanos, foi reproduzido com sucesso o protocolo de Steinert e colaboradores (2015), sem alterações.

Para extração das CTMs-MOh seguimos o protocolo de Mazzocca e colaboradores (2010) com algumas alterações: durante o procedimento artroscópico, o sangue da medula óssea foi aspirado através de uma cânula de lipoaspiração ao invés de um Gelco 14, na tentativa de redução de obstrução do bixel. Outras alterações foram a interrupção do sistema de irrigação artroscópica durante a aspiração do sangue medular, a fim de evitar hemodiluição e a utilização do gradiente de Ficoll para separação das fases do sangue da medula. Mazzocca e colaboradores (2010) mantiveram aberto o sistema de irrigação e utilizaram um gradiente de sucrose a 17,5%. Apesar de fácil e de custo reduzido, não foi possível reproduzir a separação sanguínea com este gradiente sugerido. Foi adotada então a utilização do Ficoll, já bem estabelecido na literatura para a extração de CTMs a partir da medula óssea da crista ilíaca (ELLERA GOMES et al., 2012; HERNIGOU et al., 2014).

Quanto à caracterização morfológica das células isoladas, tanto das fontes bursal quanto medular, foi possível visualizar nas fotomicrografias células aderidas, espalhadas e de aspecto fusiforme, um padrão morfológico típico de CTMs. Nestas condições de cultivo, foi obtida uma maior taxa de ocupação celular na fonte bursal comparada à fonte da medula após a etapa de adesão preferencial. Acreditamos que este dado corresponde à quantidade

disponível de células tronco de cada fonte, maior na fonte bursal. Sendo assim, sugere-se que a eficiência de extração celular da bursa subacromial é maior que da medula óssea do úmero proximal.

Corroboram com esse achado os resultados apresentados por Utsunomiya e colaboradores (2013), que isolaram e caracterizaram CTMs obtidas da sinóvia da glenoumeral, bursa subacromial, margem tendínea do supraespinhal roto e resíduos tendíneos inseridos na tuberosidade umeral. Os autores concluíram que a bursa subacromial é uma excelente fonte de CTMs. Não obstante, sabe-se que das dezenas de milhões de células nucleadas do aspirado de medula óssea, aproximadamente 0,001% a 0,01% são CTMs (MURPHY et al., 2015). Também Campbell e colaboradores (2019) compararam a presença de CTMs de fragmentos ósseos do *footprint* com fragmentos tendíneos da margem rota do supraespinhal de 20 pacientes submetidos ao reparo artroscópico do manguito rotador e concluíram um menor número de CTMs derivadas do *footprint*, fonte óssea.

No presente estudo, aspiramos 30 ml de sangue da medula óssea com a obtenção de uma contagem celular da fração mononuclear de $11,0 \times 10^6$ células/ml. Na literatura são descritos dados semelhantes como os apresentados por Mazzocca et al. (2010), que coletaram uma média 23 ml de sangue e obtiveram uma fração de $12,1 \times 10^6$ células/ml. Em contrapartida, Ellera Gomes e colaboradores (2012), a partir de um aspirado de 100 ml da medula óssea da crista ilíaca, obtiveram uma fração mononuclear de 381×10^6 células/ml fracionadas com Filcoll, um valor significativamente superior ao do úmero, porém incompatível à simples análise do volume de sangue aspirado.

Quanto aos estudos de caracterização do perfil mesenquimal, nas duas fontes de extração celular foram obtidas as diferenciações nas linhagens adipogênica e osteogênica com êxito. Tal resultado permite garantir a obtenção de um contingente mesenquimal das fontes. E considerando a comparação do potencial de diferenciação osteogênica, ainda em caráter parcial e qualitativo, já se delineava uma superioridade das CTMs-MOh em relação às CTMs-BSh.

Após a semeadura das fontes celulares em moldes de agarose, foram constituídos os esferoides celulares. Estas células sofreram os processos de aglomeração e de compactação no transcorrer dos cinco dias de cultivo, decorrentes de interações intercelulares que mimetizam mais precisamente as condições estruturais e fisiológicas do microambiente celular *in vivo*, comparada as condições bidimensionais padrão de experimentação *in vitro*. Em seguida, foi possível simular, como estratégia de carreamento celular em medicina regenerativa, a etapa de entrega destes aglomerados no ambiente de lesão tecidual. Foram identificados, após

transferência, a ocorrência dos processos de adesão, espraiamento e expansão celular nos poços de cultivo, mimetizando o processo de repovoamento celular. Tais resultados reforçam a possibilidade de utilizar os esferoides multicelulares como um sistema eficiente de “cell delivery” na terapia celular em medicina regenerativa.

Por fim, no décimo quarto dia de indução de diferenciação osteogênica das duas linhagens celulares após cultivo em 3D, foi possível estabelecer a comparação qualitativa e quantitativa dos potenciais de diferenciação das duas fontes. Os resultados obtidos indicaram a produção de matriz óssea mineralizada em ambas as fontes celulares, porém, com maior potencial nas culturas derivadas da medula óssea.

Sendo assim, foram demonstrados a reprodutibilidade de extração de CTMs do úmero proximal durante a cirurgia de reparo artroscópico do manguito rotador, com maior eficiência de extração das CTMs da bursa subacromial, a demonstração da dinâmica dos esferoides celulares, desde a formação ao “cell delivery”, e o maior potencial de diferenciação osteogênica das CTMs-MO_h após cultivo em 3D. Estes resultados colaboram com os conhecimentos a serem empregados pela medicina regenerativa nas lesões do manguito rotador. Para a reconstituição da entese do manguito, com o gradiente estrutural histológico da fibrocartilagem, de células das linhagens tendínea, condrogênica e osteogênica, talvez a terapia celular, juntamente com suportes biológicos e biomoléculas, sejam a chave dessa nova fronteira da ciência.

Embora os conhecimentos gerados nessa pesquisa contribuam para a melhor compreensão do potencial das duas fontes do ombro provedoras de CTMs, bursa e medula óssea, novas pesquisas são necessárias para definir a segurança, estratégias e reprodutibilidade dos procedimentos regenerativos em um único tempo cirúrgico na rotina das cirurgias do ombro.

7. CONCLUSÃO

- Durante a cirurgia de reparo artroscópico do manguito rotador, a extração de CTMs da bursa subacromial é mais efetiva que da medula óssea do úmero proximal, devido maior contingente celular mesenquimal da fonte bursal.
- A constituição dos esferoides celulares é uma estratégia factível da terapia celular na medicina regenerativa.
- Ambas as fontes celulares do ombro, bursa e medula óssea, provém CTMs com potencial de diferenciação osteogênico após cultivo em 3D.
- CTMs-MOh apresentam maior potencial de diferenciação osteogênico após cultivo 3D que CTM-BSh.

8. ANEXOS

Anexo A: Aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UNIARA (10 de Abril de 2019)

“O Projeto de pesquisa encontra-se adequado e aprovado, de acordo com colegiado e com a Resolução 466/12 CNS”.

Anexo B: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UNIVERSIDADE DE ARARAQUARA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
 Rua Voluntários da Pátria, 1309 Centro - Araraquara - SP
 CEP 14801-320 - Telefone: (16) 3301.7263 www.uniara.com.br/comite-de-etica

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO CELULAR EM CULTIVO 3D DE CÉLULAS TRONCO DA MEDULA ÓSSEA E DA BURSA SUBACROMIAL DO ÚMERO PROXIMAL DE HUMANOS.

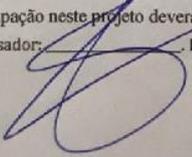
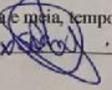
Pesquisador Responsável: Sandro Baraldi Moreira
 Nome do participante: Solange Aparecida Caetano
 Data de nascimento: 09/08/79 R.G.: 30844242-8

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário, do projeto de pesquisa "AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO CELULAR EM CULTIVO 3D DE CÉLULAS TRONCO DA MEDULA ÓSSEA E DA BURSA SUBACROMIAL DO ÚMERO PROXIMAL DE HUMANOS", de responsabilidade dos pesquisadores: Sandro Baraldi Moreira (mestrado) e Prof. Dr. André Capaldo Amaral (orientador).

Leia cuidadosamente o que segue e me pergunte sobre qualquer dúvida que você tiver. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso aceite fazer parte do estudo, assinie ao final deste documento, que consta em duas vias. Uma via pertence a você e a outra ao pesquisador responsável. Em caso de recusa você não sofrerá nenhuma penalidade.

Declaro ter sido esclarecido sobre os seguintes pontos:

1. O trabalho tem por finalidade avaliar o potencial celular de células tronco presentes na medula óssea e na Bursa, estruturas presentes no ombro que será operado.
2. A minha participação nesta pesquisa consiste em doar uma amostra da Bursa subacromial e um volume de 30 ml de medula óssea, uma substância semelhante ao sangue que se encontra no interior do osso do braço, que serão retirados durante a cirurgia que irei realizar para o tratamento da lesão de tendão do ombro, e a coleta será feita antes do cirurgião fixar o tendão rompido no osso. A cirurgia será realizada pelo médico ortopedista Sandro Baraldi Moreira, CRM: 125.702, no Hospital Carlos Fernando Malzoni, situado na Avenida Sinharinha Frota, n. 556, centro, Matão-SP. A coleta dos 30 mL de medula semelhante ao sangue será feita com uma agulha calibrosa, aspirado de dentro do osso do úmero. Já a amostra da Bursa será feita com uma pinça de artroscopia também durante a cirurgia.
3. O procedimento de coleta da medula óssea é seguro, e o volume retirado é muito pequeno, não causando nenhum problema a minha saúde. Podem ocorrer dores e limitações nos movimentos após a cirurgia, mas não relacionados diretamente à coleta de medula óssea, e sim pela própria cirurgia do tendão. Tais complicações serão controladas pelo médico cirurgião por medicamentos;
4. Ao participar deste trabalho não terei benefício direto, porém estarei contribuindo com a ciência para melhorar os métodos utilizadas na área de pesquisa chamada medicina regenerativa, que possam ajudar na cura de lesões de tendão futuramente;
5. A minha participação neste projeto deverá ter a duração de 1 hora e meia, tempo estimado da cirurgia;

Rubrica do pesquisador:  Rubrica do participante:  Página 1 de 2



**UNIVERSIDADE DE ARARAQUARA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

Rua Voluntários da Pátria, 1309 Centro - Araraquara - SP
CEP 14801-320 - Telefone: (16) 3301.7263

www.uniara.com.br/comite-de-etica

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

6. Não terei nenhuma despesa ao participar da pesquisa e poderei deixar de participar ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar, e não sofrerei qualquer prejuízo;
7. Fui informado e estou ciente de que não há nenhum valor econômico, a receber ou a pagar, por minha participação, no entanto, caso eu tenha qualquer despesa decorrente da participação na pesquisa, serei ressarcido;
8. Caso ocorra algum dano comprovadamente decorrente de minha participação no estudo, poderei ser compensado conforme determina a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde;
9. Meu nome será mantido em sigilo, assegurando assim a minha privacidade, e se eu desejar terei livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas consequências, enfim, tudo o que eu queira saber antes, durante e depois da minha participação;
10. Fui informado que os dados coletados serão utilizados, única e exclusivamente, para fins desta pesquisa, e que os resultados poderão ser publicados;
11. As amostras coletadas serão utilizadas, únicas e exclusivamente, para fins dessa pesquisa. Os constituintes da coleta não utilizados serão descartados em recipientes específicos de descarte para amostras biológicas para posterior incineração.
12. Os resultados desta pesquisa contribuirão com a determinação da eficácia desses recursos, que poderão ser utilizadas futuramente no tratamento de lesões musculoesqueléticas.

Qualquer dúvida, pedimos a gentileza de entrar em contato com Sandro Baraldi Moreira, mestrando responsável pela pesquisa, pelo telefone: (16) 981183602, e-mail: sandromoreira50@hotmail.com, André Capaldo Amaral, orientador da pesquisa, telefone: (16) 99769-0095, e-mail: acamaral@uniara.com.br e/ou com Comitê de Ética em Pesquisa da Uniara, localizado na Rua Voluntários da Pátria nº 1309 no Centro da cidade de Araraquara-SP, telefone: 3301.7263, e-mail: comitedeetica@uniara.com.br.

Eu, Sergio Aguiar Bastano, RG nº 30844242-8, declaro ter sido informado e concordo em participar, como voluntário, do projeto de pesquisa acima descrito.

Matão, 10 de maio de 20 19

Assinatura do participante

Sergio Aguiar Bastano

Nome e assinatura do responsável por obter o consentimento

Sandro Baraldi Moreira

Rubrica do pesquisador:

2

Rubrica do participante:

Página 2 de

9. REFERÊNCIAS

- ACHILLI, T.; MEYER, J.; MORGAN, J. R. Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids. **Expert Opin Biol Ther**, v. 12, n. 10, p. 1347-1360. 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4295205/>. Acesso em: 08 abr. 2017.
- ALVES, E; GUIMARÃES, A. C. Cultivo celular. In: MOLINARO, E. et al. (2010). **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**. 1ª ed. Rio de Janeiro: EPSJV, IOC, v. 12, p. 215-253, 2010.
- AMINI, A. R.; LAURENCIN, C. T.; NUKAVARAPU, S. P. Bone tissue engineering: recent advances and challenges. **Critical Reviews in Biomedical Engineering**, v. 40, n. 5, p. 363-408, 2012.
- BEITZEL, K. et al. Comparison of mesenchymal stem cells (osteoprogenitors) harvested from proximal humerus and distal femur during arthroscopic surgery. **Arthroscopy**, v. 29, n. 2, p. 301-308, fev. 2013.
- BENJAMIN, M. EVANS, E. J.; COPP, L. The histology of tendon attachments to bone in man. **J. Anat.**, v. 149, p. 89-100, dez. 1986.
- BEREBICHEZ-FRIDMAN, R.; MONTERO-OLVERA, P. R. Sources and Clinical Applications of Mesenchymal Stem Cells: State-of-the-art review. **Sultan Qaboos Univ Med J.**, v. 18, n. 3, p. 264-277, ago. 2018.
- BHATTACHARYA, M. et al. Nanofibrillar cellulose hydrogel promotes three-dimensional liver cell culture. **Journal of controlled release**, v. 164, n. 3, p. 291-298, 2012.
- BICOS, J. et al. The multi-suture technique for rotator cuff repair: A biomechanical evaluation. **Orthopedics**, v. 30, n. 11, p. 910-919, November 2007.
- BISHOP, J. et al. Cuff integrity after arthroscopic versus open rotator cuff repair: a prospective study. **J Shoulder Elbow Surg.**, v. 15, n.3, p. 290-299, may./jun. 2006.
- BOILEAU, P. et al. Arthroscopic repair of full-thickness tears of the supraspinatus: does the tendon really heal? **J Bone Joint Surg Am.**, v. 87, n. 6, p. 1229-1240, jun. 2005.
- CANAPP Jr, S. O. et al. The use of adipose-derived progenitor cells and platelet-rich plasma combination for the treatment of supraspinatus tendinopathy in 55 dogs: a retrospective study. **Front Vet Sci.**, v. 9, n. 3, p. 1-19, 2016.
- CAMPBELL, T.M. et al., Tendon contains more stem cells than bone at the rotator cuff repair site. **J Shoulder Elbow Surg** (2019) -, 1–9 <https://doi.org/10.1016/j.jse.2019.02.008>
- CARDOSO, T. B. et al. Current trends in tendinopathy management. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, 2019.

CARMO, D. D.; SANTOS Jr, A. R. Aplicação Clínica de Células-Tronco Adultas. II Simpósio de Iniciação Científica da Universidade Federal do ABC, Santo André-SP, 2014. **Anais** 2014. Disponível em: http://ic.ufabc.edu.br/II_SIC_UFABC/resumos/paper_5_99.pdf. Acesso em: 03 mai. 2017.

CENTENO, C. J. et al. A prospective multi-site registry study of a specific protocol of autologous bone marrow concentrate for the treatment of shoulder rotator cuff tears and osteoarthritis. **J Pain Res.**, v. 8, p. 269-276, 2015.

CESARZ, Z; TAMAMA, K. Spheroid Culture of Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells International**, v. 2016, p. 1-11, 2016.

CHEN, G. et al. Scaffold design for tissue engineering. **Macromolecular Bioscience**, v. 2. p. 67-77, fev. 2002.

CLARKE, G. et al. .Bench to bedside: Current advances in regenerative medicine. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 55, p. 59-66, dez. 2018.

COLE, B. J. et al. Arthroscopic rotator cuff repairs: An anatomic and biomechanical rationale for different suture-anchor repair configurations. **Arthroscopy**, v. 23, n. 6, p. 662-669, 2007.

COSTA, E. et al. 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis. **Biotechnology Advances**, 8ª ed, v. 34, n. 8, p. 1427-1441, dez. 2016.

COX, S. C. et al. 3D printing of porous hydroxyapatite scaffolds intended for use in bone tissue engineering applications. **Materials Science & Engineering C Materials for Biological Applications**, v. 47, p. 237–247, fev. 2015.

DEAN, B. J.; FRANKLIN, S. L.; CARR. A. J. A systematic review of the histological and molecular changes in rotator cuff disease. **Bone Joint Res.**, v. 1, n. 7, p. 158-166, 2012.

DINES, J. S.; GRANDE, D. A.; DINES, D. M. Tissue engineering and rotator cuff tendon healing. **J Shoulder Elbow Surg.**, v. 16, p. 204-207, 2017.

DUVAL, K. et al. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. **Physiology**, v. 32, n. 4, p. 266-277, jul. 2017.

ELLERA GOMES, J. L. et al. Conventional rotator cuff repair complemented by the aid of mononuclear autologous stem cells. **Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.**, v. 20, n. 2, p. 373-377, fev. 2012.

FEALY, S. et al. Biomechanical evaluation of the relation between number of suture anchors and strength of the bone-tendon interface in a goat rotator cuff model. **Arthroscopy**, v. 22, n. 6, p. 595-602, jun. 2006

GALANG, E. M. D. et al. Regenerative medicine techniques in the management of chronic tendinopathy. **Techniques in Regional Anesthesia and Pain Management**, v. 19, n. 1-2, p. 73-79, jan./abr. 2015.

GALATZ, L. M. et al. The outcome and repair integrity of completely arthroscopically repaired large and massive rotator cuff tears. **J Bone Joint Surg Am.**, v. 86, n. 2, p. 219-224, fev. 2004.

GANDINI, A. The irruption of polymers from renewable resources on the scene of macromolecular science and technology. **Green Chemistry**, v. 13, n. 5, p. 1061-1083, 2011.

GOBBI, A.; ESPREGUEIRA-MENDES, J.; LANE, J. G; KARAHAN, M. **Bio-orthopaedics: A New Approach**. Nova York: Springer, 2017.

GOMES, J. L. E. et al. Conventional rotator cuff repair complemented by the aid of mononuclear autologous stem cells. **Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.**, v. 20, n. 2, p. 373-377, fev. 2012.

GOMOLL, A. H. et al. Rotator cuff disorders: recognition and management among patients with shoulder pain. **Arthritis Rheum.**, v. 50, n. 12, p. 3751-3761, 2004.

GORGIEVA, S. et al. Mineralization potential of cellulose-nanofibrils reinforced gelatin scaffolds for promoted calcium deposition by mesenchymal stem cells. **Materials Science and Engineering C.**, v. 73, p. 478-489, 2017.

GUADIX, J. A. et al. Characteristics, applications and prospects of mesenchymal stem cells in cell therapy. **Med Clin.**, v. 148, n. 9, p. 408-414, mai. 2017.

GULOTTA, L. V. et al. Application of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a rotator cuff repair model. **Am J Sports Med.**, v. 37, n. 11, p. 2126-2133, nov. 2009.

HARRELL, B. D. et al. Basic science of regenerative biology and application to regenerative medicine: Past, present, and future. **Techniques in Regional Anesthesia and Pain Management**, v. 19, n. 1-2, p. 3-9, jan./abr. 2015.

HENKEL, J. et al. Bone regeneration based on tissue engineering conceptions—a 21st century perspective. **Bone research**, v. 1, n. 3, p. 216-248, set. 2013.

HERNIGOU, P. et al. Biologic augmentation of rotator cuff repair with mesenchymal stem cells during arthroscopy improves healing and prevents further tears: a case-controlled study. **IntOrthop.**, v. 38, n. 9, p. 1811-1818, set. 2014.

HERNIGOU, P. et al. Reduced levels of mesenchymal stem cells at the tendon–bone interface tuberosity in patients with symptomatic rotator cuff tear. **International Orthopaedics**, v. 36, n. 6, p. 1219-1225, jun. 2015.

HO, S. S. et al. Increased Survival and Function of Mesenchymal Stem Cell Spheroids Entrapped in Instructive Alginate Hydrogels. **Stem Cells Translational Medicine**, v. 5, n. 6, p. 773-781, jun. 2017.

IDEO, J. et al. The effect of a local application of fibroblast growth factor-2 on tendon-to-bone remodeling in rats with acute injury and repair of the supraspinatus tendon. **J Shoulder Elbow Surg.**, v. 18, n. 3, p. 391-398, 2009.

ISAAC, C. et al. Biologic approaches to enhance rotator cuff healing after injury. **J Shoulder Elbow Surg**, v. 21, n. 2, p. 181-190, fev. 2012.

JENSEN P.T., LAMBERTSEN K.L., FRICH L.H. Assembly, maturation, and degradation of the supraspinatus enthesis. **J Shoulder Elbow Surg**. 2018 Apr;27(4):739-750. doi: 10.1016/j.jse.2017.10.030. Epub 2018 Jan 10.

JOCKENHOEVEL, S. et al. Fibrin gel: advantages of a new scaffold in cardiovascular tissue engineering. **European Journal of Cardio-thoracic Surgery**, v. 19, n. 4, p. 424–430, abr. 2001.

JOHN W. HAYCOCK (ed.), *3D Cell Culture: Methods and Protocols*, **Methods in Molecular Biology**, vol. 695, DOI 10.1007/978-1-60761-984-0_1, © Springer Science+Business Media, LLC, 2011.

KANNUS, P. Structure of the tendon connective tissue. **Scand J Med Sci Sports.**, v. 10, n. 6, p. 312-320, dez. 2000.

KE LAN et al.; Isolation of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs). **Current Protocols in Microbiology.**, 2007 <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mca04cs6>

KIM, H. M. et al. Factors affecting satisfaction and shoulder function in patients with a recurrent rotator cuff tear. **J Bone Joint Surg Am.**, v. 96, p. 106-112, 2014.

LAURENCIN, C. T. et al. Regenerative Engineering in the Field of Orthopedic Surgery. In: MAZZOCA, A. D.; LINDSAY, A. D. (Orgs.). **Biologics in Orthopaedic Surgery**, p. 201-213, 2019.

LEADBETTER, W. B. Cell-matrix response in tendon injury. **Clin Sports Med.**, v. 11, n. 3, p. 533-578, jul. 1992.

LI, Y. et al. Fibrin gel as an injectable biodegradable scaffold and cell carrier for tissue engineering. **The Scientific World Journal**, v. 2015, p. 685-690, fev. 2015.

LIN, N.; DUFRESNE, A. Nanocellulose in biomedicine: Current status and future prospect. **European Polymer Journal**, v. 59, p. 302-325, out. 2014.

LIU, M. et al. Tissue engineering stratified scaffolds for articular cartilage and subchondral bone defects repair. **Orthopedics**, v. 36, n. 11, p. 868–73, nov. 2013.

LIU, L. et al. Advances of stem cell based-therapeutic approaches for tendon repair. **J Orthop. Translat.**, v. 13, n. 9, p. 69-75, abr. 2017.

LOPEZ-VIDRIERO, E. et al. The use of platelet-rich plasma in arthroscopy and sports medicine: optimizing the healing environment. **Arthroscopy**, v. 26, n. 2, p. 269-278, fev. 2010.

MA, C. B. et al. Biomechanical evaluation of arthroscopic rotator cuff stitches. **J Bone Joint Surg Am.**, v. 86, n. 6, p. 1211-1216, jun. 2004.

MACMAHON, P. J.; EUSTACE, S. J.; KAVANAGH, E. C. Injectable corticosteroid and local anesthetic preparations: a review for radiologists. **Radiology**, v. 252, n. 3, p. 647–661, 2009.

MAHAR, A. T. et al. Increasing the insertion depth of suture anchors for rotator cuff repair does not improve biomechanical stability. **J Shoulder Elbow Surg.**, v. 14, n. 6, p. 626-630, nov./dez. 2005.

MALANGA, G. A.; IBRAHIM, V. **Regenerative treatments in sports and orthopedic medicine**. Nova York: Springer, 2018.

MAUTNER, K.; MALANGA, G.; COLBERG, R. Optimization of ingredients, procedures and rehabilitation for platelet- rich plasma injections for chronic tendinopathy. **Pain Manag.**, v. 1, n. 6, p. 523–532, 2011.

MAZZOCCA, A. D. et al. Arthroscopic single-row versus double-row suture anchor rotator cuff repair. **Am J Sports Med.**, v. 33, n. 12, p. 1861-1868, dez. 2005.

MAZZOCCA, A. D. et al. Rapid isolation of human stem cells (connective tissue progenitor cells) from the proximal humerus during arthroscopic rotator cuff surgery. **Am J Sports Med.**, v. 38, n. 7, p. 1438-1447, jul. 2010.

MILANO, G. et al. Efficacy of marrow-stimulating technique in arthroscopic rotator cuff repair: a prospective randomized study. **Arthroscopy**, v. 29, n. 5, p. 802-810, mai. 2013.

MORA, M. V. et al. Stem cell therapy in the management of shoulder rotator cuff disorders. **World J Stem Cells.**, v. 7, n. 4, p. 691-699, mai. 2015.

MURPHY, M. B. et al. Bone marrow concentrate and platelet-rich plasma acquisition and preparation: Why technique matters. **Techniques in Regional Anesthesia and Pain Management**, v. 19, n. 1-2, p. 19-25, jan./abr. 2015.

NAGURA, I. et al. Characterization of progenitor cells derived from torn human rotator cuff tendons by gene expression patterns of chondrogenesis, osteogenesis, and adipogenesis. **J Orthop Surg Res.**, v. 11, n. 40, p. 1-8, mar. 2016.

NAMDARI, S. et al. Factors affecting outcome after structural failure of repaired rotator cuff tears. **J Bone Joint Surg Am**, v. 96, p. 99-105, 2014.

O'KEEFE, R. J.; MAO, J. Bone tissue engineering and regeneration: from discovery to the clinic—an overview. **Tissue Eng Part B Rev.**, v. 17, n. 6, p. 389–392, dez. 2011.

OLIVEIRA, L. Biomateriais com aplicação na regeneração óssea—método de análise e perspectivas futuras. **Revista de Ciência**, v. 9, p. 37–44, 2010.

OTTENBRITE, R. M.; PARK, K.; OKANO, T. **Biomedical Applications of Hydrogels Handbook**. Nova York: Springer-Verlag, 2010.

PUENTE, P; LUDENÑA, D. Cell culture in autologous fibrin scaffolds for applications in tissue engineering. **Experimental Cell Research**, v. 322, n. 1, p. 1-11, mar. 2014.

RANDELLI, P. et al. Platelet rich plasma in arthroscopic rotator cuff repair: a prospective RCT study, 2-year follow-up. **J Shoulder Elbow Surg.**, v. 20, n. 4, p. 518-528, jun. 2011.

RANDELLI, P. et al. Tendon-Derived Stem Cells for Rotator Cuff Repair. **Operative Techniques in Orthopaedics**, v. 26, n. 3, p. 147-156, set. 2016.

REED, S. C.; GLOSSOP, N.; OGILVIE-HARRIS, D. J. Full-thickness rotator cuff tears. A biomechanical comparison of suture versus bone anchor techniques. **Am J Sports Med.**, v. 24, n.1, p. 46-48, jan./fev. 1996.

RILEY, G. The pathogenesis of tendinopathy. A molecular perspective. **Rheumatology**, Oxford, v. 43, n.2, p. 131-142, fev. 2004.

RODEO, S. A. et al. Biologic augmentation of rotator cuff tendon-healing with use of a mixture of osteoinductive growth factors. **J Bone Joint Surg Am.**, v. 89, n. 11, p. 2485-2497, 2007.

RODEO, S. A. et al. Biologic augmentation of rotator cuff tendon repair. **J Shoulder Elbow Surg.**, v. 16, p. 191-197, 2007

ROSENTHAL, N.; BADYLAK, S. Regenerative medicine: today's discoveries informing the future of medical practice. **NPJ Regenerative Med.**, v. 1, p. 1-3, jun. 2016. Acesso em 20 jul. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5744713/pdf/npjregenmed20167.pdf>.

SÁNCHEZ MÁRQUEZ, J. M. et al. Functional results after arthroscopic repair of massive rotator cuff tears; influence of the application platelet-rich plasma combined with fibrin. **Revista Española De Cirugía Ortopédica Y Traumatología (English Edition)**, v. 55, p. 282-287, 2011.

SCHMITT, A. et al. Review Article Application of Stem Cells in Orthopedics. **Stem Cells International**, v. 2012, p. 1-11, dez. 2012.

SCHMITT, A. et al. Application of Stem Cells in Orthopedics. **Stem Cells International**, v. 2012, p. 1-11, fev. 2012.

SCHWAB, L. M.; BLANCH, P.; YOUNG, M. Autologous tenocyte implantation into shoulder tendon pathology in an elite swimmer. **Physical Therapy in Sports**, v. 29, p. 19-25, jan. 2018.

SHOJAEI F, RAHMATI S, BANITALEBI DEHKORDI M. A review on different methods to increase the efficiency of mesenchymal stem cell-based wound therapy. **Wound Repair Regen.** 2019 Jul 12. doi: 10.1111/wrr.12749.

SIMÃO, D. et al. Sistemas de Cultura 3D para diferenciação neural de células estaminais humanas. **Biociencia** - Boletim da Sociedade Portuguesa de Biotecnologia, v. 2, n. 4, p. 17-20, nov. 2013. Disponível em: <http://www.cienciaviva.pt/img/upload/Boletim4.pdf>. Acesso em: 19 abr. 2017.

SINGH, M.; RAY, A. R.; VASUDEVAN, P. Biodegradation studies on periodate oxidized cellulose. **Biomaterials**, v. 3, n. 1, p. 16-20, jan. 1982.

SMITH, C. D. et al. A biomechanical comparison of single and double-row fixation in arthroscopic rotator cuff repair. **J Bone Joint Surg Am.**, v. 88, n. 11, p. 2425-2431, nov. 2006.

SOUZA, M. V. N. Utilização do TEMPO (N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina) na oxidação de álcoois primários e secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 287-292, 2004.

SPARGOLI, G. Supraspinatus Tendon Pathomechanics: A Current Concepts Review. **Int J Sports Phys Ther.**, v. 13, n. 6, p. 1083-1094, dez. 2018.

STEINERT, A. F. et al. Characterization of bursa subacromialis-derived mesenchymal stem cells. **Stem Cell Research Therapy**, v. 6, n. 1, p. 1-14, jun. 2015.

TASHJIAN, R. Z. et al. Factors affecting healing rates after arthroscopic double-row rotator cuff repair. **Am J Sports Med.**, v. 38, p. 2435-2442, 2010.

TENG, C. et al. Combination of platelet-rich plasma and bone marrow mesenchymal stem cells enhances tendon-bone healing in a rabbit model of anterior cruciate ligament reconstruction. **J Orthop Surg Res.**, v. 11, n. 96, p. 1-9, 2016.

UMER, M.; QADIR, I.; AZAM, M. Subacromial impingement syndrome. **Orthop Rev.**, v. 4, n. 2, p.79-82, mai. 2012.

UTSUNOMIYA, H. et al. Isolation and characterization of human mesenchymal stem cells derived from shoulder tissues involved in rotator cuff tears. **Am J Sports Med.**, v. 41, n. 3, p. 657-668, mar. 2013.

VOGEL, L. A. et al. Biologics in Sports Medicine. In: In: MAZZOCA, A. D.; LINDSAY, A. D. (Orgs.). **Biologics in Orthopaedic Sugery**. p. 63-68, 2019.

XIN, T. et al. China's landscape in regenerative medicine. **Biomaterials**, v. 124, p. 78-94, 2017.

YOO, J. H; CHO, N. S.; RHEE, Y. G. Effect of postoperative repair integrity on health-related quality of life after rotator cuff repair: healed versus retear group. **Am J Sports Med.**, v. 41, n. 11, p. 2637-2644, nov. 2013

WILLIAMS, G. R. Jr et al. Rotator cuff tears: why do we repair them? **J Bone Joint Surg Am.**, v. 86, n. 12, p. 2764-2776, 2004.

ZHENG, N.; HARRIS, H. W.; ANDREWS, J. R. Failure analysis of rotator cuff repair: A comparison of three double-row techniques. **J Bone Joint Surg Am.**, v. 90, n.5, p. 1034-1042, mai. 2008.