

**ALEX DE LIMA SANTOS**

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE *SCAFFOLD*  
ORIUNDO DE TENDÃO DESCELULARIZADO**

Tese apresentada à Universidade Federal de  
São Paulo para obtenção do Título de Doutor  
em Ciências.

São Paulo  
2021

**ALEX DE LIMA SANTOS**

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE *SCAFFOLD*  
ORIUNDO DE TENDÃO DESCELULARIZADO**

Tese apresentada à Universidade Federal de  
São Paulo para obtenção do Título de Doutor  
em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Faloppa

Coorientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lydia Massako Ferreira

Coorientador: Prof. Dr. Marcel Jun Sugawara Tamaoki

São Paulo

2021

de Lima Santos, Alex

**Desenvolvimento e avaliação de *scaffold* oriundo de tendão  
descelularizado** / Alex de Lima Santos. -- São Paulo, 2021.  
XIX, 122f

Tese Doutorado — Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de  
Medicina. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional.

The development and evaluation of a decellularized tendon scaffold

Palavras-chave: 1. Tendões. 2. Engenharia Tecidual. 3. Tecidos Suporte.  
4. Matriz Extracelular 5. Medicina Regenerativa



## **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLOCIONAL**

COORDENAÇÃO: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Lydia Masako Ferreira

ORIENTADOR: Prof. Dr. Flavio Faloppa

COORIENTADOR: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lydia Masako Ferreira

Prof. Dr. Marcel Jun Sugawa Tamaoki

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Regeneração Tecidual Ecto e Mesodérmica

LINHA DE PESQUISA: Instrumentos de Medição da Regeneração Tecidual e Nervosa

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, Maria e Almir, pela incansável batalha na formação dos filhos.

Aos meus irmãos, Alan e Alana, pela companhia nas trincheiras.

À minha esposa, Mayara, pela companhia e apoio nos novos momentos.

A todos os amigos e familiares que me acompanharam ao longo dessa batalha, a minha formação acadêmica.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao orientador, **PROF. DR. FLAVIO FALOPPA**, Professor Titular do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Escola Paulista de Medicina – Universidade Federal de São Paulo (DOT-EPM/UNIFESP), por ter incentivado e acreditado na realização deste estudo, além dos ensinamentos constantes relativos à vida profissional e acadêmica.

Ao coorientador, **PROF. DR. MARCEL JUN SUGAWARA TAMOKI**, Professor Adjunto e Livre Docente da Disciplina de Cirurgia da Mão e Membro superior do (DOT-EPM/UNIFESP), pelo apoio incondicional na realização deste estudo e pelo exemplo diário de dedicação à atividade assistencial e acadêmica.

À coorientadora, **PROFA. DRA. LYDIA MASAKO FERREIRA**, Professora Titular da Disciplina de Cirurgia Plástica do Departamento de Cirurgia da Escola Paulista de Medicina – Universidade Federal de São Paulo, pelo exemplo acadêmico e orientação durante a realização deste estudo.

Ao amigo e sempre orientador, **PROF. DR. FERNANDO GONÇALVES DE ALMEIDA**, Professor Adjunto e Livre Docente do

Departamento de Cirurgia da Escola Paulista de Medicina – Universidade Federal de São Paulo, pelo incentivo inicial e apoio contínuo ao longo dos anos.

Ao **PROF. DR. MANUEL DE JESUS SIMÕES**, Professor Titular do Departamento de Morfologia e Genética da Escola Paulista de Medicina – Universidade Federal de São Paulo, pelo apoio e incentivo na preparação do material.

Ao **PROF. FABIO TERUO MATSUNAGA**, Professor Adjunto da Disciplina de Traumatologia (DOT-EPM/UNIFESP), pelos ensinamentos, orientação e oportunidades proporcionadas.

Ao **PROF. NICOLA ARCHETTI NETTO**, Professor Afiliado da Disciplina de Cirurgia da Mão e Membro Superior do (DOT-EPM/UNIFESP), pelo apoio constante e oportunidades proporcionadas nas atividades de assistência.

Ao **DR. MARCELO HIDE MATSUMOTO**, Doutor em Ciências e Professor Afiliado da Disciplina de Cirurgia da Mão e Membro Superior

do (DOT-EPM/UNIFESP), pelo exemplo diário de dedicação a vida assistencial e acadêmica.

Ao **PROF. CARLOS EDUARDO DA SILVEIRA FRANCIOZZI**, Professor Afiliado da Disciplina de Traumatologia (DOT-EPM/UNIFESP), pelo apoio e incentivo nos momentos iniciais do estudo.

À **DRA. LETICIA SIQUEIRA DE SÁ BARRETO**, Pós-doutora na Disciplina de Urologia da Escola Paulista de Medicina – Universidade Federal de São Paulo, pelo apoio sempre certo e parceria nas atividades do estudo.

À **DRA. CAMILA GONZAGA DA SILVA**, Doutora em Ciências na Disciplina de Urologia da Escola Paulista de Medicina – Universidade Federal de São Paulo, pelo apoio sempre certo e parceria nas atividades do projeto.

À **DRA. AHY NATALLY NAKAMURA**, Doutora em Ciências na Disciplina de Urologia da Escola Paulista de Medicina – Universidade Federal de São Paulo, pelo desbravamento inicial das técnicas de descelularização.



À **SRA. ROSELI N. P. PASCHOA**, pelo apoio e suporte durante a realização desse projeto.

Aos amigos e docentes do **GRUPO DE CIRURGIA DO OMBRO E COTOVELO DA DISCIPLINA DE CIRURGIA DA MÃO E MEMBRO SUPERIOR DA ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA**, Dr Renato Arouca Zan, Dr. Artur Yudi Utino, Dr. Eduardo Misao Nishimura, Dr. Rubens Guilherme Gonçalves, Dr. Lauro José Rochetti Pajolli, Dr. Fabio Anauate Nicolao, Dr. João Alberto Yazigi Junior e Dr. Luiz Fernando Centenaro, pelo apoio contínuo e irrestrito na realização desse trabalho.

Aos amigos e docentes do **GRUPO DE PESQUISA DE MEDICINA BASEADA EM EVIDÊNCIAS** com atividades inseridas no **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL DA ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA**, pela troca de conhecimentos e auxílio no desenvolvimento do estudo.

Aos amigos, funcionários e docentes do **DEPARTAMENTO DE ORTOPEDIA E TRAUMATOLOGIA DA ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA**, pelos ensinamentos e apoio durante a vida acadêmica.

Aos amigos e docentes do **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL DA ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA**, pelas sugestões ao projeto durante as reuniões.

Aos amigos, funcionários e docentes do **CENTRO DE PESQUISAS EM UROLOGIA DA ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA**, pelo apoio técnico para a realização desse estudo.

- Que gigantes? – Disse Sancho Pança.
- Aqueles ali, de braços compridos – respondeu o amo. – Alguns costumam ter braços de quase duas léguas.
- Olha vossa mercê – respondeu o Sancho -, aqueles que estão ali não são gigantes, mas moinhos de vento, e os que neles parecem braços são as pás, que, rodadas pelo vento, fazem trabalhar as mós.

*Miguel de Cervantes*

# SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	V
AGRADECIMENTOS	VI
LISTAS	XIII
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XIX
1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVO	08
3. LITERATURA	10
4. MÉTODO	25
5. RESULTADOS	52
6. DISCUSSÃO	73
7. CONCLUSÃO	81
8. REFERÊNCIAS	83
APÊNDICES	94
ANEXOS	101

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Delineamento experimental geral	28
<b>Figura 2.</b> Delineamento experimental avaliação do controle e do <i>scaffold</i>	29
<b>Figura 3.</b> Delineamento experimental das avaliações <i>in vivo</i>	29
<b>Figura 4.</b> Protocolo de descelularização – apresentação esquemática	33
<b>Figura 5.</b> Protocolo de lesão do modelo experimental <i>in vivo</i>	35
<b>Figura 6.</b> Modelo Experimental <i>in vivo</i> - Intervenção (Lesão + <i>Scaffold</i> )	36
<b>Figura 7.</b> Modelo Experimental <i>in vivo</i> – Controle (Lesão)	37
<b>Figura 8.</b> Teste de tração	40
<b>Figura 9.</b> Gráfico Força x Deformação	41
<b>Figura 10.</b> Fórmulas matemáticas utilizadas nos cálculos da avaliação biomecânica	41
<b>Figura 11.</b> Representação fotográfica do corte histológica após decomposição da imagem no <i>Software Image J</i>	45
<b>Figura 12.</b> Representação fotográfica do método de quantificação das estruturas nucleares	47
<b>Figura 13.</b> Deformação relativa x Força máxima do controle e <i>scaffold</i> – representação gráfica em formato <i>Dot Plot</i>	53
<b>Figura 14.</b> Área de secção do controle e <i>scaffold</i> – representação gráfica em formato de barras	54
<b>Figura 15.</b> Tensão e módulo de elasticidade do controle e <i>scaffold</i> – representação gráfica em caixas	56
<b>Figura 16.</b> Histologia em H&E - Controle x <i>Scaffold</i>	57
<b>Figura 17.</b> Histologia H&E – Controle x <i>Scaffold</i> (Núcleo)	58
<b>Figura 18.</b> Histologia DAPI – Controle x <i>Scaffold</i>	59

<b>Figura 19.</b> Histologia Masson - Controle x <i>Scaffold</i>	60
<b>Figura 20.</b> Histologia Picrosirius – Controle x <i>Scaffold</i>	60
<b>Figura 21.</b> Análise da remoção do material nuclear no <i>scaffold</i>	61
<b>Figura 22.</b> Histologia H&E - Controle <i>in vivo</i> 2 semanas	62
<b>Figura 23.</b> Histologia H&E – Controle <i>in vivo</i> 8 semanas	63
<b>Figura 24.</b> Histologia H&E – Intervenção <i>in vivo</i> 2 semanas	64
<b>Figura 25.</b> Histologia <i>in vivo</i> H&E - Intervenção 8 semanas	65
<b>Figura 26.</b> Análise semi-quantitativa da invasão celular no <i>scaffold</i> ao longo do tempo de pós-operatório	66
<b>Figura 27.</b> Aspecto macroscópico da descelularização	68
<b>Figura 28.</b> Aspecto macroscópico da avaliação <i>in vivo</i> – Controle <i>in vivo</i>	70
<b>Figura 29.</b> Aspecto macroscópico da avaliação <i>in vivo</i> – Intervenção <i>in vivo</i>	71

# LISTA DE ABREVIATURAS SIGLAS, ACRÔNIMOS E SÍMBOLOS

<b>ANOVA</b>	Análise de Variância
<b>ARRIVE</b>	<i>Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments</i>
<b>ASecção</b>	Area de Secção
<b>CEDEME</b>	Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia
<b>CEUA</b>	Comissão de Ética no Uso de Animais
<b>D</b>	Largura
<b>DAPI</b>	4,6-diamidino-2-fenilindol
<b>DP</b>	Desvio Padrão
<b>DeCS</b>	Descritores em Ciências da Saúde
<b>Def</b>	Deformação
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DNase</b>	Deoxiribonuclease
<b>DOA</b>	Desoxicolato de sódio
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino etraacético

<b>FMax</b>	Força máxima
<b>Granja RG-PR</b>	Granja Roberto Giannichi Filho
<b>H&amp;E</b>	Hematoxilina & Eosina
<b>hr</b>	Hora
<b>MEC</b>	Matriz extra celular
<b>Mpa</b>	Mega Pascal
<b>Micro-CT</b>	Microtomografia
<b>min</b>	Minutos
<b>mm</b>	Milímetro
<b>mm<sup>2</sup></b>	Milímetro quadrado
<b>N</b>	Newton
<b>PBS</b>	Solução salina tamponada de fosfato
<b>PGA</b>	Ácido Poliglicólico
<b>PLA</b>	Poliácido láctico
<b>PO</b>	Pós-operatório
<b>Rnase</b>	Ribonuclease



<b>SAL6</b>	<i>Sterility insurance levels of 10<sup>-6</sup></i>
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato de sódio
<b>SEM</b>	Semanas
<b>SIS</b>	<i>Small Intestinal Submucosa</i>
<b>TMax</b>	Tensão Máxima
<b>TnBP</b>	Tributil fosfato
<b>Triton X-100</b>	t-octil-fenoxipolietoxietanol
<b>UNIFESP</b>	Universidade Federal de São Paulo
<b>µm</b>	micrometro

## RESUMO

**Introdução:** A utilização de *scaffolds* apresentou crescimento expressivo nos últimos anos, principalmente em lesões de tecidos moles com grande perda tecidual. Na busca por técnicas capazes de otimizar a integração *scaffold*-tecido, é cada vez maior o número de estudos com técnicas de descelularização. **Objetivo:** Desenvolvimento e avaliação das características biomecânicas, macroscópicas, histológicas e *in vivo* do *scaffold* oriundo de tendão descelularizado em coelhos. **Método:** Foram utilizados 36 tendões do músculo gastrocnêmio de coelhos Nova Zelândia puro. Desse material, 11 foram usados como controle, enquanto 25 foram descelularizados (*Scaffold*). Os grupos foram submetidos a avaliação histológica, macroscópica e biomecânica, sendo o *scaffold* submetido a avaliação adicional *in vivo*. Para a avaliação *in vivo*, utilizamos oito coelhos adicionais, que foram submetidos ao modelo experimental de lesão bilateral do manguito rotador e inserção do *scaffold* em um dos lados, sendo o contralateral utilizado como controle. **Resultados:** O *scaffold* oriundo de tendão descelularizado apresentou alteração na arquitetura, evidenciada pelo aumento na distância inter/intrafascicular e manutenção do paralelismo da MEC. Verificou-se substancial remoção do material nuclear, evidenciada pela diminuição e desorganização do material nuclear remanescente. Na análise biomecânica, não foi encontrada diferença entre os grupos quando se analisou força máxima, rigidez e deformação relativa. Na avaliação *in vivo*, foi notada infiltração celular progressiva no *scaffold*. **Conclusão:** O protocolo de descelularização proposto produziu um *scaffold* com baixa celularidade, manteve as principais características biomecânicas e permitiu integração tecidual progressiva, quando usado com a função de *augmentation*.

## ABSTRACT

**Introduction:** The use of scaffolds has considerably advanced in recent years, mainly in soft tissue injuries with large damage to the original tissue. In a way to optimize the tissue-scaffold integration, the research of decellularized scaffold is growing. **Objective:** This paper aimed to produce and evaluate decellularized tendon scaffolds from biomechanical, microscopic, macroscopic, and *in vivo* perspectives in rabbits. **Methods:** Thirty-six tendons from adult New Zealand rabbits were used: 11 were used as controls, and 25 were decellularized (Scaffold). The groups were subjected to histological, biomechanical, and macroscopic analyses, and the scaffold was submitted to an additional *in vivo* evaluation. In this evaluation, we have used eight additional rabbits in the experimental model of a bilateral rotator cuff tear and insertion of the scaffold on one side and the contralateral used as a control. **Results:** The scaffold showed alteration in the architecture; we have noted it with the increment of intra/inter-fascicular distance, and no change in the parallelism of ECM. And a substantial loss of nuclear material, we have established it in the reduction and disorganization of remaining nuclear material. In the biomechanical analysis, no significant differences were found after analysing the ultimate tensile load, stiffness, and elongation at the ultimate tensile load. During the *in vivo* evaluation was noted progressive cell infiltration in the scaffold. **Conclusion:** The evaluated decellularization protocol made a tendon scaffold, maintained the most important biomechanical characteristics, and permitted progressive tissue integration, when it was used in an augmentation function.

## **1. INTRODUÇÃO**

Lesão de tecidos moles é um termo utilizado para designar uma série de doenças com origem tendinosa, ligamentar e muscular (MORAES *et al.*, 2013). A importância desses casos tem aumentado progressivamente e está comumente relacionada a um alto custo socioeconômico e tempo prolongado de afastamento das atividades profissionais (GARRETT, 1996; LONGO *et al.*, 2011; TASHJIAN, 2012).

O tratamento dessas doenças é extremamente variado, dependendo principalmente da localização anatômica e do tipo de lesão estudada (MORAES *et al.*, 2013). Nessas afecções, espera-se que a cicatrização dos tecidos seja adequada após a realização do tratamento convencional. Contudo, em algumas situações nas quais esse processo não ocorre existe uma grande motivação para o desenvolvimento de novos substitutos, sejam eles enxertos ou *scaffolds* (PARMAKSIZ *et al.*, 2016). Na atualidade, as lesões tendinosas (seja no manguito rotador ou flexores e extensores dos dedos e punho) com perda de tecido e lesões ligamentares do joelho são as afecções clínicas com maior necessidade dos substitutos, visto que o tratamento atualmente utilizado apresenta uma série de limitações, principalmente no que se refere à cicatrização e à consequente recuperação funcional (PARMAKSIZ *et al.*, 2016; BAILEY *et al.*, 2019).

Nesse sentido, um substituto tendinoso ideal, para ser utilizado em lesões musculoesqueléticas, deve apresentar algumas características básicas: (a) estrutura em três dimensões com alta porosidade; (b) mínimo material celular, procurando evitar resposta inflamatória; (c) citocompatibilidade; e (d) propriedades biomecânicas adequadas para suportar as necessidades mecânicas da reabilitação até o completo povoamento celular e cicatrização (WHITLOCK *et al.*, 2007; CHENG, SOLORIO, & ALSBERG, 2014).

No entendimento conceitual, enxertos são substitutos tendinosos que normalmente estão prontos para serem empregados após a sua coleta ou determinado protocolo de preparação (PARK *et al.*, 1980; ZARICZNYJ, 1983; CURTIS, DELEE, & DREZ, 1985).

Já os *scaffolds*, na tradução literal para a língua portuguesa, andaimes (ou tecidos suporte, segundo os descritores DeCS), são estruturas que, por definição, devem permitir infiltração e crescimento celular (LANGER & VACANTI, 1993). Os *scaffolds* idealmente possuem estrutura em três dimensões, alta porosidade, biodegradabilidade e, ao final do repovoamento, devem apresentar características semelhantes ao tecido nativo (LAURENCIN *et al.*, 1999; CRAPO, GILBERT, & BADYLAK, 2012). Além disso, podem realizar a função de um enxerto ao serem transplantados *in vivo*, bem como facilitar a infiltração celular, permitindo, assim, a replicação de células dentro de sua estrutura (ROSSI, POZZOBON, & DE COPPI, 2010).

Os enxertos ou *scaffolds*, quando utilizados como substitutos de lesões musculoesqueléticas, podem exercer duas funções: (i) *augmentation*, quando reforçam a técnica cirúrgica empregada; (ii) *bridge*, quando preenchem um determinado espaço vazio que as estruturas nativas não conseguiram preencher (LIU *et al.*, 2018). Independentemente da função em que o substituto é utilizado, o objetivo final mantém-se o mesmo: a cicatrização tecidual adequada e consequente recuperação funcional.

Um dos mecanismos utilizados para classificar os substitutos, sejam eles enxertos ou *scaffolds*, é de acordo com a sua origem e composição. Eles são divididos em sintéticos ou biológicos. Os sintéticos são normalmente polímeros produzidos de forma industrializada e apresentam uma estrutura que deve ter por objetivo a integração tecidual (HODDE, 2002; LONGO *et al.*, 2011). Na rotina ortopédica, o Poli-urethaneuréia (SportMesh®,

Arthrotek, Warsaw, IN, USA), o Poli-L-Lactide (X-repair®, Synthasome, Del Mar, CA, USA) e o Polytetrafluoroethylene (Gore-Tex®, Gpre, Flagstaff, AZ, USA) já foram aprovados por órgãos regulamentadores e são utilizados em alguns países (DERWIN *et al.*, 2010; LONGO *et al.*, 2012; SHEPHERD, LAM, & MURRELL, 2014). No entanto, os resultados clínicos relacionados à utilização dos substitutos de origem sintética ainda apresentam controvérsias e variam de acordo com o material escolhido, tecido substituído e técnica realizada (VENTURA *et al.*, 2010; SHEPHERD, LAM, & MURRELL, 2014).

Quanto aos substitutos biológicos, eles podem ser subdivididos de acordo com a sua origem em (i) autógenos (doador e receptor são o mesmo indivíduo), (ii) alógenos (doador e receptor são indivíduos diferentes da mesma espécie) e (iii) xenógenos (doador e receptor são de espécies diferentes) (ANDREASSI *et al.*, 2005; CHENG, SOLORIO, & ALSBERG, 2014). Os autógenos são atualmente aceitos como o padrão ouro para a utilização em lesões de tecidos moles, em razão, principalmente, da integração tecidual satisfatória e dos consequentes desfechos clínicos favoráveis. Todavia, a morbidade relacionada à sua coleta e a limitada disponibilidade são algumas das desvantagens relacionadas à sua utilização (CHENG, SOLORIO, & ALSBERG, 2014).

Diferentemente dos autógenos, os substitutos alógenos podem eliminar a morbidade cirúrgica do sítio doador relacionada à sua coleta, além de diminuir o tempo cirúrgico. Todavia, o risco de resposta imune descontrolada, potencial para transmissão de doenças e menor potencial de integração tecidual, quando comparado aos autógenos, são algumas das desvantagens relacionadas à sua utilização (GAZDAG *et al.*, 1995). Atualmente, o GraftJacket™ (GraftJacket™, Wright, Memphis, TN, USA) e o AlloDerm® (AlloDerm®, Allergan, Coolock, DL, IRL) são dois

substitutos com origem alógena industrialmente processados e disponíveis comercialmente em alguns países que apresentam resultados clínicos controversos (WONG, BURNS, & SNYDER, 2010; WISE, 2015; ONO *et al.*, 2017).

Por fim, os substitutos com origem xenógena, de forma similar aos de origem alógena, eliminam a morbidade cirúrgica no sítio doador e, por isso, teoricamente diminuem o tempo cirúrgico (SEYLER *et al.*, 2017). Todavia, a sua utilização já foi contraindicada, devido ao relato de resultados clínicos insatisfatórios (WALTON *et al.*, 2007) relacionados, entre outros motivos, à presença do antígeno de superfície  $\alpha$ -gal epitope (CHENG, SOLORIO, & ALSBERG, 2014). Desde então, as pesquisas utilizando enxertos de origem xenógena passaram a realizar protocolos específicos recomendando análise desse antígeno de superfície (SEYLER *et al.*, 2017). Atualmente, o Restore® (Restore®, Depuy J&J, Monument, CO, USA) originado de submucosa intestinal suína, o TissueMend™ (TissueMend™, TEI Biosciences Inc., Boston, MA, USA) oriundo de derme fetal bovina, e o CuffPatch™ (CuffPatch™, Organogenesis Inc, Canton, MA, USA) proveniente de submucosa intestinal suína, são exemplos de substitutos xenógenos processados industrialmente e disponíveis comercialmente (CHEN *et al.*, 2009).

O processamento dos substitutos alógenos e xenógenos disponíveis apresenta uma série de diferenças de acordo com o tecido original e as instituições relacionadas à sua distribuição (CHEN *et al.*, 2009). Independentemente do processamento escolhido, a finalidade do protocolo, que é a minimização da resposta inflamatória e a facilitação da integração tecidual, não é modificada (CHENG, SOLORIO, & ALSBERG, 2014). Habitualmente esse processamento utiliza técnicas com o objetivo de



diminuir a sua celularidade, processo esse conhecido como descelularização ou acelularização (LIVESEY *et al.*, 1995; XING *et al.*, 2014).

Com base nas limitações relacionadas aos substitutos empregados atualmente, há uma forte tendência de utilização de substitutos biológicos, retirados e aplicados na mesma espécie (alógenos), com morfologia igual ao tecido que pretendem substituir e processados por técnicas de descelularização (ZHANG *et al.*, 2009; CHENG, SOLORIO, & ALSBERG, 2014).

A elaboração de substitutos descelularizados envolve diversos protocolos que variam de acordo com o tecido ou órgão alvo, sendo os mais efetivos uma combinação de técnicas físicas, químicas e enzimáticas. De forma geral, os tecidos são submetidos a agentes descelularizantes ao longo do tempo com determinada técnica de aplicação (CRAPO, GILBERT, & BADYLAK, 2012; SCHULZE-TANZIL *et al.*, 2012; LOVATI, BOTTAGISIO, & MORETTI, 2016). Quando se analisa de forma isolada os protocolos de descelularização tendinosa, estudos recentes demonstram não existir diferença biomecânica e histológica entre os principais protocolos de descelularização, desde que incluam combinação de pelo menos dois dos seguintes detergentes: SDS (dodecilsulfato de sódio), Triton X-100 (toctilfenoxipolietoxietanol) e TnBP (1% trinbutil fosfato) (XING *et al.*, 2014).

Alguns substitutos oriundos de tendão descelularizado, como os flexores do joelho, flexor dos dedos e o tendão do diafragma, já foram avaliados em outros estudos experimentais e apresentaram resultados satisfatórios na avaliação biomecânica e histológica (WHITLOCK *et al.*, 2007; DEEKEN *et al.*, 2011; SCHULZE-TANZIL *et al.*, 2012; XING *et al.*, 2014). Todavia, não existem na literatura estudos que avaliem substitutos

descelularizados com toda sua espessura preservada e produzidos através de uma combinação de detergentes em um modelo animal de lesão do manguito rotador. Particularmente no cenário nacional, não existem estudos apresentando resultados, sejam eles *in vivo* ou *in vitro*, de *scaffolds* oriundos de tendão descelularizados.

A maior parte dos estudos de reconstrução tendinosa e ligamentar com os substitutos ainda está em fase de avaliação experimental com animais e, dentre eles, o coelho apresenta-se como um dos modelos animais mais utilizados para avaliação das reconstrução de lesões tendíneas (OUYANG *et al.*, 2003; JUNCOSA-MELVIN *et al.*, 2006; CHONG *et al.*, 2007; OH *et al.*, 2014).

Desta forma, na busca de alternativas para reconstrução tendinosa, este trabalho propõe avaliar a hipótese de que o protocolo de descelularização proposto é capaz de produzir tecido com baixa celularidade e com biomecânica adequada para ser implantado em procedimentos de reconstrução tendinosa.

## **2. OBJETIVO**

## Objetivo

Desenvolvimento e avaliação das características biomecânicas, macroscópicas, histológicas e *in vivo* do *scaffold* oriundo de tendão descelularizado em coelhos.

### **3. LITERATURA**

ROBSON (1889) é a primeira referência na literatura médica à utilização de enxerto tendinoso (*graft*). Nesse relato de caso, o autor propôs a utilização de enxerto dos flexores da mão para reconstrução dos extensores em um paciente com lesão grave da mão. Afirmou o autor, ainda, que uma das opções mais utilizadas na época para essa lesão seria a amputação da mão.

LANGE (1905) foi o primeiro autor a ter o seu artigo, cujo tema central era transplante tendinoso, traduzido para a língua inglesa. Nesse artigo, foram apresentados os resultados do autor para evitar recorrência de deformidade dos pés com utilização de transplante tendinoso. Ademais, o autor apresentou uma série de casos nos quais foi utilizada uma técnica cirúrgica que conhecemos atualmente como transferência tendinosa, e não um transplante tendinoso, com utilização de enxerto.

KURTZ (1919) apresentou o conceito de *free tendon transplant*. O autor em questão utilizou a técnica *free tendon transplant* para reconstrução dos tendões flexores, utilizando-se de enxerto autólogo dos tendões extensores. O trabalho apresentado foi o relato de um caso após insucesso do tratamento convencional, o qual, segundo o autor, teve evolução satisfatória no que se refere a ganho de movimento e controle do quadro infeccioso.

GALLIE & LE MFASURIER (1922) apresentaram uma revisão narrativa a respeito de pacientes que foram submetidos a transplante tendinoso, com tendão autólogo, para tratamento das seguintes afecções ortopédicas: instabilidade fêmoro-patelar e lesões tendinosas graves nos quais a sutura término-terminal não era possível. Essa série de casos apresentou resultados animadores e indicou a existência de inúmeras possibilidades que poderiam ser explorados para o transplante tendinoso.

MASON & SHEARON (1932) utilizaram um modelo canino de lesão do extensor radial do carpo, no qual os animais eram submetidos a reconstrução tendinosa utilizando enxerto autólogo do membro contralateral. Nesse trabalho, os autores apresentaram quatro conceitos essenciais para o sucesso da utilização de enxertos tendinosos: (i) o peritendão deve ser aproximado do tendão e do enxerto para favorecer a cicatrização; (ii) a anastomose término-terminal é benéfica para a cicatrização; (iii) movimentos contínuos devem ser iniciados no quinto/sexto dia, entretanto não podem ser forçados antes de completar três semanas; (iv) defeitos tendinosos devem ser preenchidos com enxertos, já que eles não perdem suas propriedades elásticas como ocorre com outros tecidos.

HEY-GROVES (1934) descreveu uma série de procedimentos cirúrgicos ortopédicos que podem demandar a utilização de enxertos tendinosos. Dentre os procedimentos descritos, o autor referiu a possibilidade de sua utilização na instabilidade do ombro, cotovelo, joelho, patelar e têmporo-mandibular.

LITTLER (1947) descreveu a utilização de enxerto tendinoso autólogo para lesão grave do tendão flexor dos dedos. Nessa série de casos com trinta e seis tendões autólogos utilizados, a grande maioria dos pacientes apresentou resultado excelente ou bom. Esse foi um dos primeiros trabalhos a descrever de forma precisa a utilização de enxerto tendinoso para uma afecção clínica específica, em um número razoável de pacientes e apresentando avaliações clínicas no seguimento.

GRAU (1958) descreveu limitações relacionadas à utilização de enxerto autólogo e apresentou um tendão artificial (enxerto sintético) como possibilidade para esses casos. Utilizando o modelo canino de lesão do

tendão calcâneo, o autor utilizou enxerto sintético (fio ou seda com envoltório de polietileno) com o objetivo de que esse material fosse capaz de exercer a função do tecido tendinoso. Como resultado, o autor refere que não existiu aderência na interface polietileno/tecido cicatricial e que não existe cicatrização entre o enxerto e o tecido muscular. Todavia, o autor refere que a conexão entre o enxerto sintético e o calcâneo era suficientemente forte no momento da observação.

FLYNN *et al.* (1960) foram responsáveis por uma comparação entre transplante de tendão autólogo e heterólogo (também conhecido como xenógeno) utilizando um modelo canino de lesão do extensor radial do carpo. Nesse estudo, foi realizada a comparação entre a utilização de enxerto autólogo e xenógeno de origem bovina para reconstrução do modelo de lesão tendinosa. Como resultado, o autor refere que a cicatrização com utilização de enxerto de origem xenógeno apresenta pequenas diferenças comparadas com o de origem autóloga, não apresentando diferença significativa entre os enxertos avaliados.

WHITE (1960) descreveu cinco sítios para coleta de enxerto autólogo (palmar longo, plantar, extensor longo dos dedos, extensor próprio do indicado e flexor dos dedos) e apresentou as principais vantagens e desvantagens relacionadas a cada enxerto. Nesse trabalho, o autor já apresentou disponibilidade, acessibilidade, incapacidade resultante e tamanho como sendo as principais limitações relacionadas aos enxertos de origem autóloga.

PEACOCK & MADDEN (1967) apresentaram o resultado clínico relacionado à utilização de enxerto tendinoso com origem alógena em 10 pacientes. Nesse trabalho, a utilização do enxerto com origem alógena foi



indicada para pacientes já submetidos a reconstrução tendinosa e que apresentaram falha no procedimento inicial com tendão de origem autóloga. Segundo o autor, os resultados clínicos foram satisfatórios na maior parte dos casos e não foram observados sinais significantes de antigenicidade.

SMITH (1967) descreveu a integração tecidual entre o tecido alógeno e o hospedeiro. Para tal finalidade, o autor avaliou resultados histológicos *post-mortem* de pacientes submetidos ao transplante de válvulas cardíacas. Nesse estudo, o autor já mencionava o tecido alógeno implantado como fibroso e acelular, sendo essas características típicas do *scaffolding*.

VRACKO & BENDITT (1972) apresentaram as primeiras descrições precisas relativas aos *scaffolds*. Nesse trabalho realizado com um modelo experimental de lesão muscular em coelhos, os autores notaram algumas peculiaridades relacionadas a cicatrização muscular. Foi notado que o repovoamento e crescimento celular ocorre inicialmente ao longo de uma superfície capaz de suportar células, a lâmina basal. Essa superfície capaz de suportar e favorecer o crescimento celular foi então descrita como *scaffold*. O autor citou, ainda, que após o processo de cicatrização, a lâmina basal é removida pelo próprio tecido cicatricial, caracterizando reabsorção.

ARAGONA *et al.* (1981) utilizaram modelo experimental em coelhos de lesão do tendão do músculo gastrocnêmio e realizaram a reparação desse tendão adicionado a um reforço do *scaffold* sintético (PLA). Na avaliação microscópica e biomecânica, os autores demonstraram resultados animadores quando se analisou a integração tecidual e a força máxima suportada pelo tendão. Nesse trabalho, os autores observaram infiltração celular progressiva na região onde o *scaffold* foi implantado.

RODKEY *et al.* (1985) utilizaram modelo experimental de lesão do tendão calcâneo em coelhos e a reconstrução dessa lesão com utilização de um material sintético (PGA-dacron). Nesse trabalho, utilizaram o material exercendo a função de preenchimento (*bridge*) e reforço (*augmentation*). Após avaliação com 8 semanas, concluíram que o PGA-dacron apresentava propriedades biomecânicas suficientes para ser utilizado em ambas as funções a que foi submetido, porém não permitiu invasão celular dentro de sua estrutura, não funcionando para a formação de tecido tendinoso.

BADYLAK *et al.* (1989) foram os primeiros autores a descreverem um protocolo de descelularização utilizando técnica física. Nesse trabalho, os autores descreveram o procedimento de descelularização da pequena submucosa intestinal (SIS) e utilizaram esse biomaterial para reconstrução de tecido vascular em um modelo animal de cachorros. Como conclusão os autores acreditam que a pequena submucosa intestinal autóloga pode substituir de forma satisfatória artérias com diâmetro alargado.

RICCI, GONA & ALEXANDER (1991) compararam a curva de crescimento de uma cultura celular, de células tendinosas, utilizando um *scaffold* sintético de fibra de carbono pirolítico como suporte e uma placa de cultura convencional. Ao final do período de análise, os autores afirmaram que a cultura celular em placa convencional (duas dimensões) apresentava diferenças relevantes quando comparada com a cultura em três dimensões.

LANGER & VACANTI (1993) definiram a engenharia tecidual como um campo de pesquisa interdisciplinar que tem como objetivo principal o desenvolvimento de substitutos biológicos que possam restaurar, manter e melhorar a função dos tecidos. Nesse mesmo estudo, também foram apresentados os três pilares básicos da engenharia tecidual: (i) células, de

forma que possam se replicar em uma determinada matriz; (ii) indutores do crescimento, que possuam a capacidade de estimular o crescimento e replicação celular dentro de uma determinada matriz e (iii) *scaffold*, sendo uma matriz biológica ou sintética que possua a capacidade de permitir infiltração e replicação celular.

BADYLAK *et al.* (1999) compararam a utilização de um *scaffold* oriundo de submucosa intestinal suína descelularizada com o enxerto autólogo de tendão patelar em um modelo ovino de reconstrução do ligamento cruzado anterior. Ao final do estudo, o autor referiu ter notado uma diminuição significativa das propriedades biomecânicas do *scaffold* oriundo da submucosa intestinal nos primeiros meses de pós-operatório com recuperação dessas propriedades após um ano de pós-operatório. O autor referiu também que o *scaffold* permitiu infiltração celular e favoreceu a deposição de nova matriz extracelular.

GOISSIS *et al.* (2000) foram os primeiros autores brasileiros a apresentar um protocolo de descelularização. Nesse estudo, os autores realizaram a descelularização de diferentes vasos sanguíneos oriundos de cachorros com um protocolo que consistia basicamente em dimetilsulfóxido, sais alcalinos, EDTA e solução tampão. Como resultado, os autores concluíram que o protocolo era eficiente na remoção de material nuclear, entretanto a eficiência do protocolo está relacionada com o tamanho da estrutura que será submetida ao protocolo de descelularização.

CARTMELL & DUNN (2000) foram os primeiros autores a publicar trabalhos comentando sobre protocolos de descelularização em tendão. Para planejamento desse protocolo o autor utilizou técnicas de descelularização anteriores, descritas para pericárdio bovino e válvulas cardíacas que

utilizavam SDS, Triton x-100 e TnBP. Nesse trabalho, os autores compararam três protocolos diferentes para descelularização do tendão oriundo de ratos. Concluíram que a utilização desses protocolos é capaz de remover o material celular, todavia determinados detergentes podem causar alterações importantes na arquitetura do biomaterial.

HERSON *et al.* (2001) apresentaram um protocolo de preparo e descelularização de pele humana que utilizava glicerol, dispase, tripsina e EDTA como agentes descelularizantes associados com técnicas físicas. Para avaliação dos resultados, foi realizada quantificação da replicação celular, além de avaliação histológica e imuno-histoquímica. Como resultado, foi notado que o tecido pós-descelularização apresentava características típicas de tecido cutâneo, além de funcionar como um bom suporte para a replicação celular. Vale lembrar, ainda, que esse estudo foi pioneiro na apresentação de um protocolo nacional de descelularização cutânea, o qual até os dias atuais é utilizado como referência para o planejamento de banco de tecidos.

COSTA *et al.* (2004) realizaram comparação entre enxerto valvar de origem alógena criopreservado e enxerto de origem heteróloga submetido a um protocolo de descelularização com etanol e ácido desoxicólico. Para realização desse estudo, os autores utilizaram um modelo experimental de lesão valvar em ovelhas e submeteram o animal a avaliação funcional com ecocardiograma, além de avaliação macroscópica, radiográfica e histológica. Como resultado os autores chegaram à conclusão de que as valvas cardíacas com origem heteróloga apresentaram performance satisfatória com 5 meses de pós-operatório, permitiram crescimento celular dentro de sua estrutura e não apresentaram sinais de calcificação ou degeneração. Esse foi o primeiro

estudo nacional comparando técnicas de descelularização com outros materiais comumente utilizados.

WOLLMANN *et al.* (2011) apresentaram protocolo nacional de descelularização para válvulas cardíacas. Nesse estudo, os pesquisadores compararam diversos protocolos de descelularização (DOA 1%, SDS 0,1% e SDS 0,3%), associados ou não com criopreservação. Para avaliação dos resultados, os autores propuseram metodologia histológica, descritiva e semiquantitativa. Ao final do estudo, os autores concluíram que a criopreservação está relacionada aos danos à MEC e, dentre os protocolos avaliados, a utilização de SDS 0,1% está relacionada com a remoção do material nuclear e a preservação da MEC.

DEEKEN *et al.* (2011) avaliaram diferentes métodos de descelularização com utilização do tendão do músculo diafragma oriundo de suínos. Nessa avaliação, o autor usava uma solução para equilíbrio iônico (*Tris Buffer Solution*) associado com agentes descelularizantes em diferentes concentrações (TnBP, Triton X-100 e SDS). O protocolo durava aproximadamente três dias e o material era mantido em constante imersão e agitação nesse período. Nesse protocolo, os autores referiram que a utilização de ácido peracético não era eficiente na remoção de material celular. Quanto aos outros agentes descelularizantes utilizados, o autor concluiu – através de avaliação histológica, biomecânica e mensuração do colágeno – que apenas a utilização do TnBP seria capaz de remover o material celular mantendo a estrutura do tecido intacta.

WOLLMANN *et al.* (2011) avaliaram, com metodologia histológica, a utilização de três protocolos diferentes de descelularização associados ou não à criopreservação em válvulas cardíacas com origem suína. Nesse

estudo, os autores já afirmaram que a utilização de SDS em concentração de 0,1% é capaz de remover o material nuclear causando mínimos danos à MEC. Nesse mesmo estudo, o autor referiu que a técnica de criopreservação comumente utilizada no banco de tecidos da sua região está relacionada com danos substanciais à MEC. Ainda sobre esse estudo, vale lembrar que ele foi realizado no Brasil e já apresentou resultados importantes relativos à concentração de SDS e à criopreservação.

CRAPO, GILBERT, & BADYLAK (2012) apresentaram o panorama geral dos protocolos de descelularização utilizados para os mais diversos tecidos. Nessa revisão os autores relataram que os *scaffolds* biológicos são normalmente compostos de MEC (Matriz Extracelular) oriundos de protocolo de descelularização. Nessa revisão os autores relataram todos os protocolos são relacionados com algum dano a arquitetura do material e que os protocolos devem variar de acordo com densidade, geometria, organização e propriedades biológicas de cada tecido.

WHITLOCK *et al.* (2012) avaliaram o protocolo de descelularização em tendões humanos publicado anos antes, que preconiza a utilização de ácido peracético e Triton X-100. Os autores avaliaram o *scaffold* através da histologia, biomecânica, quantificação do DNA remanescente, citotoxicidade, e avaliação em modelo animal *in vivo*. Como resultado, os autores concluíram que o protocolo proposto foi capaz de produzir um *scaffold* com baixa celularidade, citocompatível, com arquitetura capaz de permitir infiltração celular e propriedades biomecânicas similares ao tecido original.

XING *et al.*, (2014) compararam a utilização de seis protocolos diferentes de descelularização, todos com duração aproximada de quatro dias, em um modelo animal de coelhos. Nesse trabalho, os autores usaram

de forma isolada e combinações dos seguintes agentes descelularizantes: Triton X-100, SDS, TnBP. Na avaliação biomecânica, os autores não encontraram diferença entre os protocolos de descelularização analisados, com exceção da utilização isolada de TnBP, que foi relacionada com alteração na deformidade relativa do *scaffold*. No que concerne à avaliação histológica, o autor notou descelularização com maior eficácia nos protocolos que utilizavam combinação de detergentes.

PAN *et al.* (2015) avaliaram um *scaffold* proveniente de tendão descelularizado em um modelo animal de lesão do manguito rotador. Nesse trabalho, foram utilizadas fatias do *scaffold* descelularizado (oriundo de cachorros) obtido através de protocolo baseado em congelamento/descongelamento e incubação em solução de nucleases (Rnase e DNase), protocolo esse que foi publicado pelos mesmos autores anos antes. É importante lembrar que esse protocolo produz fatias do *scaffold* (*slices*) com origem equina que foram colocadas sobre a lesão do manguito rotador em coelhos, sendo assim um procedimento xenógeno. Como resultado, os autores notaram integração tecidual e invasão celular progressiva na região do *scaffold* com a evolução da cicatrização.

DONG *et al.* (2015) compararam enxertos de origem alógena com *scaffolds* oriundos de protocolos de descelularização também de origem alógena. Para avaliação *in vivo* desse *scaffold*, os autores trabalharam com um modelo de lesão do ligamento cruzado anterior em coelhos e utilizaram como desfecho as seguintes avaliações: biomecânica, histológica e exames de imagem (Micro-CT). Para realização do protocolo de descelularização o autor propôs uma combinação de ácido peracético, tripsina, EDTA, Triton X-100 e bicarbonato de sódio. Ao final do trabalho, os autores concluíram

que os *scaffolds* oriundos de alotendão descelularizado apresentaram melhor celularidade, vascularização, remodelamento da matriz de colágeno, cicatrização óssea e melhores propriedades biomecânicas quando comparado com o aloenxerto convencional.

LOVATI, BOTTAGISIO, & MORETTI (2016) revisaram os diversos protocolos de descelularização utilizados em tendões desde a primeira publicação referente a esse tema, em 2000. Nessa revisão, os autores encontraram quarenta artigos com referência a procedimentos de descelularização em tendões, sendo que o modelo animal de coelhos é o mais utilizado dentre todos os modelos animais disponíveis. Os autores relataram que a associação de detergentes foi o protocolo de descelularização mais utilizado e que dentre os desfechos utilizados, a avaliação histológica e a biomecânica foram as mais utilizadas. Como conclusão, afirmam que é necessária a normatização do protocolo de descelularização e de repovoamento celular, de forma que esse biomaterial se torne viável para protocolos clínicos.

ROTH *et al.* (2017) compararam protocolo de descelularização realizado com técnica de congelamento e descongelamento associada ao uso de agente descelularizante (Triton X-100), automatizado e feito manualmente. Nesse trabalho, os autores optaram por avaliação histológica e cálculo do DNA remanescente como método de avaliação. Os autores concluíram não existir diferença, nos parâmetros avaliados, entre os dois modos de realização do protocolo de descelularização.

WANG *et al.* (2017) revisaram os protocolos de descelularização tendinosa encontrados na literatura. Nesse trabalho, os autores citaram que protocolos com combinação de agentes descelularizantes contribuem de



forma significativa para remoção de material nuclear, sem promover grandes alterações na arquitetura local. Citaram também que o SDS, quando usado em concentração superior a 1%, promove degradação da MEC sem contribuir de forma efetiva na remoção de material nuclear. Quando se analisou a análise biomecânica, levantaram a hipótese de que o “inchaço” (*swelling*) está relacionado com a diminuição no módulo de elasticidade e tensão máxima. Na parte final da revisão, os autores citaram as várias técnicas utilizadas para repovoamento celular e suas eventuais aplicações na prática clínica.

LIU *et al.* (2018) avaliaram fatias oriundas de tendão descelularizado de cachorros em um modelo de lesão do manguito rotador de coelhos. Como método de avaliação, foi proposta a realização de avaliação histológica, biomecânica e exames de imagem (Micro-CT) em duas, quatro e oito semanas de pós-operatório. Ao final do trabalho, os autores concluíram que as fatias do *scaffold* promoveram crescimento celular, melhoraram o remodelamento tendinoso e promoveram o crescimento de fibrocartilagem.

XIE *et al.* (2019) utilizaram o modelo de lesão do ligamento cruzado anterior em coelhos para comparar *scaffolds* tendinosos com origem alógena e processados através um protocolo de descelularização semeados com células tronco de medula óssea com os mesmos *scaffolds* não semeados. Para realização dessa avaliação, o autor utilizou da avaliação biomecânica, histológica e por exames de imagem (Micro-CT). Como conclusão, o autor referiu que o *scaffold* oriundo de tendão descelularizado semeado com célula tronco obteve melhor ligamentização, cicatrização mais forte na interface tendão-osso e melhor ossificação do túnel ósseo.

BOTTAGISIO *et al.* (2019) compararam, através de um modelo animal (coelhos) de lesão do tendão calcâneo, a utilização de enxertos (origem xenógena) semeados ou não com células tronco de medula óssea com o padrão ouro (enxerto autólogo). Para essa análise, os autores optaram por avaliação biomecânica, histológica e quantificação de glicosaminoglicanos. Os autores notaram resultados similares na comparação entre enxertos de origem xenógena semeados com células tronco e o padrão ouro (enxerto autólogo), entretanto notaram resultados insatisfatórios na utilização de enxerto xenógeno não semeado.

EDWARDS, INGHAM, & HERBERT (2019) avaliaram as propriedades biomecânicas do tendão flexor de origem suína submetido ao protocolo de descelularização. Para realização desse processo, os autores utilizaram SDS, ácido peracético, nucleases, aprotinina, EDTA e PBS durante alguns dias, mantendo o material em constante imersão e agitação durante esse período. Como resultado, os autores encontraram diminuição no módulo de elasticidade e tensão máxima após o protocolo de descelularização, bem como manutenção na capacidade de deformação do *scaffold* oriundo do protocolo de descelularização. Os autores concluíram que essas alterações provavelmente estão relacionadas com o enrugamento e deslizamento das fibras de colágeno, além do inchaço (*swelling*) do tecido tendinoso. Com os resultados encontrados, os autores acreditam que o *scaffold* pode ser utilizado como um enxerto na reconstrução do ligamento cruzado anterior.

EREN *et al.* (2020) avaliaram *scaffold* oriundo de tendão descelularizado de origem suína através da biomecânica, histologia, citotoxicidade, avaliação *in vivo*, quantificação de material nuclear e de

glicosaminoglicanos. Para realização desse protocolo com duração aproximada de cinco dias, no qual intercalava limpeza do material com PBS, os autores utilizaram técnica de congelamento e descongelamento associado a nucleases e Triton X-100. Ao final do trabalho o autor concluiu que o *scaffold* produzido manteve as principais características histológicas e biomecânicas do tecido nativo, induziu a diferenciação de células-tronco em tendinócitos e teve integração tecidual satisfatória quando usada como implante xenógeno *in-vivo*.

BLAUDEZ *et al.* (2020) revisou diversos protocolos de descelularização apresentados na literatura e citou as vantagens e desvantagens relacionadas a cada agente descelularizante. De forma geral, o autor citou que os agentes utilizados atualmente, ao aumentarem sua capacidade de remoção celular, estão relacionados com maiores danos à MEC. Como problemas a serem enfrentados, antes da sua comercialização, o autor citou a utilização de protocolos de esterilização e um melhor entendimento a respeito do repovoamento celular.

## 4. MÉTODO

O estudo foi realizado com o apoio do CNPQ (Bolsa de Produtividade em Pesquisa) – Pesquisador nível 1C Prof. Dr. Flavio Faloppa (311237/2018-5) e auxílio financeiro do Centro de Pesquisas em Urologia da Escola Paulista de Medicina. O trabalho foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo (n° 527208916) e teve os relatórios parciais aprovados pelo mesmo comitê. Os animais foram fornecidos por empresa (Coelho Nova Zelândia Puro, Granja RG-PR, Suzano, SP, Brasil) e foram mantidos no Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Biologia e Medicina da Universidade Federal de São Paulo (CEDEME-UNIFESP).

#### **4.1 Desenho da pesquisa**

Trata-se de um estudo experimental, primário, intervencional, longitudinal, prospectivo, analítico, controlado, aleatorizado e realizado em centro único.

#### **4.2 Amostra**

Para a realização do estudo, foram utilizados 26 (vinte e seis) coelhos da raça Nova Zelândia puro, machos, com peso entre 3 e 3,5 kg, aproximadamente 8 meses de vida, provenientes de empresa (Coelho Nova Zelândia Puro, Granja RG-PR, Suzano, SP, Brasil) e mantidos no Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia da Universidade Federal de São Paulo (CEDEME-UNIFESP). Os animais permaneceram durante todo o período de estudo em gaiolas individuais

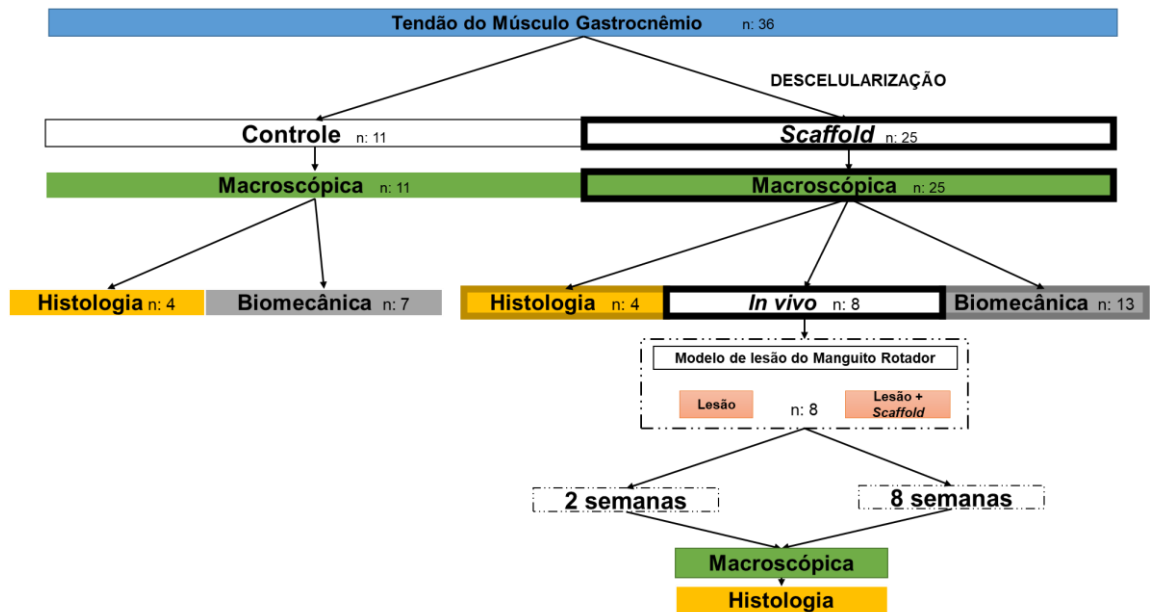
60x60cm, com ciclo de luz 12/12hrs, alimentação *ad libitum*, temperatura controlada em 22 °C, fechamento acústico e fluxo de ar controlado. Após serem recebidos no CEDEME-UNIFESP, os animais passaram por período de ambientação de 14 (quatorze) dias, período esse que leva em consideração o período de incubação das principais doenças. Caso os animais apresentassem alterações dos sinais clínicos, eles seriam submetidos a avaliação por veterinário e tratamento antes do início de qualquer etapa do trabalho. O trabalho foi realizado seguindo o *check-list* disponibilizado pelo ARRIVE (PERCIE DU SERT *et al.*, 2020) e seguindo as normas de cuidado com animal da Universidade Federal de São Paulo.

### 4.3 Delineamento

Os animais foram divididos em dois delineamentos diferentes, sendo um deles para avaliação e produção do *scaffold* oriundo de tendão descelularizado e um segundo para avaliação da reação inflamatória *in vivo* (figura 1).

Para avaliação e produção do *scaffold* oriundo de tendão descelularizado, foram coletados os tendões do músculo gastrocnêmio bilateralmente de 18 (dezoito) animais. Desses 36 (trinta e seis) tendões, 11 (onze) foram utilizados como controle e 25 (vinte e cinco) foram utilizados no protocolo de descelularização. Dentre os utilizados como controle, 4 (quatro) foram submetidos a avaliação histológica e 7 (sete) a avaliação biomecânica. Já dentre os 25 (vinte e cinco) submetidos ao protocolo de descelularização, 4 (quatro) foram submetidos a avaliação histológica, 13 (treze) a avaliação biomecânica e 8 (oito) a avaliação *in vivo* (figura 2). Todos os espécimes foram submetidos a avaliação macroscópica, visto que

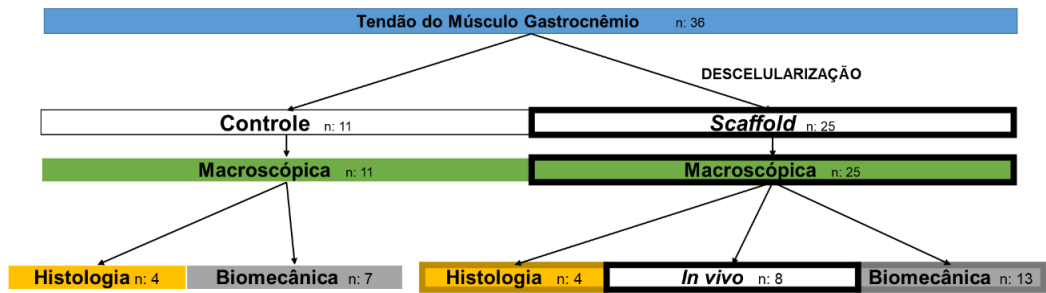
essa análise não causava danos estruturais ao material. No planejamento desse estudo, procuramos minimizar o número de animais utilizados e, ao mesmo tempo, apresentar significância estatística.



**Figura 1.** Delineamento experimental geral.

Delineamento experimental geral apresentando toda a organização do estudo.

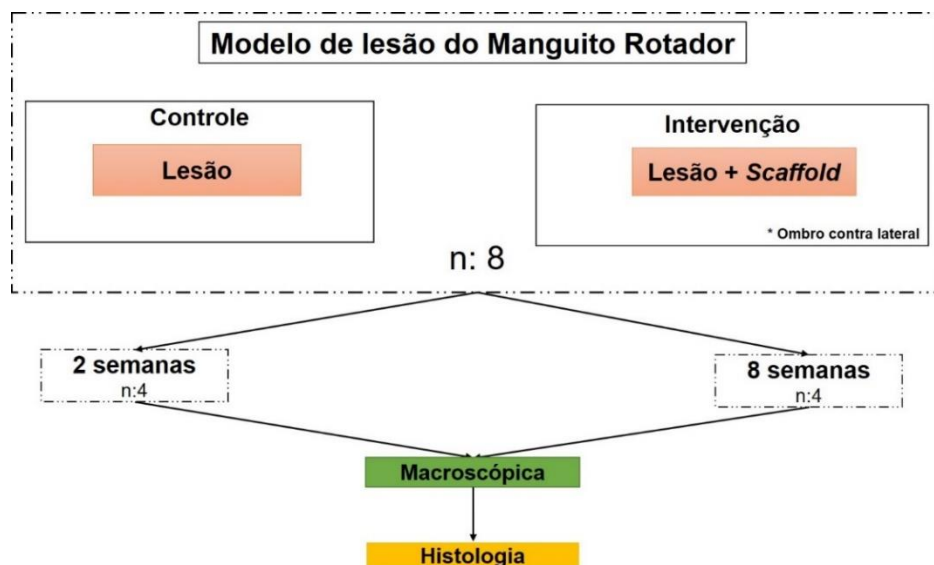
Para análise da reação inflamatória *in vivo*, foi realizado um protocolo de lesão tendinosa bilateral e inserção do *scaffold* em 8 (oito) animais adicionais. Dessa forma, o *scaffold* oriundo de tendão descelularizado foi colocado sobre o modelo de lesão tendinosa em apenas um dos lados, conforme randomização simples realizada previamente, sendo o contralateral utilizado como controle (controle *in vivo*). Em outras palavras, um dos lados sempre foi utilizado como controle *in vivo* (Lesão) em comparação com a intervenção (Lesão + *Scaffold*) realizada no contralateral.



**Figura 2.** Delineamento experimental avaliação do controle e do *scaffold*.

Delineamento experimental apresentando a respectivas avaliações do controle e do *scaffold*.

Os 8 (oito) animais adicionais pertencentes a esse grupo foram divididos em dois grupos, conforme randomização simples, sendo o primeiro submetido à coleta do material após duas semanas, a fim de avaliar a resposta inflamatória inicial. O segundo grupo, por sua vez, foi avaliado após oito semanas do implante, com o objetivo de qualificar a integração tecidual (figura 3).



**Figura 3.** Delineamento experimental das avaliações *in vivo*

Delineamento experimental e divisão dos grupos utilizados na avaliação adicional *in vivo*, demonstrando os oito animais submetidos ao procedimento bilateral e a coleta realizada com duas ou oito semanas.



## 4.4 Procedimentos

### 4.4.1 Anestesia e morte indolor induzida dos animais

Para realização do procedimento de coleta, seja dos tendões do músculo gastrocnêmio ou do manguito rotador após avaliação no modelo experimental *in vivo*, os animais foram submetidos ao seguinte procedimento de morte indolor induzida: administração intramuscular de Quetamina 150mg/kg + Xilazina 30mg/kg e verificação do óbito através de duas avaliações consecutivas dos sinais vitais, com intervalo mínimo de 20 (vinte) minutos entre elas. Após a realização dos procedimentos, a carcaça do animal foi depositada em saco branco lacrado com identificação de risco biológico e mantida em *freezer* até recolhimento pela empresa responsável.

Como procedimento anestésico para realização do modelo experimental *in vivo*, os animais foram submetidos à administração intramuscular de Tramadol 5mg/kg para analgesia pré-anestésica. Em seguida, os animais foram submetidos ao protocolo anestésico com administração intramuscular de Quetamina 50mg/kg e Xilazina 10mg/kg e antibioticoterapia profilática com Terramicina 50mg/kg. Ao final do procedimento cirúrgico, foi administrado de forma subcutânea Meloxicam 0,5mg/kg como medicação analgésica.

Nos primeiros três dias de pós-operatório, foram administrados de forma subcutânea Meloxicam 0,5mg/kg e de forma oral Tramadol 50mg/kg. Após esse período, o animal era mantido com as mesmas medicações analgésicas, no caso de dor ou desconforto.

#### **4.4.2 Coleta do tendão do músculo gastrocnêmio**

Após o protocolo de morte indolor induzida apresentado anteriormente, os animais foram submetidos a tricotomia, assepsia, antissepsia das patas traseiras e posicionamento em mesa cirúrgica específica. Foi realizada uma incisão pósteromedial da pata traseira do animal com cuidadosa dissecação por planos até exposição, separação e coleta do tendão do músculo gastrocnêmio. Esse material foi transportado, em solução tampão PBS (solução salina tamponada de fosfato) com 1% de antibiótico (solução de penicilina-estreptomicina, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA), do local de coleta até o laboratório para seguir com o protocolo de descelularização e avaliação biomecânica do controle, ou em solução de formol 10% para seguir com avaliação histológica do controle.

O procedimento de coleta do tendão do músculo gastrocnêmio foi realizado por um cirurgião ortopédico com experiência em trabalhos experimentais, na sala de procedimentos do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia da Universidade Federal de São Paulo (CEDEME-UNIFESP).

#### **4.4.3 Procedimento de descelularização**

O protocolo de descelularização proposto foi realizado em parceria com o Centro de Pesquisas em Urologia, pertencente à disciplina de Urologia da Escola Paulista de Medicina.

Inicialmente, os tendões do músculo gastrocnêmio foram lavados de forma exaustiva com solução de PBS contendo 1% de antibiótico (solução de penicilina-estreptomicina, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) até

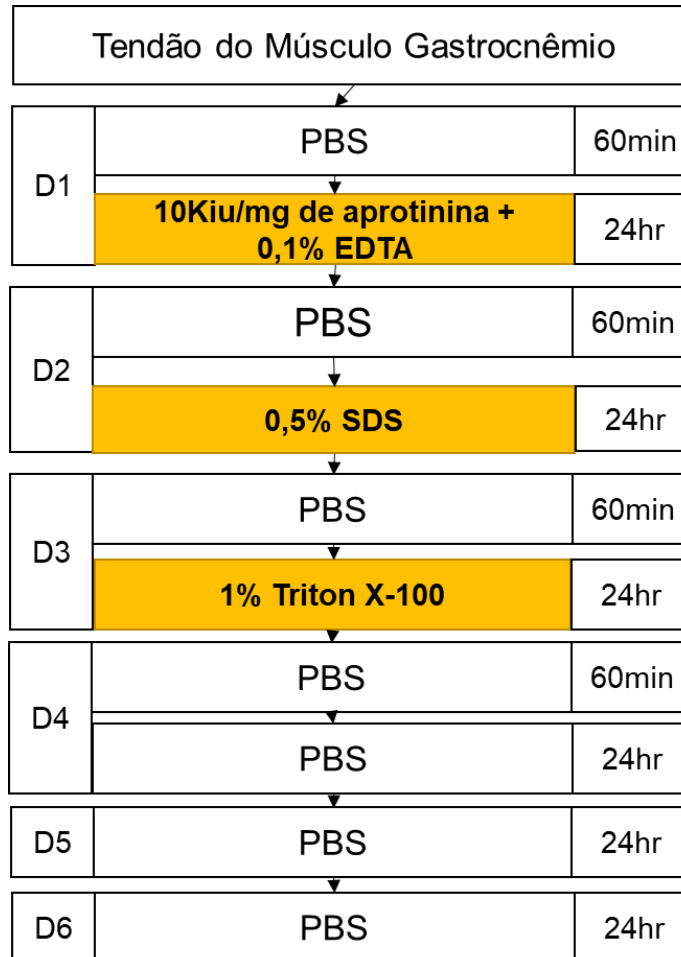
remoção completa de resíduos superficiais, principalmente sangue e fáscia presentes no tecido. Após esse procedimento, o protocolo proposto foi iniciado.

O processo de descelularização utilizado foi adaptado de outros protocolos já publicados na literatura, utilizando basicamente uma combinação de detergentes (CRAPO, GILBERT, & BADYLAK, 2012; XING *et al.*, 2014). O protocolo utilizado apresentou duração de 6 (seis) dias com trocas diárias dos agentes de descelularização. Durante todo o período, o material foi mantido em constante agitação, 60 rotações por minuto (MaxQ4000, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) e temperatura ambiente. Procurando tornar a apresentação mais clara, iremos apresentar de forma sequencial as etapas para realização do processo de descelularização (Figura 4):

- 1- Logo após os procedimentos iniciais, o material foi mantido em PBS contendo 1% de antibiótico (solução de penicilina-estreptomicina, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) e constante agitação por 60 minutos.
- 2- Em seguida foi incubado e mantido em constante agitação por 24 horas, em solução contendo 10Kiu/mg de aprotinina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) e 0,1% w/v EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).
- 3- No segundo dia do protocolo, o material foi lavado com PBS contendo 1% de antibiótico (solução de penicilina-estreptomicina, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) e mantido em constante agitação por 60 minutos.
- 4- Em seguida foi incubado e mantido por 24 horas em constante agitação, em água deionizada contendo 0,5% SDS (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) por 24 horas.
- 5- No terceiro dia, o procedimento de lavagem com PBS contendo 1% de antibiótico (solução de penicilina-estreptomicina, Sigma-Aldrich, St

Louis, MO, EUA) foi repetido em material mantido em constante agitação por 60 minutos.

6-



**Figura 4.** Protocolo de descelularização – apresentação esquemática

Apresentação esquemática diária do protocolo de descelularização com os respectivos reagente utilizados. PBS: Solução salina tamponada de fosfato; EDTA: Ácido etilenodiamino etraacético; SDS: Dodecilsulfato de sódio; Triton X-100: t-octil-fenoxipolietoxietanol; min: minutos; hr: horas D1: Dia 1; D2: Dia 2; D3: Dia 3; D4: Dia 4; D5: Dia 5; D6: Dia 6;

7- Em seguida, o material foi incubado em solução de água deionizada contendo 1% Triton X-100 (t-octil-fenoxipolietoxietanol, Affymetrix, Maumme, Ohio, EUA) e mantido em constante agitação por 24 horas.

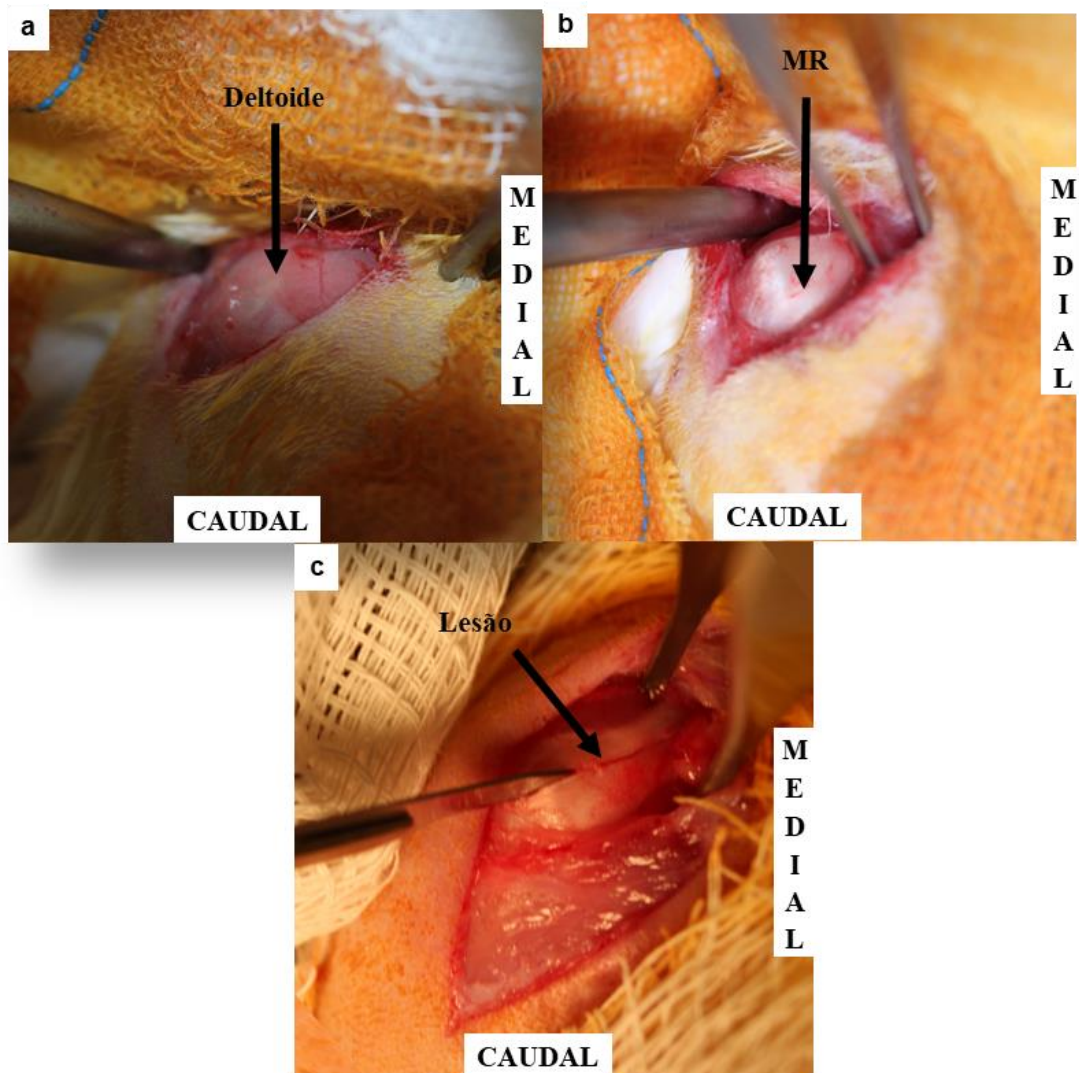
- 8- No quarto dia, o material foi lavado e mantido em constante agitação, com solução de PBS contendo 1% de antibiótico (solução de penicilina-estreptomicina, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) por 24 horas.
- 9- No quinto dia, o material foi lavado e mantido em constante agitação, com solução de PBS (solução salina tamponada de fosfato) contendo 1% de antibiótico (solução de penicilina-estreptomicina, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) por 24 horas.
- 10- No sexto dia, o material foi lavado e mantido em constante agitação, com solução de PBS contendo 1% de antibiótico (solução de penicilina-estreptomicina, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) por 24 horas.
- 11- Após o período de seis dias, conforme o protocolo apresentado anteriormente, o material foi submetido à última troca de PBS contendo 1% de antibiótico (solução de penicilina-estreptomicina, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) e transferido para um ambiente resfriado a 4°C até alocação nas etapas seguintes do estudo (avaliação biomecânica, histológica ou *in vivo*).

#### **4.4.4 Modelo Experimental *in vivo***

Após a realização do procedimento de anestesia, conforme descrição prévia, os animais foram posicionados em decúbito dorsal e submetidos a tricotomia, assepsia e antisepsia da articulação gleno-umeral bilateral. Dessa forma, ambos os membros do animal foram submetidos ao protocolo de lesão e, em seguida, alocados nos grupos “Lesão - controle” ou “Lesão + Scaffold - intervenção”, conforme randomização prévia. Para alocação correta dos membros, foi realizada randomização simples de forma que um dos membros sempre fosse utilizado como o controle do contralateral.

#### 4.4.4.1 Protocolo de lesão do modelo experimental *in vivo*

Para o protocolo de lesão, foi realizada uma via centrada na região anterolateral do ombro com dissecção por planos e exposição do intervalo entre as porções anterior e média do deltoide (Figura 5a). Após abertura do intervalo e exposição de toda a extensão do tendão subescapular (Figura 5b), foi realizada uma lesão paralela às fibras tendinosas em toda a sua extensão (Figura 5c), sem desinserção na junção ósteo-tendínea (GRUMET *et al.*, 2009).

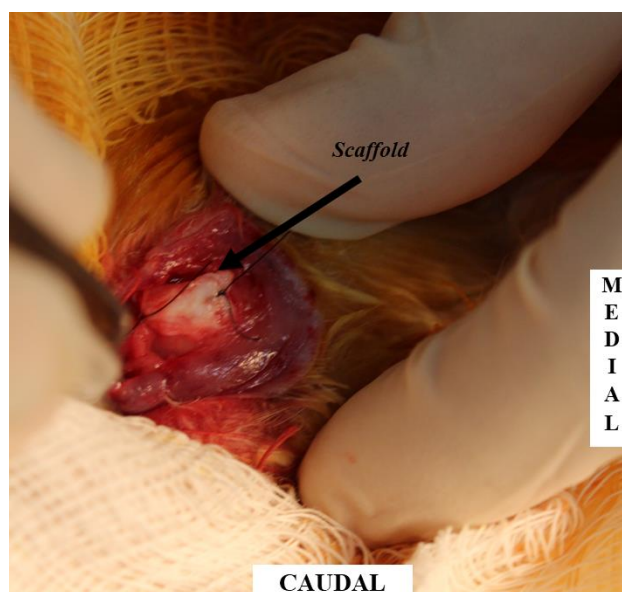


**Figura 5.** Protocolo de lesão do modelo experimental *in vivo*

(a) Via anterolateral e visualização do deltoide; (b) Visualização do tendão do manguito rotador (subescapular); (c) Lesão do manguito rotador com utilização de lâmina fria sem desinserção

Para realização da lesão, toda a extensão do tendão do músculo subescapular era visualizada até a transição miotendínea e, dessa forma, com utilização de lâmina fria, era realizada a lesão paralela às fibras tendinosas. No modelo experimental utilizado, limitamos as exigências biomecânicas às quais o *scaffold* seria submetido, garantindo, dessa forma, que não ocorreria falhas na fixação do *scaffold* ao manguito rotador. Todavia os resultados obtidos se limitariam à reposta inflamatória e à integração tecidual *scaffold*/manguito rotador

Após a lesão, foi inserido o *scaffold* oriundo de tendão descelularizado sobre a lesão (Figura 6), com marcação e fixação das extremidades do *scaffold* com ponto nylon 4-0 (Nylon 4-0; Shalon, Alto da Boa Vista, GO, Brasil) em uma das patas do animal, sendo o contralateral submetido apenas à marcação da topografia da lesão com nylon 4-0 (Nylon 4-0; Shalon, Alto da Boa Vista, GO, Brasil) (Figura 7).

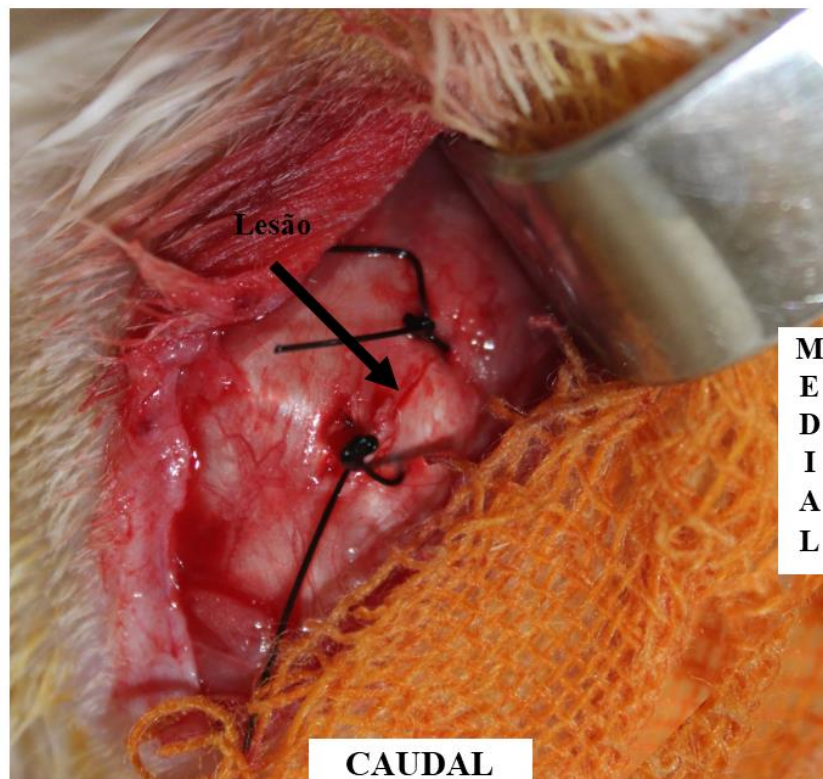


**Figura 6.** Modelo Experimental *in vivo* - Intervenção (Lesão + *Scaffold*)

Representação do *scaffold* adicionado sobre a lesão do manguito rotador exercendo a função de *interposition*

Em ambas as patas, foi realizado o fechamento do intervalo entre as porções do deltoide com fio absorvível 4-0 (Ácido poliglicólico 4-0; Brasuture, São Sebastião da Grama, SP, Brasil) e sutura cutânea com Nylon 2-0 (Nylon 2-0; Shalon, Alto da Boa Vista, GO, Brasil).

O protocolo de lesão do modelo experimental *in vivo* foi realizado por um cirurgião ortopédico com experiência em trabalhos experimentais, na sala de procedimentos do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia da Universidade Federal de São Paulo (CEDEME-UNIFESP).



**Figura 7.** Modelo Experimental *in vivo* – Controle (Lesão)

Representação da lesão criada no manguito rotador sem desinserção e da marcação local com utilização de nylon 4-0



#### 4.4.4.2 Coleta do material do modelo experimental *in vivo*

Após o período de duas ou oito semanas de pós-operatório, os oito animais utilizados no modelo experimental *in vivo* foram submetidos a morte indolor induzida, conforme descrição prévia. Nesse momento, é importante lembrar que quatro animais foram submetidos a morte indolor induzida com duas semanas de pós-operatório e outros quatro animais com oito semanas de pós-operatório, conforme randomização simples realizada previamente.

Após a morte indolor induzida, os animais foram submetidos à coleta do material, na qual foi realizada uma via anterolateral, dissecação entre as porções do deltoide e exposição do tendão subescapular. A identificação do tendão subescapular foi confirmada através da marcação com nylon 4-0 (Nylon 4-0; Shalon, Alto da Boa Vista, GO, Brasil) realizada no momento do implante (figura 6). Após a identificação, foi realizada a ressecção de todo o tendão subescapular com o *scaffold* implantado em uma das patas (Lesão + *Scaffold* - intervenção) e apenas o tendão do subescapular (Lesão - controle) no contralateral. Após a coleta, o material foi colocado em recipiente com solução de formol 10% para seguir com a avaliação histológica.

A coleta do material proveniente do modelo experimental *in vivo* foi realizada na sala de procedimentos do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia da Universidade Federal de São Paulo (CEDEME-UNIFESP).

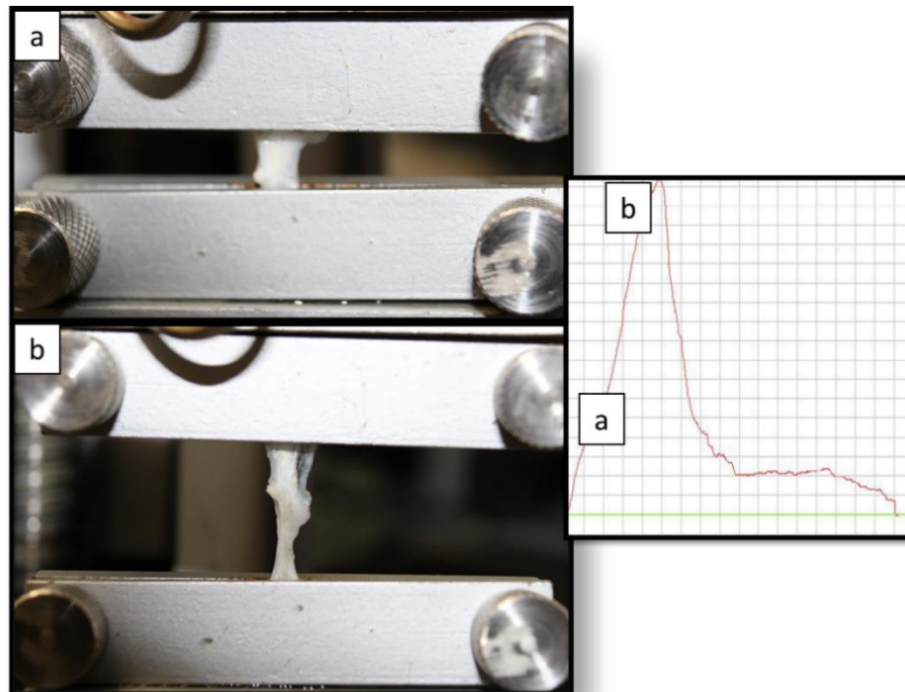
#### 4.4.5 Análise biomecânica do *scaffold* e do controle

Os espécimes avaliados, *scaffold* (n:13) e controle (n:7), foram inicialmente submetidos à mensuração da área de secção, na região média, com paquímetro manual de precisão decimal, e, em seguida, submetidos ao teste de tração na máquina de ensaio (equipamento AME – 2KN, Oswaldo Filizola, São Paulo, SP, Brasil). Para leitura e apresentação dos dados, utilizamos o *Software DynaView Standard M* (Software DynaView Standard M versão 2.7.5; Técnica Industrial Oswaldo Filizola, São Paulo, SP, Brasil). Utilizamos como referência para realização dessa avaliação protocolos de análise biomecânica validados para tendões (CHONG *et al.*, 2007; WHITLOCK *et al.*, 2007; DE LIMA SANTOS *et al.*, 2019).

Para fixação do corpo de prova às garras, sem o risco de solturas ou rompimentos na interface garra-tendão, optamos pela utilização de uma garra customizada com aperto manual. Mesmo com os estudos prévios realizados no mesmo equipamento, a calibração foi previamente verificada pela empresa responsável e as garras testadas com outras estruturas tendinosas, não utilizadas nesse estudo.

Para realização do teste de tração, o material foi fixado à máquina de ensaio a uma distância previamente definida de 5mm – confirmada com paquímetro de precisão decimal – e tracionado longitudinalmente no sentido das fibras tendinosa, a uma velocidade de 10mm/min até a completa ruptura (Figura 8). Caso ocorresse rompimento na interface garra-tendão ou escorregamento do material, o resultado seria descartado. Nas avaliações realizadas, não ocorreu escorregamento, não sendo necessário descartar nenhum dos espécimes analisados. Para significância estatística, foi determinado que seriam necessários no mínimo cinco espécimes em cada grupo, conforme será explicado no tópico análise estatística. Levando em

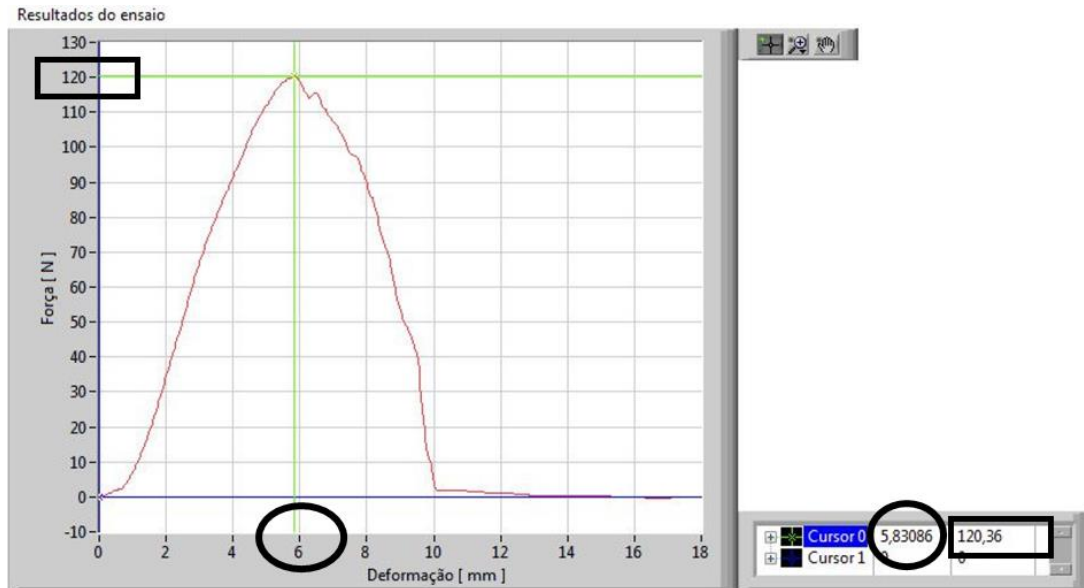
consideração essa informação, optamos por avaliar de forma biomecânica sete controles (n:7) e treze *scaffolds* (n:13).



**Figura 8.** Teste de tração

(a) Momento inicial da tração, logo após ajuste do corpo de prova na garra e representação da localização aproximada nesse momento do teste biomecânico; (b) Momento aproximado da força máxima do corpo de prova e sua representação gráfica.

Ao final de cada teste, era fornecido pelo *software* um gráfico de força x deformação (Figura 9), o qual foi utilizado para coleta, tabulação e cálculos dos dados necessários para o estudo. Quanto à leitura dos dados, vale ressaltar que a força necessária para romper o corpo de prova (marcada com um retângulo na figura 9) e o comprimento final (marcada com círculo na Figura 9) foram documentados como sendo as variáveis relativas ao ponto mais alto da curva (Figura 9).



**Figura 9.** Gráfico Força x Deformação

Gráfico de força x deformação disponibilizado pelo *software Dynaview Standart M*. Retângulo representa a identificação da força máxima e círculo representa a identificação da deformação.

$$\begin{aligned} \text{Área de Secção} &= \text{Largura} \times \text{Espessura} \\ \text{Tensão máxima} &= \frac{\text{Força máxima}}{\text{Área de secção}} \\ \text{Deformação relativa} &= \frac{\text{Deformação final}}{\text{Deformação Inicial}} \\ \text{Módulo de Elasticidade} &= \frac{\text{Tensão máxima}}{\text{Deformação relativa}} \\ \text{Rigidez} &= \frac{\text{Força máxima}}{\text{Deformação final}} \end{aligned}$$

**Figura 10.** Fórmulas matemáticas utilizadas nos cálculos da avaliação biomecânica

Para cálculo da área de secção, foi presumido que o corpo de prova possuía um formato retangular e, dessa maneira, poderia ser possível utilizar a fórmula para cálculo de área retângulo (Figura 10). Para o cálculo das outras variáveis utilizadas na avaliação biomecânica – módulo de elasticidade (*Young Modulus*), tensão máxima (*Stress*), força máxima, deformação relativa (*Strain*) e rigidez (*stiffness*) – utilizamos as fórmulas matemáticas apresentadas (Figura 10), utilizando como referência a literatura disponível (GIANNINI *et al.*, 2008; HUANG *et al.*, 2011). A análise biomecânica descrita foi realizada em parceria com o Centro de Pesquisas em Urologia, pertencente à Disciplina de Urologia da Escola Paulista de Medicina.

#### **4.4.6 Análise microscópica**

##### **4.4.6.1 Preparação do material para análise microscópica**

A porção central do *scaffold* (n:4), controle (n:4) e o material resultante da análise *in vivo* (controle *in vivo* – Lesão (n:8) e intervenção *in vivo* - Lesão + *Scaffold* (n:8)) foram fixadas em formaldeído a 10% por 24 horas e depois desidratadas em concentrações crescentes de álcool etílico, diafanizadas pelo xilol e impregnadas pela parafina líquida em estufa, regulada a temperatura de 60°C. A inclusão foi realizada de tal maneira que fossem realizados cortes transversais com a possibilidade de visualizar todas as camadas do material avaliado. Em seguida, os blocos foram cortados em micrótomo do tipo rotatório, ajustados para 4µm com distância entre os cortes de 50µm. Os cortes assim obtidos foram colocados em lâminas previamente untadas com albumina de Mayer e mantidos em estufa regulada à temperatura de 37°C, durante 24 horas, para secagem e colagem. Previamente a qualquer um dos protocolos de coloração, os cortes foram

submetidos a desparafinização com xilol e hidratados com concentrações decrescentes de álcool etílico associado a imersão final em água destilada. Para cada método de coloração adotado (Hematoxilina e Eosina-H&E, DAPI-4,6-diamidino-2-fenilindol, Tricômio de Masson e Picrossirius), utilizamos um protocolo específico conforme será apresentado a seguir. Os cortes resultantes do modelo experimental *in vivo* (controle *in vivo* – Lesão (n:8) e intervenção *in vivo* - Lesão + *Scaffold* (n:8)) foram apenas corados com H&E, enquanto o *scaffold* (n:4) e o controle (n:4) foram corados com todas as colorações (H&E, DAPI, Tricômio de Masson e picrossirius).

Para coloração com a técnica de H&E, os cortes foram imersos em solução de hematoxilina, lavados com água corrente e submetidos a desidratação com gradientes crescentes de álcool até que fossem coradas com a eosina. As etapas finais da coloração com H&E corresponderam a desidratação com álcool, diafanização com xilol e montagem com lamínula associada ao respectivo selador.

Para avaliação com o Tricômio de Masson, os cortes foram corados de forma sequencial com hematoxilina, solução de Biebrich-Scarlet, solução de ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico, azul de anilina e solução aquosa de ácido acético. Os cortes foram então lavados com água corrente, desidratados com álcool, diafanizados com xilol e montados com lamínula associada ao respectivo selador.

Para avaliação através da fluorescência, da estrutura de DNA, os cortes foram marcados com a utilização do DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Após coloração o material foi submetido a montagem com lamínula associada ao respectivo selador.

Para os cortes submetidos à técnica de Picrossirius, o material foi evidenciado com utilização de hematoxilina e, em seguida, lavado de forma

exaustiva. As lâminas foram então coradas com solução de *sirius red* dissolvido em ácido pícrico aquoso. Os cortes foram, então, lavados com água corrente, desidratados com álcool, diafanizados com xilol e montados com lamínula associada ao respectivo selador.

As lâminas histológicas foram analisadas através de microscópicos de acordo com as colorações utilizadas. Para as lâminas coradas em H&E, Tricômio de Masson e DAPI, foi utilizado o microscópio óptico Olympus IX 81/BX51 (Olympus Corporation, Shinjuku-ku, Tóquio, Japão) com fluorescência e imagens captadas por uma câmera Olympus DP72/DP71 (Olympus Corporation, Shinjuku-ku, Tóquio, Japão) acoplada ao microscópio. Para lâminas coradas com picrosirius, foi utilizado o microscópio Zeiss AX10 (Zeiss, Jena, Turíngia, Alemanha) com câmera Zeiss AxioCam ICc5 (Zeiss, Jena, Turíngia, Alemanha) acoplado ao microscópio.

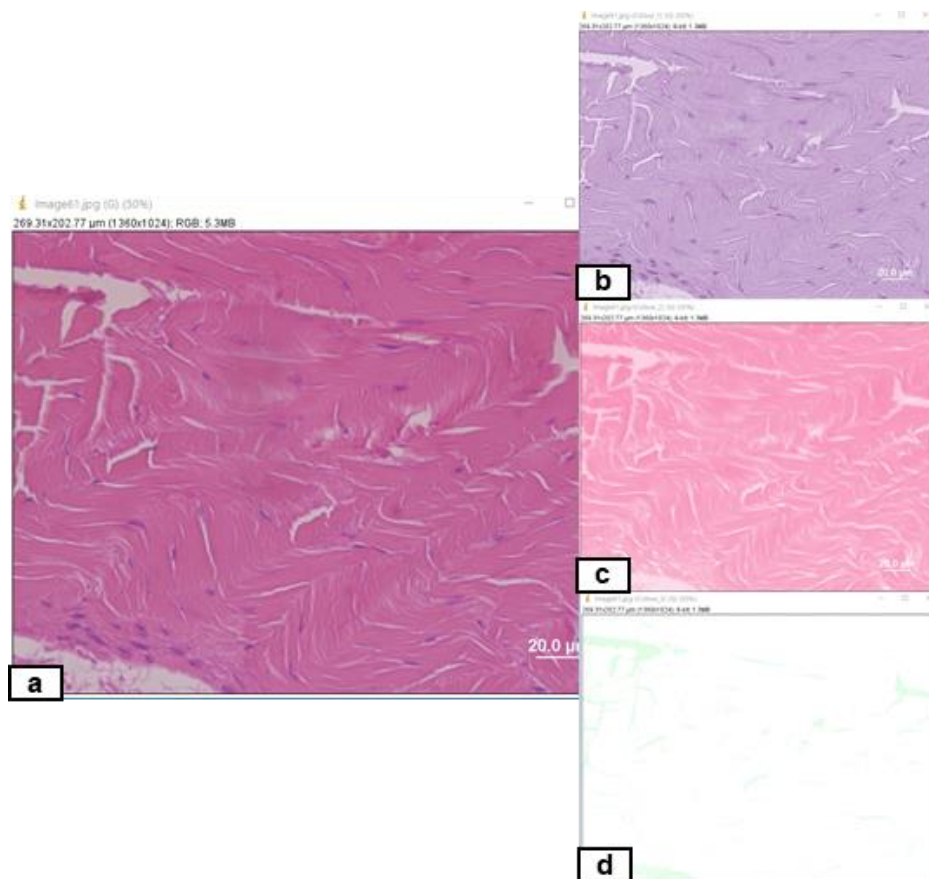
A preparação das lâminas histológicas foi realizada na Disciplina de Histologia e Biologia Estrutural da Escola Paulista de Medicina. Já a análise do mesmo material foi realizada pelo pesquisador principal desse trabalho, em parceria com a mesma disciplina e com o Centro de Pesquisas em Urologia, pertencente à Disciplina de Urologia da Escola Paulista de Medicina.

#### **4.4.6.2 Análise microscópica do *scaffold* e do controle**

A avaliação histológica foi realizada de forma descritiva e semiquantitativa e baseada na presença e organização das estruturas nucleares com lâminas coradas em H&E e DAPI, bem como na manutenção

da arquitetura original do *scaffold*, utilizando, para tal, as lâminas coradas em picrossirius, tricômio de Masson, e H&E. Utilizamos nessa avaliação lâminas de quatro controles e de quatro *scaffolds*, conforme consta no delineamento experimental.

As modificações da arquitetura geral do *scaffold* foram avaliadas através da análise descritiva na morfologia geral e também na manutenção do espaço inter e intrafascicular (WHITLOCK *et al.*, 2007).



**Figura 11.** Representação fotográfica do corte histológica após decomposição da imagem no *Software Image J*

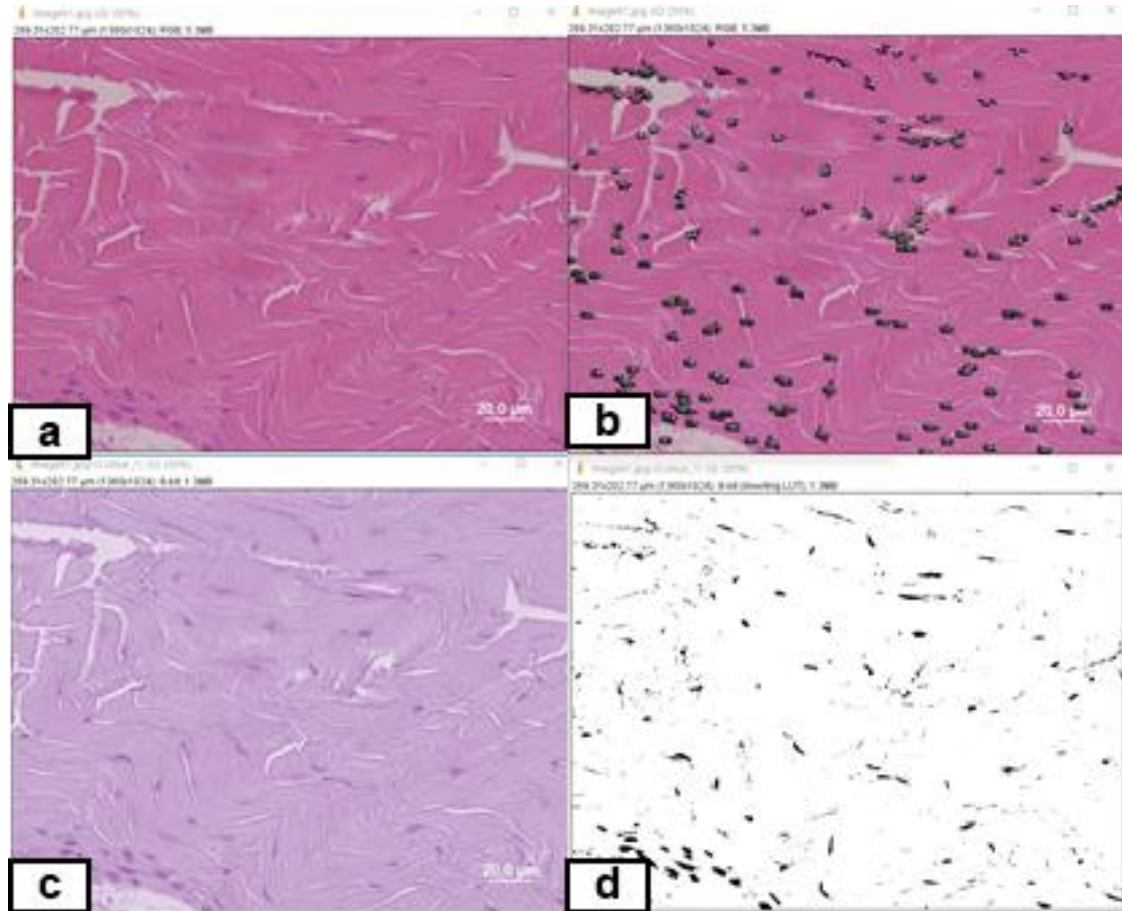
(a) Fotografia original do corte histológico corado em H&E. (b) Fotografia oriunda da decomposição com realce da coloração arroxeadada (realce da eosina). (C) Fotografia oriunda da decomposição com realce da coloração rósea (realce da hematoxilina). (d) Fotografia oriunda da decomposição para avaliação final.



A análise do material nuclear foi realizada de maneira descritiva, avaliando a presença e características do DNA remanescente na lâmina corada com DAPI (WHITLOCK *et al.*, 2007) e através de metodologia semiquantitativa (CARALT *et al.*, 2015; ROTH *et al.*, 2017). Nessa metodologia, a remoção de material nuclear foi classificada em: completa (100%), substancial (99-70%), moderada (69-50%), mínima (49-30%) e sem alteração (<30%).

Para análise semiquantitativa do material nuclear, foram fotografados dez campos no sentido horário de superior para inferior com um aumento de 400X de cada corte, totalizando, assim, quarenta fotografias do grupo controle e outras quarenta do grupo *scaffold*, todas coradas em H&E. As fotografias foram manualmente inseridas no *software* Image J (Image J 1.53e, National Institutes of Health, Bethesda MA, EUA), sendo realizado o ajuste da escala conforme a imagem disponível. Para início do trabalho, era realizada, nas fotografias, decomposição das cores através do *plugin* “*colour deconvolution – H&E2*” (Figura 11) e selecionada apenas a imagem com realce da coloração de eosina, o que deixa em evidência o material nuclear (Figura 11b). As figuras foram, então, ajustadas manualmente no tópico *image - adjust – threshold* e, em seguida, convertidas para o formato binário (*process – binary – convert to mask - make binary*) (Figura 12d). Como etapa final, era realizada a contagem automatizada através da função *analyze – analyze particles (size 1-100 $\mu$ m<sup>2</sup>; circularity 0.00-1.00; outlines; exclude on edges; include holes)* (Figura 12b).

O *software* Image J (Image J 1.53e, National Institutes of Health, Bethesda MA, EUA) fornecia ao final do processo os seguintes resultados: contagem total de núcleos, área total dos núcleos, área média dos núcleos e porcentagem de área de cada fotografia ocupada pelos núcleos.



**Figura 12.** Representação fotográfica do método de quantificação das estruturas nucleares

(a) Fotografia original do corte corado em H&E. (b) Fotografia original corada em H&E com representação das estruturas nucleares contabilizadas. (c) Fotografia oriunda da decomposição com realce da coloração arroxeada (realce da eosina). (d) Fotografia demonstrando o método de conversão para formato binário.

#### 4.4.6.3 Análise microscópica do modelo experimental *in vivo*

O material resultante do modelo experimental *in vivo* foi preparado para a análise histológica conforme descrição apresentada no tópico 4.4.6.1 e foi submetido a análise das suas lâminas coradas em H&E, através de metodologia descritiva e semiquantitativa. Na análise microscópica do modelo experimental *in vivo*, foram preparados oito blocos referentes ao

controle *in vivo* – Lesão (n:8) e outros oito referentes ao grupo intervenção *in vivo* - Lesão + *Scaffold* (n:8). Nesse momento, é importante deixar claro que, de todos os blocos avaliados, metade fazia referência aos animais submetidos a morte indolor com duas semanas e outra metade, com oito semanas.

A avaliação histológica foi realizada com o objetivo de avaliar a integração tecidual, utilizando como referência a análise semiquantitativa da invasão celular no *scaffold* (CARALT *et al.*, 2015; ROTH *et al.*, 2017) e a resposta inflamatória, realizando comparação entre o tipo celular presente nas bordas do *scaffold* nos diferentes momentos de pós-operatório (duas e oito semanas) e nos diferentes grupos (controle *in vivo* – Lesão e intervenção *in vivo* - Lesão + *Scaffold*) (WHITLOCK *et al.*, 2007).

Como método de avaliação da invasão celular no *scaffold*, realizávamos inicialmente a identificação dos seus limites e, em seguida, aplicávamos a mesma metodologia apresentada anteriormente na região selecionada. De forma resumida, foram fotografados dez campos aleatórios e as imagens eram inseridas no *software* Image J (Image J 1.53e, National Institutes of Health, Bethesda MA, EUA) e submetidas a decomposição das cores através do plugin “colour deconvolution – H&E2”, tendo sido selecionada apenas a imagem com realce da coloração de eosina, o que deixa em evidência o material nuclear. As figuras foram, então, ajustadas para versão binária e a contagem foi automatizada através de função desse mesmo *software*. Ao final da análise, era disponibilizada, pelo *software*, a contagem total de núcleos, área total dos núcleos, área média dos núcleos e porcentagem de área de cada fotografia ocupada pelos núcleos.

#### **4.4.7 Análise macroscópica**

#### **4.4.7.1 Análise macroscópica do controle e do *scaffold***

A avaliação macroscópica do tendão e do *scaffold* foi realizada durante a coleta e ao longo do protocolo de descelularização, através de visualização direta e, de forma adicional, através de fotografias realizadas com aparelho fotográfico específico Canon (Canon EOS Rebel T5; Canon, Manaus, AM, Brasil). Levando em consideração que a análise macroscópica não causava dano ao material, essa avaliação foi realizada em todos os espécimes. Para análise macroscópica, a avaliação era inicialmente realizada por dois pesquisadores participantes do estudo e qualquer discordância era resolvida por um terceiro avaliador.

Na análise macroscópica, procuramos avaliar alterações na morfologia grosseira, alterações perceptíveis nas dimensões do material e presença de vascularização remanescente (caracterizados pela coloração rósea) (WHITLOCK *et al.*, 2007; AEBERHARD *et al.*, 2020).

#### **4.4.7.2 Análise macroscópica do modelo experimental *in vivo***

A avaliação macroscópica do modelo experimental *in vivo* foi realizada durante a coleta através de visualização direta e de forma adicional através de fotografias realizadas com aparelho fotográfico específico Canon (Canon EOS Rebel T5; Canon, Manaus, AM, Brasil). Levando em consideração que a análise macroscópica não causava dano ao material, essa avaliação foi realizada em todos os espécimes.

Na análise macroscópica avaliamos a presença de sinais infecciosos, cicatrização da lesão tendinosa e a integração tecidual (WHITLOCK *et al.*,

2007). A presença de sinais infecciosos foi avaliada através de alteração nos hábitos alimentares do animal ou presença de sinais infecciosos na ferida operatória. A cicatrização da lesão tendinosa realizada no modelo experimental foi caracterizada por visualização direta da lesão, enquanto a integração tecidual foi avaliada com relação à presença de tecido conectivo na topografia do *scaffold*.

#### 4.5 Análise estatística

O cálculo amostral para estudo foi realizado levando em consideração a análise biomecânica como desfecho primário. Nesse sentido, levamos em consideração trabalho anterior que avaliou diversos protocolos de descelularização tendinosa (XING *et al.*, 2014) e utilizamos a média da força máxima apresentada por um protocolo similar ( $198,24 \pm 21,05$ ) e média de força máxima do controle ( $253,78 \pm 12,36$ ). Para realização do cálculo, utilizamos um nível de significância de 0,05 e um poder estatístico de 95%, através do *software* SAS® Studio (SAS 3.8 Basic Edition, SAS Institute., Cary, NC, USA). Através do método proposto, foi encontrado que o número de amostras em cada grupo deveria ser de, no mínimo, cinco unidades. Realizamos, ainda, revisão na literatura e observamos um cálculo amostral semelhante ao encontrado no nosso método (CHONG *et al.*, 2007; XING *et al.*, 2014).

Para avaliação de diferença estatística na análise biomecânica e na análise histológica, foi utilizado o teste não paramétrico de Wilcoxon-Mann-Whitney utilizando o *software* SAS® Studio (SAS 3.8 Basic Edition; SAS Institute, Cary, NC, USA) sendo o valor de  $p < 0,05$  presumido como

diferença com significância estatística. Como mecanismo para avaliar os resultados obtidos, optamos, ainda, por avaliar de forma *post hoc* (*satterthwaite t test*) o poder estatístico dos resultados encontrados, utilizando para o *software* SAS® Studio (SAS 3.8 Basic Edition; SAS Institute, Cary, NC, USA).

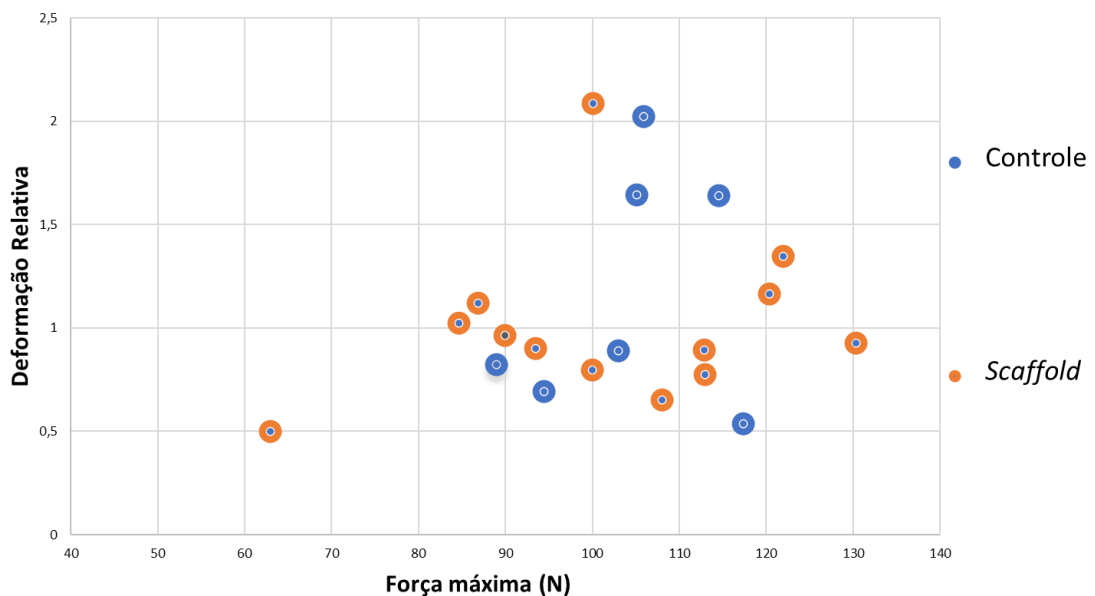
A apresentação descritiva dos dados utilizou os seguintes conceitos: média, desvio padrão, gráfico *dot-plot*, de colunas e caixa estreita. Para a realização dessa análise e preparação dos gráficos/tabelas, foi utilizado o Excel® (Microsoft® Excel® para Office 365 MSO; Santa Rosa, California, USA).

## **5. RESULTADOS**

### 5.1 Resultado da análise biomecânica do tendão e do *scaffold*

O teste de tração foi realizado em sete tendões do músculo gastrocnêmio (controle) e treze *scaffolds*. Durante o teste de tração nenhum dos corpos de prova apresentou soltura das garras ou rompimento na interface garra-corpo de prova. A íntegra dos resultados de todos os corpos de prova está organizada e apresentada no apêndice 5.

A análise da força máxima não mostrou diferença estatística entre os grupos, visto que o valor de  $p = 0,4073$  (Tabela 1). Para esse dado, medido em Newtons, o controle suportou força máxima de 104,18N e o *scaffold* 101,9N (Figura 13).



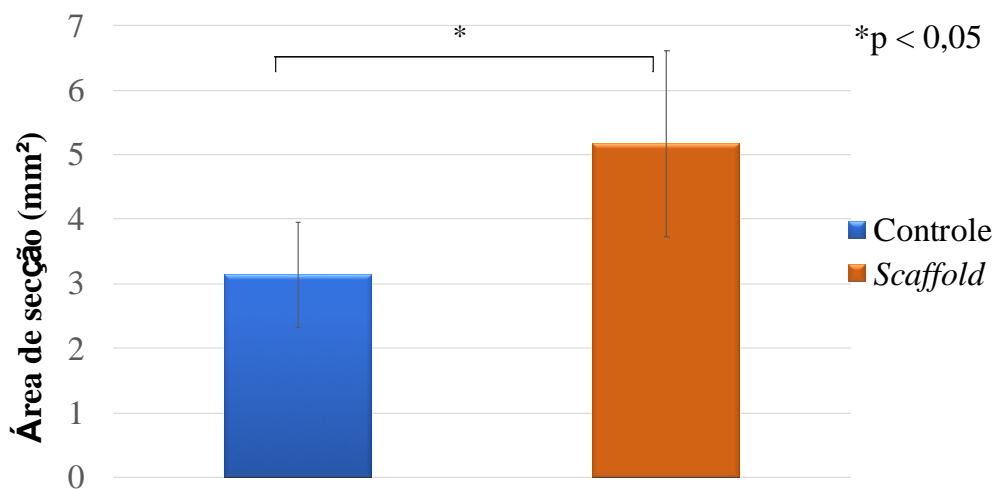
**Figura 13.** Deformação relativa x Força máxima do controle e *scaffold* – representação gráfica em formato *Dot Plot*

Cada ponto no gráfico representa os resultados individualizados dos corpos de prova avaliados



A análise da deformação relativa não mostrou diferença estatística entre os grupos,  $p = 0,4688$  (Tabela 1). Para esse dado, medido de forma relativa entre a deformação inicial de 5mm e a deformação na força máxima, o controle apresentou a capacidade de se deformar 1,18 vezes em comparação com o *scaffold*, que apresentou a capacidade de se deformar 1,01 vezes (Figura 13).

A análise da rigidez não mostrou diferença estatística entre os grupos, visto que o valor de  $p = 0,3482$  (Tabela 1). Para esse dado, medido em Newtons por milímetro, o controle apresentou a capacidade de resistir à deformação muito similar quando realizada comparação com o *scaffold* (controle 21,87 N/mm e *scaffold* 21,99 N/mm).



**Figura 14.** Área de secção do controle e *scaffold* – representação gráfica em formato de barras

Representação do controle e *scaffold* demonstrando diferença com significância estatística entre os grupos.  $*p < 0,05$

A análise da área de secção demonstrou diferença estatística entre os grupos, visto que o valor de  $p = 0,0030$  (Tabela 1). Para esse dado, medido em milímetros quadrados, o protocolo de descelularização representou um

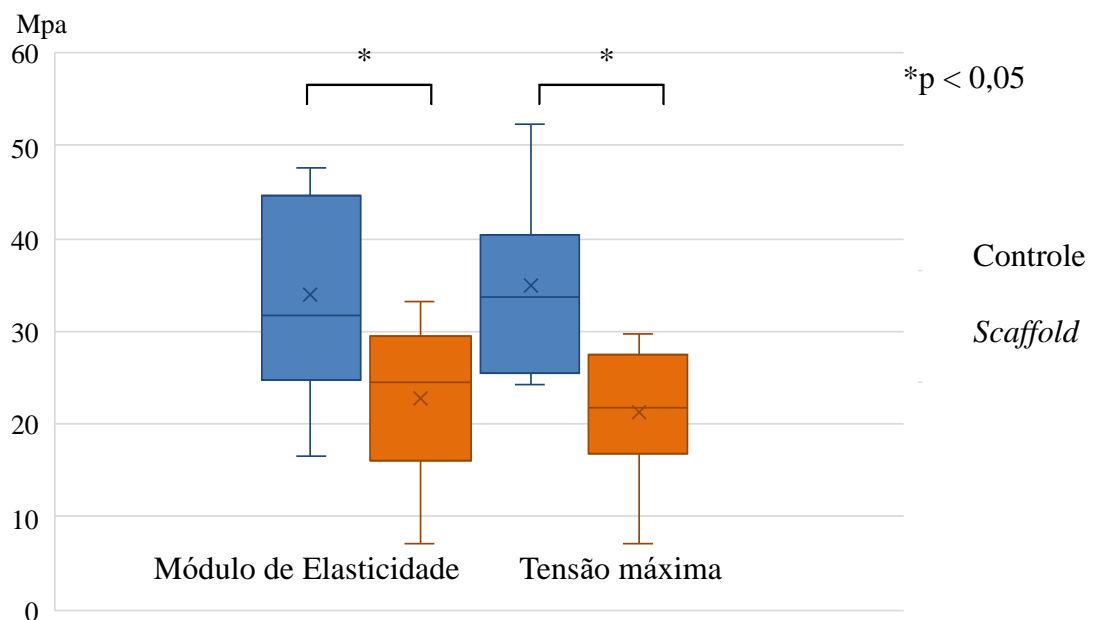
aumento de 164% na sua área de secção na região média (Figura 14), visto que a área de secção do controle era 3,14 mm<sup>2</sup> e, após o protocolo, foi medida em 5,16 mm<sup>2</sup> (*scaffold*).

**Tabela 1.** Avaliação Biomecânica do controle e *scaffold*

	<b>Controle</b>	<b><i>Scaffold</i></b>	
<b>Força máxima - N, (DP)</b>	104,18 (10,11)	101,9 (18,46)	
<b>Módulo de elasticidade - Mpa, (DP)</b>	33,98 (11,52)	22,65 (7,94)	
<b>Deformação relativa, (DP)</b>	1,18 (0,58)	1,01 (0,39)	
<b>Rigidez - N/mm, (DP)</b>	21,87 (11,45)	21,99 (6,34)	
<b>Área de secção - mm<sup>2</sup>, (DP)</b>	3,14 (0,81)	5,16 (1,44)	
<b>Tensão máxima - Mpa, (DP)</b>	35,04 (9,68)	21,28 (6,61)	
	<b>Proporção</b>	<b>valor p</b>	<b>poder</b>
	<b><i>scaffold</i> /</b>		
	<b>controle</b>		
<b>Força máxima - N, (DP)</b>	98%	0,4073	0,061
<b>Módulo de elasticidade - Mpa, (DP)</b>	67%	0,0362	0,596
<b>Deformação relativa, (DP)</b>	86%	0,4688	0,099
<b>Rigidez - N/mm, (DP)</b>	101%	0,3482	0,053
<b>Área de secção - mm<sup>2</sup>, (DP)</b>	164%	0,0030	0,965
<b>Tensão máxima - Mpa, (DP)</b>	61%	0,0051	0,844

N: Newton; Mpa: Mega Pascal; mm: Milímetros; DP: Desvio Padrão

A análise do módulo de elasticidade mostrou diferença estatística entre os grupos,  $p = 0,0362$  (Tabela 1). Para esse dado, medido em Mpa, o controle apresentou maior necessidade de tensão proporcionalmente pela deformação relativa para causar o rompimento completo do corpo de prova, quando comparado ao *scaffold*. Esse fato pode ser evidenciado quando se compara o valor de 33,98 Mpa para o controle e o valor de 22,65 Mpa para o *scaffold* (Figura 13).



**Figura 15.** Tensão e módulo de elasticidade do controle e *scaffold* – representação gráfica em caixas

Representação gráfica do controle e *scaffold* demonstrando diferença com significância estatística na avaliação do módulo de elasticidade e da tensão máxima.  $*p < 0,05$

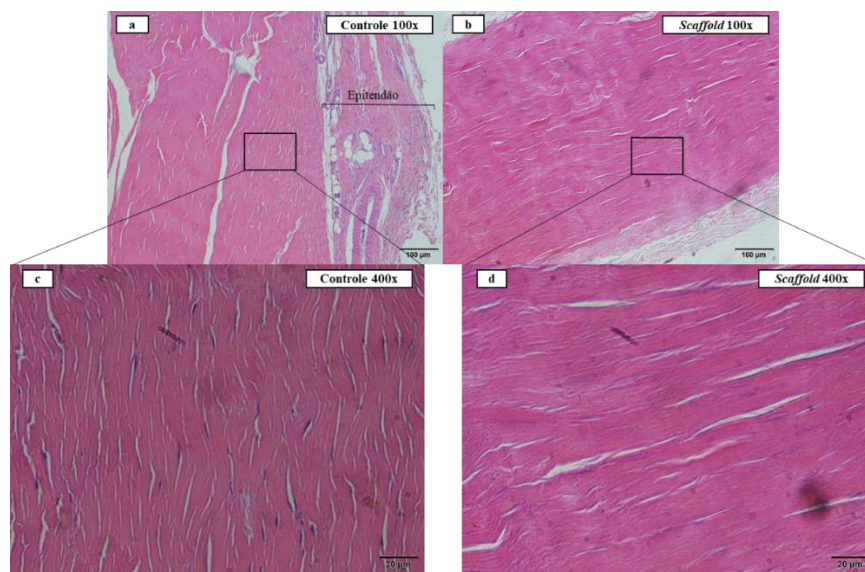
A análise da tensão máxima mostrou diferença estatística entre os grupos,  $p = 0,0051$  (tabela 1). Para esse dado, medido em Mpa, o controle apresentou maior força aplicada proporcionalmente pela área de secção para causar rompimento do corpo de prova, quando comparado ao *scaffold*. Esse

fato pode ser evidenciado quando se compara o valor de 35,04 Mpa para o controle e o valor de 21,28 Mpa para o *scaffold* (Figura 15).

## 5.2 Resultados da análise microscópica

### 5.2.1 Resultado da análise microscópica do tendão do músculo gastrocnêmio e do *scaffold*

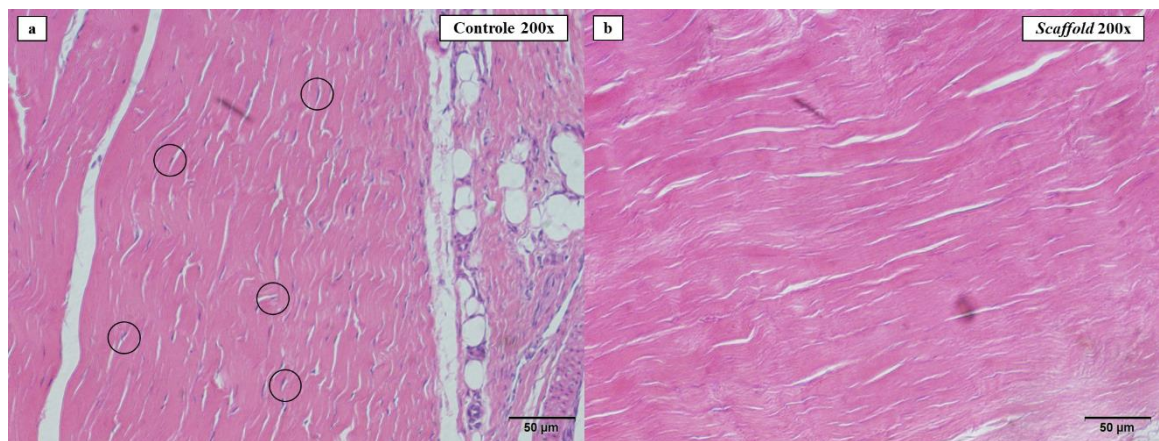
Na análise descritiva, utilizando-se dos cortes corados em H&E, o controle apresentou características típicas de tecido tendinoso. Os fascículos tendinosos apresentavam-se envoltos por endotendão e o epitendão apresentava a presença do típico tecido vascular. Ainda na análise desses cortes, os tendinócitos foram facilmente caracterizados com sua organização paralela, bem como o material nuclear encontrava-se na periferia dessas células. Já na análise do *scaffold*, em cortes com a mesma coloração, foi notado aumento da distância inter e intrafascicular (Figura 16).



**Figura 16.** Histologia em H&E - Controle x *Scaffold*

(a) Imagem em H&E com aumento de 100X demonstrando o controle com visualização clara dos fascículos tendinosos e epitendão; (b) Imagem em H&E com aumento de 100X demonstrando as pequenas alterações na arquitetura dos fascículos tendinosos do *scaffold*; (c) Imagem em H&E com aumento em 400X demonstrando a organização dos fascículos tendinosos com os núcleos localizados na periferia dos tendinócitos no controle; (d) Imagem em H&E com aumento em 400X demonstrando as pequenas alterações na arquitetura e a diminuição de material nuclear organizado no *scaffold*.

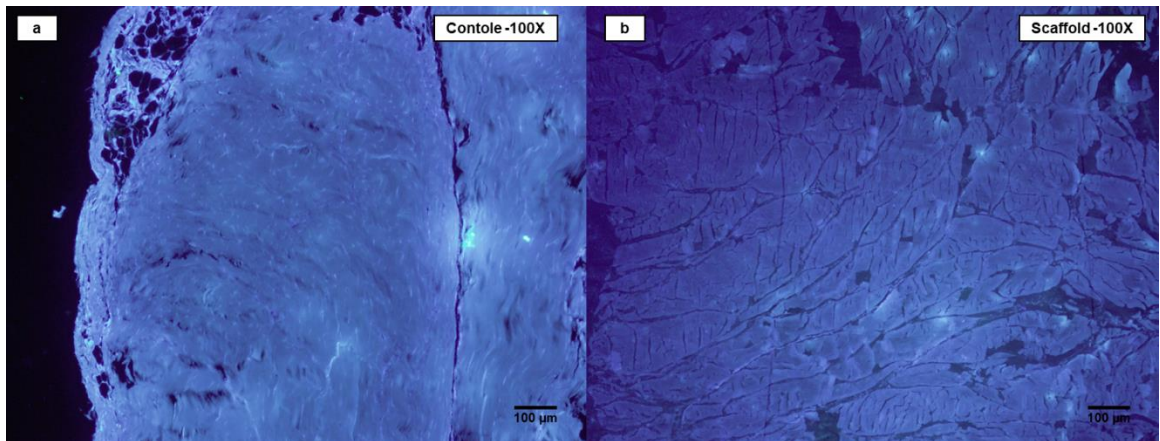
Ainda na análise do *scaffold*, foi encontrado material nuclear remanescente, entretanto esse material apresentava-se de forma desorganizada e com conformação diferente do encontrado no grupo controle. Dessa forma, notou-se a presença de núcleos organizados na periferia dos tendinócitos no controle, destacados por círculos (Figura 17A), e a diminuição desse padrão no *scaffold* (Figura 17B).



**Figura 17.** Histologia H&E – Controle x *Scaffold* (Núcleo)

(a) Imagem em H&E com aumento de 200X demonstrando os núcleos localizados na periferia dos tendinócitos, identificados com círculos, no controle; (b) Imagem em H&E demonstrando a organização do tecido tendinoso e a diminuição de núcleos com organização similar no *scaffold*.

As lâminas submetidas à técnica de imunofluorescência com DAPI foram utilizadas para análise do material nuclear (DNA) remanescente. No grupo controle, foi notada a presença de material nuclear organizado e facilmente caracterizado (pontos em azul brilhante na figura 18A). No *scaffold* (Figura 18B), foi notada a presença de material nuclear, entretanto sem a mesma organização, brilho e quantidade quando comparada ao controle (Figura 18).

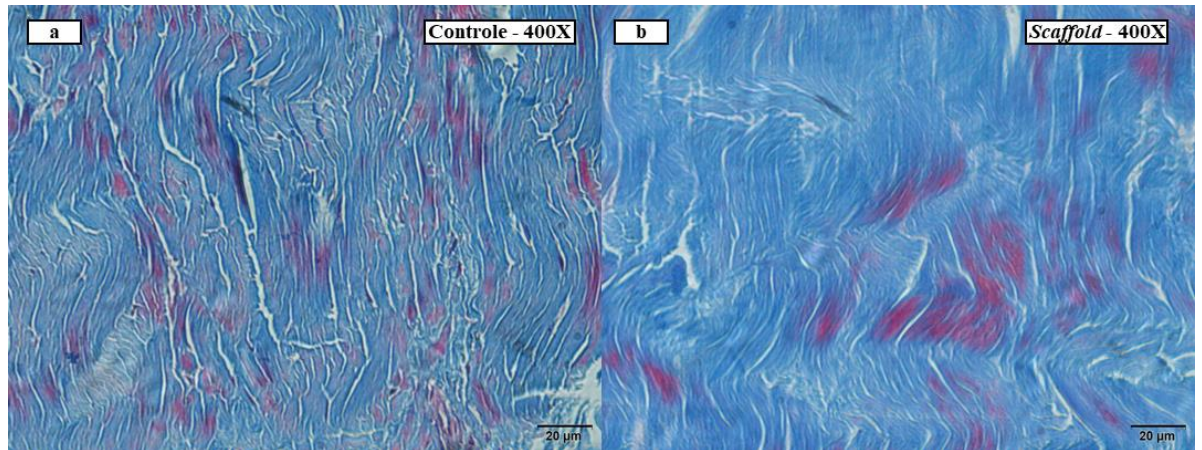


**Figura 18.** Histologia DAPI – Controle x *Scaffold*

(a) Imagem com marcação do material nuclear (através da Imunofluorescência com DAPI) demonstrando claramente o material nuclear no controle; (b) Imagem com marcação do material nuclear (através de imunofluorescência com DAPI) demonstrando diminuição de material nuclear organizado no *scaffold*

As lâminas coradas com tricômio de Masson foram utilizadas para análise das fibras de colágeno. Dessa forma, foi notado no controle a presença de fascículos tendinosos organizados de forma paralela, sendo que nos *scaffolds* essas características foram mantidas (Figura 19).

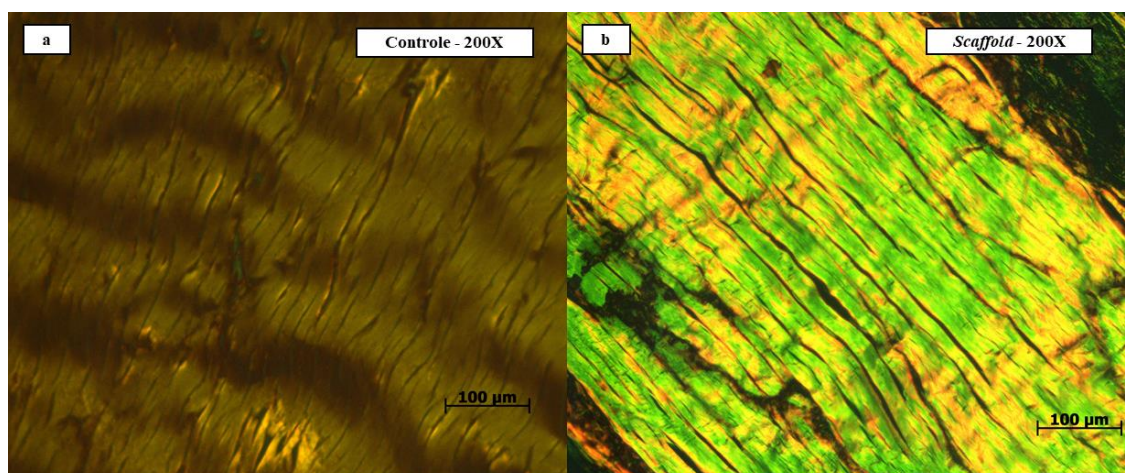




**Figura 19.** Histologia Masson - Controle x *Scaffold*

(a) Imagem em Tricômio de Masson aumento de 400X demonstrando a arquitetura do controle; (b) Imagem em Tricômio de Masson aumento de 400X demonstrando a manutenção da arquitetura no *scaffold*

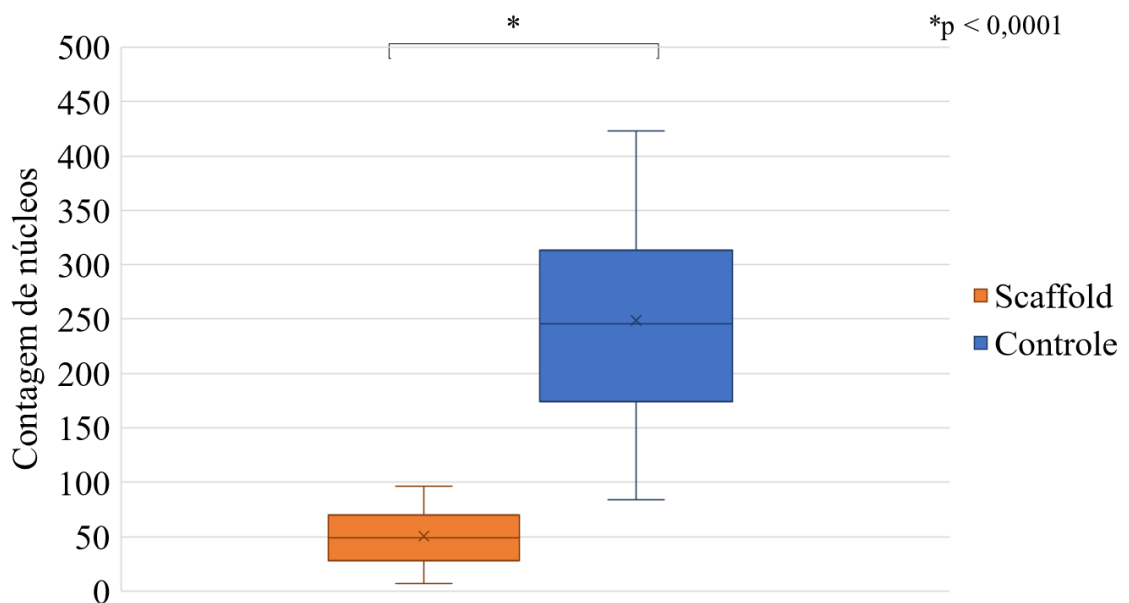
As lâminas coradas com picosirius foram utilizadas para análise das fibras de colágeno. Dessa forma foi notada a presença de colágeno Tipo III (coloração esverdeada) e Tipo I (coloração alaranjada) tanto no *scaffold* quanto nos controles (Figura 18). A diferença notada entre os grupos é devida principalmente a um aumento da distância inter e intrafascicular.



**Figura 20.** Histologia Picrosirius – Controle x *Scaffold*

(a) Imagem em Picrosirius com luz polarizada em aumento de 200X demonstrando a matriz de colágeno dos fascículos tendinosos organizados de forma paralela; (b) Imagem em Picrosirius com luz polarizada em aumento de 200X demonstrando as alterações na organização do colágeno no *scaffold*

No método de análise semiquantitativo utilizado para avaliação da remoção do material nuclear, notamos diminuição substancial do material nuclear, visto que aproximadamente 79% ( $p < 0,0001$ ) do material nuclear foi removido durante o processo de descclularização (Figura 21 e Tabela 2). Ainda na análise semiquantitativa, notamos uma redução de aproximadamente 88% ( $p < 0,001$ ) na área ocupada por estruturas nucleares após o protocolo de descclularização (Tabela 3).



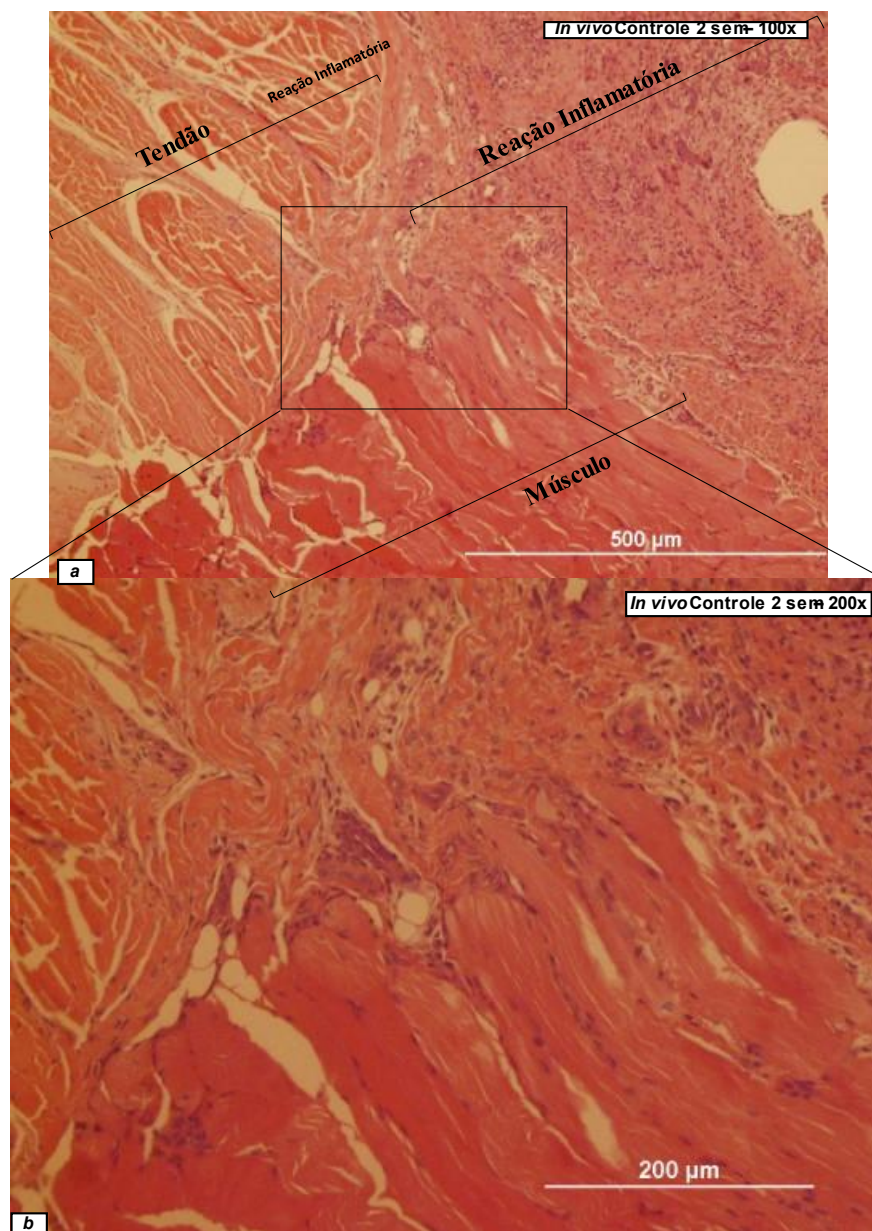
**Figura 21.** Análise da remoção do material nuclear no *scaffold*.

Gráfico demonstra a diminuição do número de núcleos por campo contabilizados no *scaffold* após a realização do protocolo de descclularização com significância estatística, visto que  $p < 0,0001$ .



### 5.2.2 Resultado da análise microscópica do modelo experimental *in vivo*

As lâminas coradas com H&E foram analisadas tanto no grupo de lesão do manguito rotador com a inserção do *scaffold* (intervenção), quanto no grupo de lesão do manguito rotador sem a inserção do *scaffold* (controle *in vivo*).

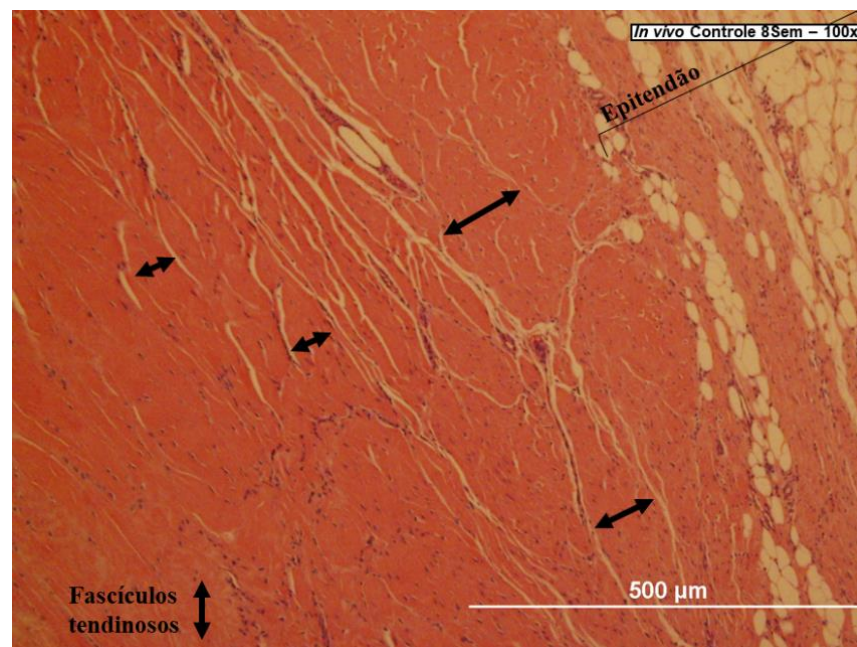


**Figura 22.** Histologia H&E - Controle *in vivo* 2 semanas

(a) Imagem em H&E com aumento de 100X representando o tecido muscular, tendinoso e a reação inflamatória característica do processo de cicatrização tendinosa; (b) Imagem em H&E aumento de 200x demonstrando a região de confluência do tecido muscular, tendinoso e da reação inflamatória (com predomínio de linfócitos e macrófagos).

Na avaliação do controle *in vivo* com duas semanas de pós-operatório, foi notado um tecido em cicatrização com abundante material inflamatório, caracterizado principalmente por linfócitos e macrófagos. Nessa região também foi notada a presença de tecido com característica de vasos sanguíneos, o que denota uma neovascularização (Figura 22).

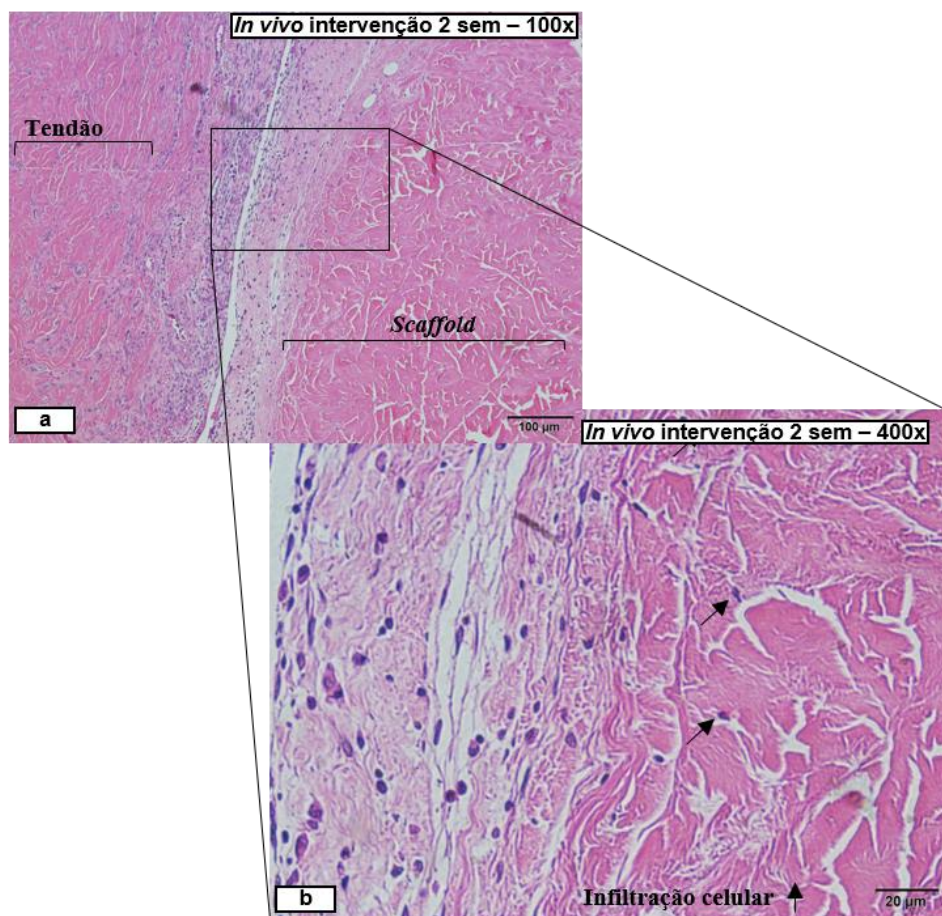
Após oito semanas de pós-operatório, o grupo controle *in vivo* apresentava um tecido tendinoso com aspecto mais organizado e uma diminuta reação inflamatória. Nesse grupo os fascículos tendinosos eram claramente visualizados, assim como o epitendão (Figura 23).



**Figura 23.** Histologia H&E – Controle *in vivo* 8 semanas

Imagem em H&E com aumento de 100X demonstrando o tecido tendinoso já organizado após oito semanas de pós-operatório

Na análise do grupo submetido a inserção do *scaffold* (grupo intervenção), os *scaffolds* foram facilmente caracterizados na análise histológica tanto com duas quanto com oito semanas de pós-operatório (Figura 24 e 25). O tecido inflamatório no grupo com e sem a inserção do *scaffold* apresentava características similares tanto com duas quanto com oito semanas de pós-operatório (Figura 22, 23, 24 e 25). A infiltração celular no *scaffold* foi facilmente caracterizada com duas e oito semanas; a grande diferença era uma infiltração celular na periferia do *scaffold* com duas semanas, em comparação a uma infiltração mais abrangente nos animais submetidos a morte indolor com oito semanas (Figura 23).

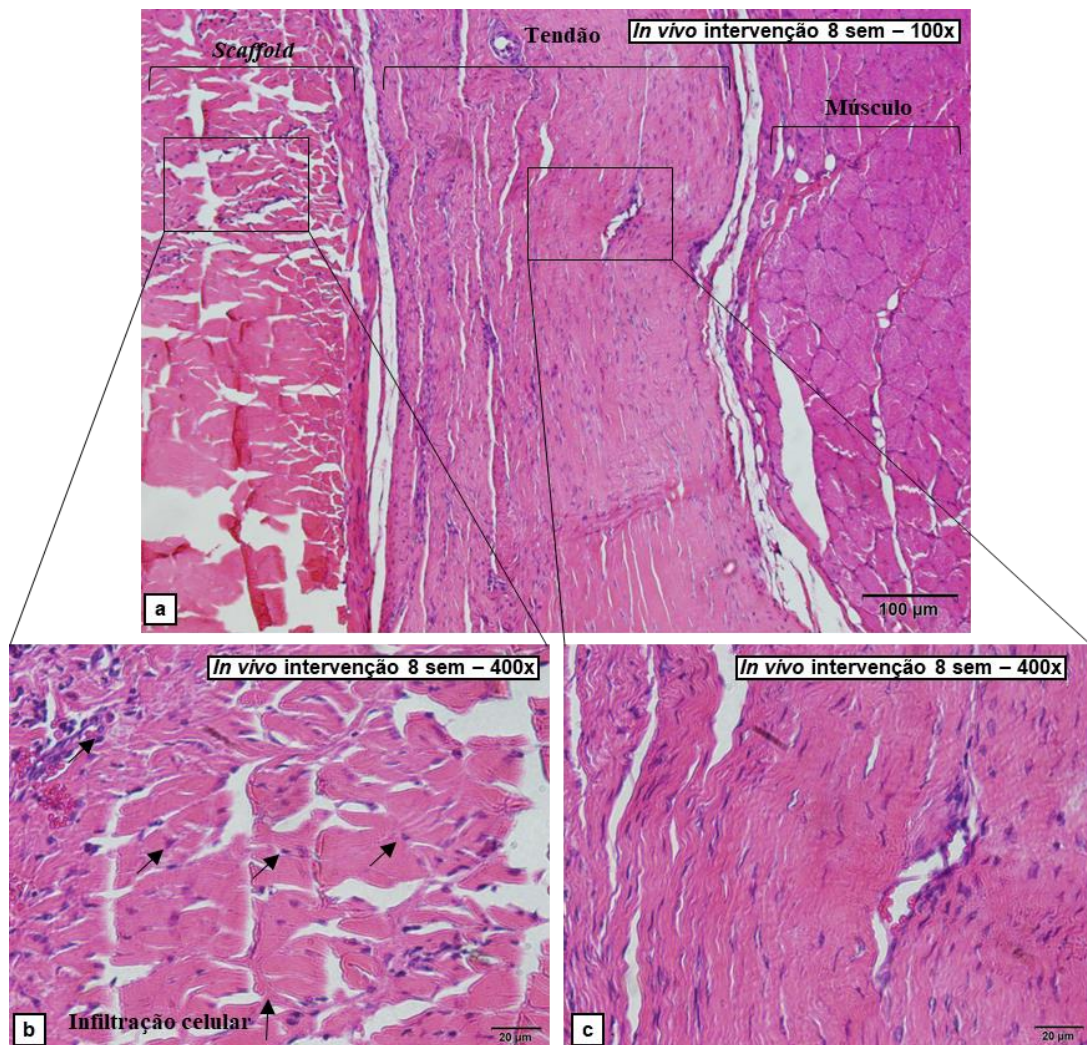


**Figura 24.** Histologia H&E – Intervenção *in vivo* 2 semanas



(a) Imagem em H&E com aumento de 100X demonstrando claramente o tendão do manguito rotador e o *scaffold*; (b) Imagem em H&E com aumento de 400X demonstrando infiltração celular na periferia do *scaffold* (marcação com setas).

Na análise semiquantitativa relativa à infiltração celular no *scaffold*, nota-se aumento progressivo de células na região onde se encontrava o *scaffold* (Figura 26). O *scaffold* apresentava uma média de 50,45 células por quadrante, número que permanece estável após duas semanas de pós-operatório e aumenta para 148,67 após oito semanas de pós-operatório (Figura 26 e Tabela 2).



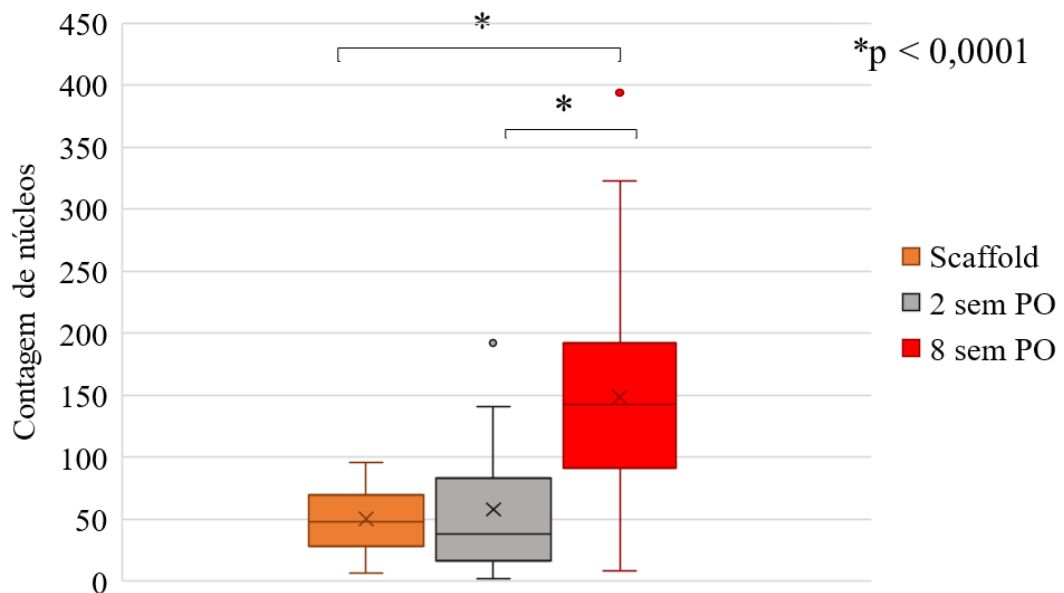
**Figura 25.** Histologia *in vivo* H&E - Intervenção 8 semanas

(a) Imagem em H&E com aumento de 100X demonstrando claramente o *scaffold*, tecido tendinoso e tecido muscular; (b) Imagem em H&E com aumento de 400X demonstrando a infiltração celular (marcação com setas) na região central do *scaffold*; (c) Imagem em H&E com aumento de 400X demonstrando o tecido tendinoso com organização típica.

**Tabela 2.** Análise semiquantitativa dos núcleos - Contagem.

	Contagem de núcleos (DP)	valor p
<b>Controle</b>	248,85 (91,53)	< 0,0001
<b>Scaffold</b>	50,45 (24,35)	0,6081
<b>2 semanas de pós-operatório – <i>in vivo</i></b>	57,90 (50,49)	< 0,0001
<b>8 semanas de pós-operatório – <i>in vivo</i></b>	148,67 (82,29)	

Tabela 2 representa a diminuição quantitativa da contagem de núcleos quando se compara o controle com o *scaffold* e o aumento quando se analisa o tempo passado após a inserção do *scaffold* na topografia da lesão. DP: Desvio padrão.



**Figura 26.** Análise semiquantitativa da invasão celular no *scaffold* ao longo do tempo de pós-operatório.

Representação quantitativa da infiltração celular progressiva no *scaffold* ao longo de duas e oito semanas, demonstrando aumento progressivo do número de células na topografia do *scaffold* ao longo do tempo. Sem: semanas. PO: Pós-operatório

Na análise semiquantitativa relativa à área ocupada pelos núcleos, nota-se aumento similar ao apresentado na quantificação. Em outras palavras, o *scaffold* apresentava 0,175% de área ocupada por núcleos; após duas semanas, essa área permanece estável e apresenta um aumento para 1,795% da área após oito semanas de pós operatório.

**Tabela 3.** Análise semiquantitativa dos núcleos – Área.

	Área dos núcleos (DP)	valor p
Controle	2,628% (1,094%)	<0,0001
Scaffold	0,293% (0,175%)	0,1611
2 semanas de pós-operatório – <i>in vivo</i>	0,558% (0,552%)	<0,0001
8 semanas de pós-operatório – <i>in vivo</i>	1,795% (1,353%)	

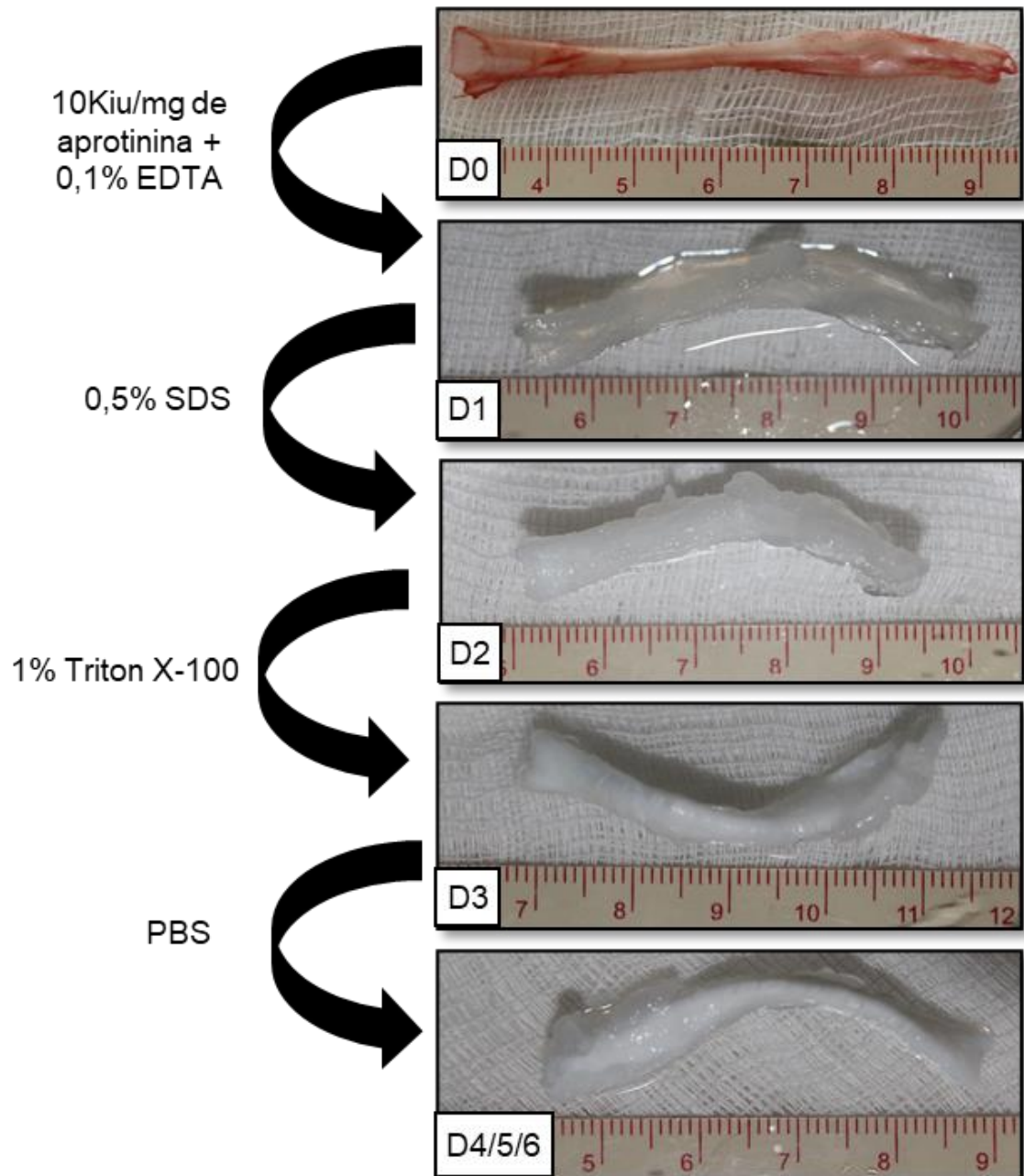
Tabela 3 representa a diminuição quantitativa da área ocupada pela estrutura nuclear nos cortes analisados após o protocolo de descelularização e posterior aumento dessa área após a inserção do *scaffold* na topografia da lesão. DP Desvio padrão.

### 5.3 Resultados da análise macroscópica

#### 5.3.1 Resultados da análise macroscópica do tendão do músculo gastrocnêmio e do *scaffold*

O tendão do músculo gastrocnêmio (controle) apresenta uma coloração avermelhada no início do protocolo (Figura 27), devido principalmente ao tecido sanguíneo presente na superfície. Apresentava

também uma consistência firme – tipicamente relacionada ao material tendinoso. Ao longo do processo de descelularização, o material apresentou alteração na coloração, manutenção da consistência e um aumento perceptível do seu volume.



**Figura 27.** Aspecto macroscópico da descelularização.

Apresentação esquemática diária do protocolo de descelularização com os respectivos reagentes utilizados e demonstração clara das modificações sofridas ao longo do protocolo. PBS: Solução salina tamponada de fosfato; EDTA: Ácido etilendiamino etraacético SDS: Dodecilsulfato de sódio; Triton X-100: t-octil-fenoxipolietoxietanol; min: minutos ;hr: horas D1: Dia 1; D2: Dia 2; D3: Dia 3; D4: Dia 4; D5: Dia 5; D6: Dia 6;

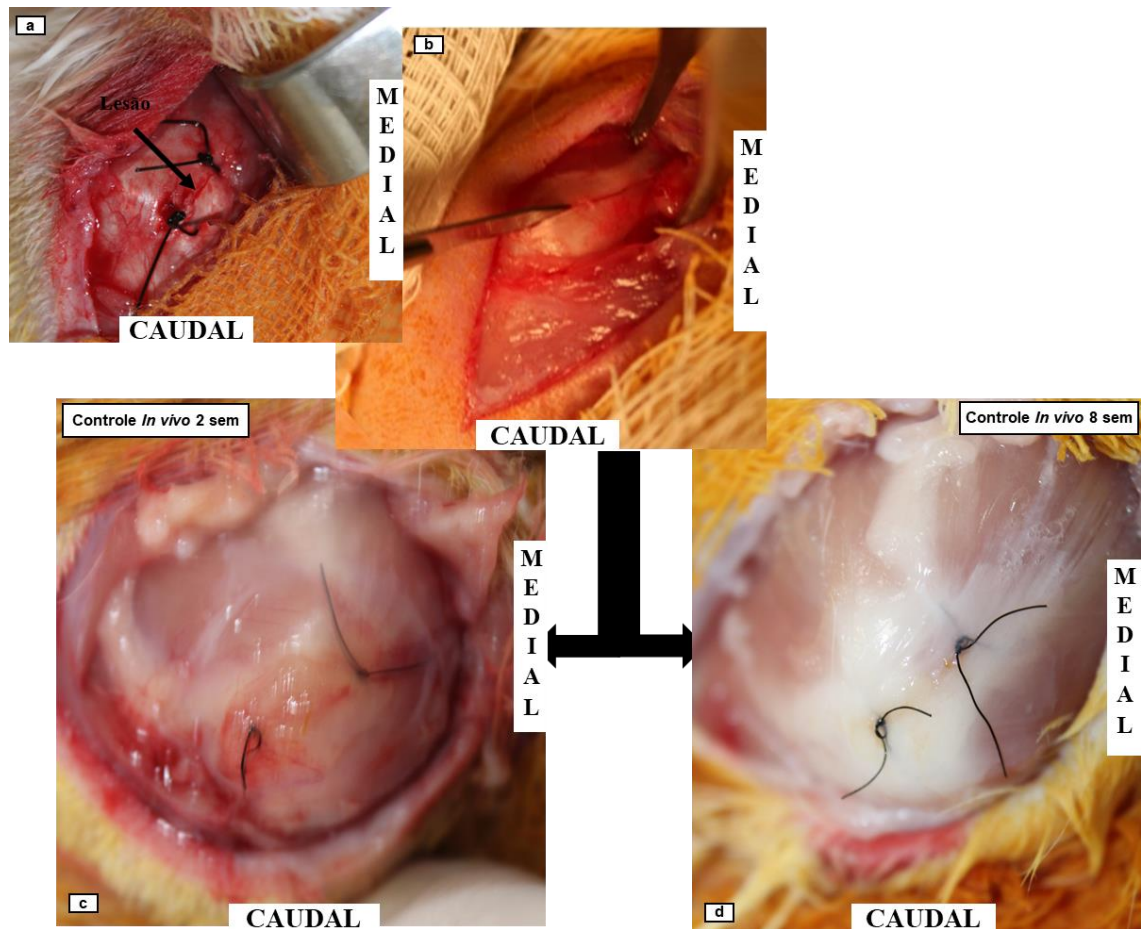
A coloração, que era avermelhada no início do procedimento (Figura 27.D0), apresentou uma certa transparência após a utilização de aprotinina e EDTA (Figura 27.D1) e ficou esbranquiçada ao final de todas as etapas descelularizantes (Figura 27.D4/5/6). Não foi notada a presença de coloração avermelhada ou rósea ao final do protocolo (Figura 27.D4/5/6), o que poderia ser relacionado a tecido vascular remanescente.

Foi notado um aumento considerável do volume, sem que fosse notado qualquer alteração grosseira na textura do material, ou seja, o *scaffold* manteve consistência e a textura semelhante ao controle.

### **5.3.2 Resultados da análise macroscópica do modelo experimental *in vivo***

Durante o período de pós-operatório, não foram notados, em nenhum dos animais, sinais de alteração na aceitação na dieta, hábito intestinal, irritabilidade ou outros sinais que pudessem ser relacionados com *stress* ou desconforto. Com relação à ferida operatória, também não foram notados sinais infecciosos locais, como hiperemia, edema, saída de secreção ou deiscência de sutura cutânea em nenhum dos animais.



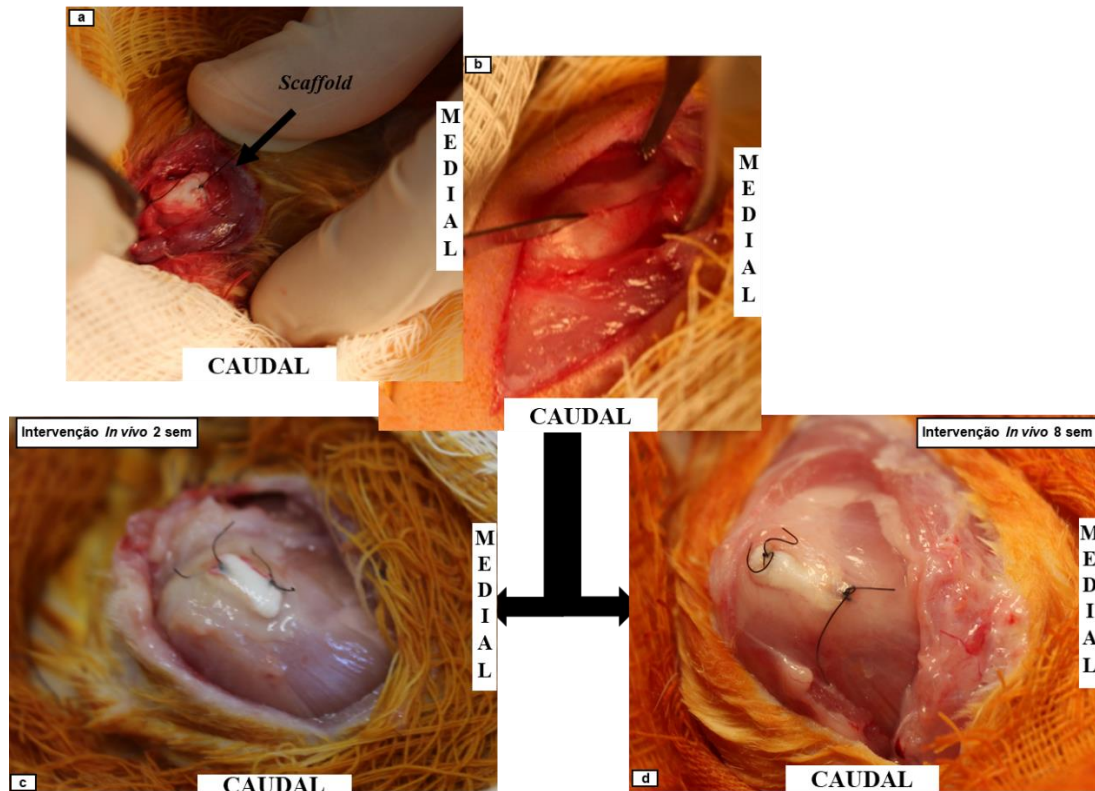


**Figura 28.** Aspecto macroscópico da avaliação *in vivo* – controle *in vivo*

(a) Apresentação fotográfica do padrão de lesão tendinosa causada no manguito rotador a da marcação com Nylon; (b) Demonstração fotográfica do momento da lesão com lâmina fria de bisturi; (c) Aspecto macroscópico do controle *in vivo* após 2 semanas de pós operatório demonstrado claramente a localização da marcação com nylon, e o manguito rotador com aspecto de cicatrização; (d) Aspecto macroscópico do controle *in vivo* após 8 semanas de pós operatório demonstrando claramente a marcação com nylon e o aspecto do manguito rotador com semelhanças ao tendão no pré-operatório.

Não foi possível caracterizar de forma precisa a lesão do tendão do manguito rotador, visto que a lesão estava cicatrizada em todos os momentos de pós-operatório em ambos os grupos analisados (Figura 28). Por esse motivo, utilizamos a marcação com nylon 4-0 (Nylon 4-0; Shalon, Alto da

Boa Vista, GO, Brasil) para identificação da região previamente lesionada (Figura 28 e 29). A grande diferença entre os animais submetidos a morte indolor induzida com duas ou oito semanas foi a presença de um tecido cicatricial com maior organização após oito semanas (Figura 28).



**Figura 29.** Aspecto macroscópico da avaliação *in vivo* – Intervenção *in vivo*

(a) Apresentação fotográfica da sobreposição do *scaffold* na topografia da lesão tendinosa causada no manguito rotador; (b) Demonstração fotográfica do momento da lesão com lâmina fria de bisturi; (c) Aspecto macroscópico do grupo intervenção *in vivo* com duas semanas de pós operatório demonstrando o *scaffold* e a identificação com nylon na topografia do tendão; (d) Aspecto macroscópico do grupo intervenção *in vivo* com oito semanas de pós operatório demonstrando o *scaffold* com sinais de integração ao tecido tendinoso.

Não foram encontradas diferenças inesperadas entre os animais submetidos ao grupo intervenção em comparação com o grupo controle *in vivo* em ambos os momentos do pós-operatório. A única diferença foi a presença do *scaffold* na topografia em que foi inserido (Figuras 28 e 29). Em uma comparação entre os tendões do manguito rotador submetidos a inserção do *scaffold* e coletados após duas ou oito semanas, notou-se aumento progressivo da aderência e integração entre o *scaffold* e o tendão (Figura 29).

## **6. DISCUSSÃO**

Os principais achados dessa tese fazem referência ao preparo e à apresentação de um *scaffold* descelularizado com características biomecânicas e histológicas que o tornam apto a ser utilizado em lesões tendinosas e ligamentares, principalmente quando utilizado na função de *augmentation*.

A busca por substitutos com essas características não é recente, visto que autores buscam alternativas para lesões com grandes perdas de tendão desde o século XIX (ROBSON, 1889). Desde essas primeiras publicações, a utilização de material autólogo é apresentada como o padrão ouro (GRAU, 1958; WHITE, 1960), entretanto as limitações relacionadas com a sua utilização (incapacidade biomecânica para substituir o tecido original) e coleta (morbidade no sítio doador e limitada disponibilidade) motivam a busca por alternativas.

Levando em consideração essas limitações dos substitutos autólogos, existem descrições para utilização de outros tecidos que exerçam função similar, principalmente os substitutos sintéticos, biológicos xenógenos e biológicos alógenos. Os resultados com utilização desses substitutos não são homogêneos e cada material avaliado apresenta vantagens e desvantagens relacionadas com a sua utilização (CHEN *et al.*, 2009).

Procurando diminuir as limitações relacionadas à utilização dos substitutos biológicos, a busca por métodos de preparação que possam torná-los um produto com biocompatibilidade aceitável, sem risco para transmissão de doenças, pequeno risco para resposta inflamatória crônica e capacidade de armazenamento por longos períodos é crescente. Nesse sentido, a utilização de métodos de preparação focados em remoção do material celular (descelularização) tornaram-se uma alternativa promissora

para os substitutos biológicos alógenos e xenógenos (CARTMELL & DUNN, 2000; CRAPO, GILBERT, & BADYLAK, 2012).

Em uma comparação com o tecido alógeno convencional, cujo método de preparação não é uniforme, os tecidos alógenos descelularizados possuem as seguintes vantagens: (i) possibilidade de uniformização da técnica de processamento, (ii) menor resposta inflamatória, visto que o material celular foi removido e o colágeno remanescente possui baixa imunogenicidade (YOUNGSTROM & BARRETT, 2016), e (iii) experimentação para armazenamento do material em temperatura ambiente por longos períodos.

Dentre as técnicas utilizadas para a descelularização tendinosa, a grande maioria utiliza uma combinação de três processos: (i) físicos (imersão e agitação, limpeza exaustiva com solução tampão, congelamento e descongelamento), (ii) químicos (utilização de detergentes e outros agentes descelularizantes) e (iii) enzimáticos (utilização de agentes capazes de remover material celular e proteger a matriz extracelular) (BLAUDEZ *et al.*, 2020). O nosso protocolo foi desenvolvido através dessa combinação de processos: (i) dois agentes químicos (SDS e Triton X-100), e (ii) dois agentes enzimáticos (EDTA e aprotinina) atuantes através de (iii) técnica física (imersão/agitação), combinados com uma segunda técnica física, a limpeza exaustiva com solução tampão (PBS). Esse processo foi realizado de maneira estéril, o que garante um tecido apto a ser avaliado em um modelo experimental *in vivo* (DONG *et al.*, 2015), mas não garante um tecido capaz de ser translado para a prática clínica sem a utilização de um protocolo de esterilização adicional (WANG *et al.*, 2017; BLAUDEZ *et al.*, 2020).

A necessidade de protocolos de esterilização é discutida em inúmeros estudos, sendo a maioria dos protocolos esterilizantes relacionados com alterações nas propriedades biomecânicas e histológicas do substituto

tendinoso, de modo que se torna necessária a avaliação de métodos de esterilização inovadores aptos a serem utilizados em biomateriais (WANG *et al.*, 2017; BLAUDEZ *et al.*, 2020). Atualmente, o nível de segurança admitido como aceitável é a probabilidade de um micro-organismo em um milhão sobreviver ao protocolo esterilização (SAL6) (NICHOLS, BURNS, & CHRISTOPHER, 2009).

Outra crítica frequente aos métodos de descelularização é a escolha dos agentes químicos, principalmente os detergentes, e as respectivas diluições dessas substâncias durante o processo (XING *et al.*, 2014). No protocolo apresentado, optamos por utilizar o Triton X-100 em concentração de 1% e o SDS em concentração de 0,5%. As respectivas diluições foram utilizadas após revisão de outros protocolos, que qualificaram essas concentrações como aptas a remover o tecido celular e preservar de forma satisfatória a MEC em tendões (WANG *et al.*, 2017). Com relação à técnica de aplicação dos agentes químicos e enzimáticos, a utilização de imersão e agitação (com utilização de *Shaker Orbital*) apresenta-se atualmente como uma alternativa válida nos processos de descelularização tendinosa (WHITLOCK *et al.*, 2007; BLAUDEZ *et al.*, 2020).

Existem inúmeros métodos de avaliação para os substitutos de origem tendinosa, dentre os quais podemos citar: (i) biomecânica, (ii) histologia, (iii) microscopia, (iv) avaliação *in vivo*, (v) citotoxicidade, (vi) mensuração do colágeno e (vii) DNA remanescente (LOVATI, BOTTAGISIO, & MORETTI, 2016). Nesse estudo, procuramos focar nas avaliações mais utilizadas na literatura (histológica e biomecânica) e em outras duas avaliações que podem contribuir de forma assertiva para as perspectivas do estudo (avaliação *in vivo* em modelo de lesão do manguito rotador e macroscópica).

A avaliação histológica foi dividida na análise do colágeno (H&E, Picrosirius e Tricômio de Masson) e na análise do material nuclear (H&E e imunofluorescência com DAPI). Para a realização das análises propostas, utilizamos como referência a classificação proposta por (CARALT *et al.*, 2015; WOOD & BROOKS, 2016), que classificava de forma semiquantitativa a remoção do material nuclear em: completa, substancial, moderada, mínima e material nuclear intacto.

De forma muito semelhante a outros estudos, apresentamos nesse estudo um *scaffold* com mínimas alterações na arquitetura e substancial remoção de material nuclear (WHITLOCK *et al.*, 2007). O método de avaliação semiquantitativo proposto na análise histológica apresenta algumas limitações quando comparado com a mensuração objetiva do DNA e colágeno remanescente, entretanto ambos os métodos costumam fornecer resultados similares (ROTH *et al.*, 2017).

A avaliação biomecânica demonstrou o *scaffold* com propriedades biomecânicas iguais ao controle no que se refere a força máxima, deformação relativa e rigidez. A manutenção nessas propriedades é amplamente relatada na literatura e um aumento no número de corpos de prova avaliados não causou alterações biomecânicas (na força máxima, deformação relativa e rigidez) com significância estatística na maior parte dos estudos (WANG *et al.*, 2017). Todavia, devido ao inchaço (*swelling*), as propriedades biomecânicas que utilizavam a área de secção (tensão máxima e módulo de elasticidade) no seu cálculo tiveram alterações significativas (WANG *et al.*, 2017). Os impactos relacionados a esse inchaço ainda não estão claros, entretanto acreditamos que ele esteja relacionado com o aumento do espaço inter e intrafascicular, o que auxilia na infiltração celular, e não altera a capacidade de ser utilizado como um substituto tendinoso.



Na avaliação macroscópica, o material manteve as principais propriedades do tendão no que se refere a coloração, consistência e brilho. A manutenção dessas propriedades torna factível, ao potencial cirurgião ortopédico, o entendimento do material e visualização do potencial clínico desse material. A coloração não apresentou um aspecto róseo que normalmente caracteriza vasos remanescentes, relacionados com descelularização ineficaz (AEBERHARD *et al.*, 2020).

A avaliação *in vivo* foi realizada em um modelo de lesão do manguito rotador no qual o *scaffold* foi utilizado com a função de *augmentation*, de modo que a manutenção estrutural do manguito rotador não dependia diretamente do *scaffold*. A lesão foi utilizada principalmente para aumentar a resposta inflamatória local e otimizar a integração tendão-*scaffold*.

A escolha do modelo experimental apresentado foi feita em razão do não conhecimento prévio da evolução das propriedades biomecânicas do *scaffold* ao longo do tempo, após implante *in vivo*. Caso tivéssemos optado por um modelo experimental com utilização do *scaffold* exercendo função de suporte (*bridge*), teríamos mais informações relativas à capacidade biomecânica, entretanto se essas propriedades não fossem aptas a suportar o período de cicatrização do manguito rotador, perderíamos os espécimes utilizados nessa avaliação.

De forma geral, com o modelo utilizado, não conseguimos avaliar as modificações biomecânicas ao longo do tempo, porém conseguimos notar crescente infiltração celular no *scaffold* e sua integração tecidual progressiva com o manguito rotador.

Outro tema relacionado à avaliação *in vivo* que deve ser discutido é o modelo experimental de lesão do manguito rotador utilizado: optamos nesse estudo por uma lesão paralela às fibras tendinosas no tendão do músculo

subescapular, tendão que nos coelhos exerce função similar ao tendão do músculo supraespinal em humanos (GRUMET *et al.*, 2009).

As principais limitações do estudo são relativas à necessidade de algumas avaliações adicionais *in vivo* e *in vitro*, eventuais preparações adicionais que possam permitir o estoque do *scaffold* em temperatura ambiente, com nível de esterilidade adequada e a eventual superdimensionamento dos resultados, já que o poder estatístico na análise da força máxima foi inferior a 50%. Sobre o superdimensionamento dos resultados é importante ressaltar que uma eventual diferença entre os grupos no que se refere a força máxima seria perceptível apenas se fossem avaliados 1109 espécimes em cada grupo, o que tornaria inviável a realização desse projeto. Esse tamanho amostral foi calculado com base nos resultados de força máxima encontrado nesse estudo (Tabela 1: controle 104,18N e *scaffold* 101,90N).

Sobre as perspectivas, esperamos, ainda, progredir com novas avaliações de citotoxicidade, mensuração da capacidade de permitir infiltração com células-tronco e mensuração quantitativa do colágeno. De forma mais promissora, esperamos repetir esse protocolo com material humana e realizar as devidas análises nesse *scaffold* com origem humana.

O cenário nacional é particularmente fértil para esse tipo de substituto, visto que a legislação brasileira não permite a comercialização de alguns tecidos com origem alógena utilizados em outros países. Nessa perspectiva, a possibilidade de padronização da descelularização em um centro para manejos de tecidos humanos poderá fornecer aos cirurgiões ortopédicos possibilidades de tratamento para as lesões de tecidos moles com grande perda tecidual.

Sobre a avaliação *in vivo*, incluímos também como limitação e perspectiva futura desse trabalho a utilização dos *scaffolds* em outros modelos experimentais, semeados ou não com células-tronco, que possam avaliar a resposta inflamatória e a manutenção das propriedades biomecânicas ao longo do tempo.

Na preparação do *scaffold* com tecido humano como um produto estocável em temperatura ambiente, acreditamos ser necessário repetir o protocolo em sala própria para manipulação de tecidos humanos (ISO5), preparo com esterilização adicional, de forma que possamos garantir a manutenção da arquitetura e os níveis de segurança adequados (SAL6) com relação à esterilidade.

Como ponto forte do estudo, podemos destacar o fato de ser o primeiro protocolo de descellularização brasileiro voltado especificamente para tendões, bem como o primeiro estudo que realizou um implante de *scaffold* descellularizado com origem alógena em lesão do manguito rotador. Obtivemos, ao longo desse estudo, resultados coincidentes com a literatura, o que caracteriza o protocolo de descellularização estudado como um método promissor e reprodutível.

## **7. CONCLUSÃO**

O protocolo de descelularização proposto produziu um *scaffold* com baixa celularidade, manteve as principais características biomecânicas e permitiu integração tecidual progressiva, quando usado com a função de *augmentation*.

## **8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Aeberhard P, Grognez A, Peneveyre C, McCallin S, Hirt-Burri N, Antons J, et al. Efficient decellularization of equine tendon with preserved biomechanical properties and cytocompatibility for human tendon surgery indications. *Artif Organs*. 2020 Apr 14;44(4):161–71.
- Andreassi A, Bilenchi R, Biagioli M, D’Aniello C. Classification and pathophysiology of skin grafts. *Clin Dermatol*. 2005;23(4):332–7.
- Aragona J, Parsons JR, Alexander H, Weiss AB. Soft tissue attachment of a filamentous carbon-absorbable polymer tendon and ligament replacement. *Clin Orthop Relat Res*. 1981;160:268–78.
- Badylak SF, Arnoczky S, Plouhar P, Haut R, Mendenhall V, Clarke R, et al. Naturally occurring extracellular matrix as a scaffold for musculoskeletal repair. *Clin Orthop Relat Res*. 1999;(367 SUPPL.):333–43.
- Badylak SF, Lantz GC, Coffey A, Geddes LA. Small intestinal submucosa as a large diameter vascular graft in the dog. *J Surg Res*. 1989;47(1):74–80.
- Bailey JR, Kim C, Alentorn-Geli E, Kirkendall DT, Ledbetter L, Taylor DC, et al. Rotator Cuff Matrix Augmentation and Interposition: A Systematic Review and Meta-analysis. *Am J Sports Med*. 2019;47(6):1496–506.
- Blaudez F, Ivanovski S, Hamlet S, Vaquette C. An overview of decellularisation techniques of native tissues and tissue engineered products for bone, ligament and tendon regeneration. *Methods*. Elsevier; 2020;171(August):28–40.
- Bottagisio M, D’Arrigo D, Talò G, Bongio M, Ferroni M, Boschetti F, et al. Achilles tendon repair by decellularized and engineered xenografts in a rabbit model. *Stem Cells Int*. 2019;2019.

- Caralt M, Uzarski JS, Jacob S, Oberfell KP, Berg N, Bijonowski BM, et al. Optimization and critical evaluation of decellularization strategies to develop renal extracellular matrix scaffolds as biological templates for organ engineering and transplantation. *Am J Transplant*. 2015;15(1):64–75.
- Cartmell JS, Dunn MG. Technical note: Effect of chemical treatments on tendon cellularity and mechanical properties. *J Biomed Mater Res*. 2000;49(1):134–40.
- Chen J, Xu J, Wang A, Zheng M. Scaffolds for tendon and ligament repair: Review of the efficacy of commercial products. *Expert Rev Med Devices*. 2009;6(1):61–73.
- Cheng CW, Solorio LD, Alsberg E. Decellularized tissue and cell-derived extracellular matrices as scaffolds for orthopaedic tissue engineering. *Biotechnol Adv*. 2014 Mar;32(2):462–84.
- Chong AKS, Ang AD, Goh JCH, Hui JHP, Lim AYT, Lee EH, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells influence early tendon-healing in a rabbit Achilles tendon model. *J Bone Jt Surg - Ser A*. 2007;89(1):74–81.
- Costa FDAD, Dohmen P, Lopes S V., Pohl F, Vilani R, Vieira E, et al. Experimental study with decellularized porcine heterografts - the prosthesis of the future. *Brazilian J Cardiovasc Surg*. 2004 Mar 1;19(1):74–82.
- Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*. 2012;32(12):3233–43.
- Curtis RJ, Delee JC, Drez DJ. Reconstruction of the anterior cruciate ligament with freeze dried fascia lata allografts in dogs. *Am J Sports*



Med. 1985 Nov 23;13(6):408–14.

Deeken CR, White AK, Bachman SL, Ramshaw BJ, Cleveland DS, Loy TS, et al. Method of preparing a decellularized porcine tendon using tributyl phosphate. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater.* 2011;96 B(2):199–206.

Derwin KA, Badylak SF, Steinmann SP, Iannotti JP. Extracellular matrix scaffold devices for rotator cuff repair. *J Shoulder Elb Surg. Journal of Shoulder and Elbow Surgery Board of Trustees;* 2010;19(3):467–76.

Dong S, Huangfu X, Xie G, Zhang Y, Shen P, Li X, et al. Decellularized Versus Fresh-Frozen Allografts in Anterior Cruciate Ligament Reconstruction: An in Vitro Study in a Rabbit Model. *Am J Sports Med.* 2015;43(8):1924–34.

Edwards JH, Ingham E, Herbert A. Decellularisation affects the strain rate dependent and dynamic mechanical properties of a xenogeneic tendon intended for anterior cruciate ligament replacement. *J Mech Behav Biomed Mater. Elsevier Ltd;* 2019;91(November 2018):18–23.

Eren AD, Sinha R, Eren ED, Huipin Y, Gulce-Iz S, Valster H, et al. Decellularized Porcine Achilles tendon induces anti-inflammatory macrophage phenotype in Vitro and tendon repair in vivo. *J Immunol Regen Med. Elsevier;* 2020;8(January):100027.

FLYNN JE, WILSON JT, CHILD CG, GRAHAM JH. Heterogenous and autogenous-tendon transplants. An experimental study of preserved bovine-tendon transplants in dogs and autogenous-tendon transplants in dogs. *J Bone Joint Surg Am.* 1960;

Gallie WE, Le Mfasurier AB. A clinical and experimental study of the free transplantation of fascia and tendon. *J Bone Jt Surg.* 1922;4(3):600–12.

- Garrett WE. Muscle strain injuries. *Am J Sports Med.* 1996;24(6 Suppl):S2-8.
- Gazdag AR, Lane JM, Glaser D, Forster RA. Alternatives to Autogenous Bone Graft: Efficacy and Indications. *J Am Acad Orthop Surg.* 1995;3(1):1–8.
- Giannini S, Buda R, Di Caprio F, Agati P, Bigi A, De Pasquale V, et al. Effects of freezing on the biomechanical and structural properties of human posterior tibial tendons. *Int Orthop.* 2008;32(2):145–51.
- Goissis G, Suzigan S, Parreira DR, Maniglia JV, Braile DM, Raymundo S. Preparation and characterization of collagen-elastin matrices from blood vessels intended as small diameter vascular grafts. *Artif Organs.* 2000;24(3):217–23.
- Grau HR. The Artificial Tendon: an Experimental Study. *Plast Reconstr Surg.* 1958;22(1):562–6.
- Grumet RC, Hadley S, Diltz M V., Lee TQ, Gupta R. Development of a new model for rotator cuff pathology: The rabbit subscapularis muscle. *Acta Orthop.* 2009;80(1):97–103.
- Herson MR, Mathor MB, Altran S, Capelozzi VL, Ferreira MC. In vitro construction of a potential skin substitute through direct human keratinocyte plating onto decellularized glycerol-preserved allodermis. *Artif Organs.* 2001;25(11):901–6.
- Hey-groves EW. the use of fascial and tendon grafts in certain fractures and dislocations. *Ann Surg.* 1934;100(1):20–9.
- Hodde J. Review: Naturally occurring scaffolds for soft tissue repair and regeneration. *Tissue Eng.* 2002 Apr 1;8(2):295–308.

- Huang H, Zhang J, Sun K, Zhang X, Tian S. Effects of repetitive multiple freeze-thaw cycles on the biomechanical properties of human flexor digitorum superficialis and flexor pollicis longus tendons. *Clin Biomech.* Elsevier Ltd; 2011;26(4):419–23.
- Juncosa-Melvin N, Shearn JT, Boivin GP, Gooch C, Galloway MT, West JR, et al. Effects of Mechanical Stimulation on the Biomechanics and Histology of Stem Cell–Collagen Sponge Constructs for Rabbit Patellar Tendon Repair. *Tissue Eng.* 2006;12(8):2291–300.
- Kurtz AD. Free Transplantation of Tendons. *Ann Surg.* 1919;69(4):450.
- Lange F. Tendon transplantation. *Cal State J Med.* 1905;VIII(5):148–53.
- Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* (80- ). 1993;260:920–6.
- Laurencin CT, Ambrosio AMA, Borden MD, Cooper JA. Tissue Engineering: Orthopedic Applications. *Annu Rev Biomed Eng.* 1999 Aug;1(1):19–46.
- de Lima Santos A, Silva CG da, de Sá Barretto LS, Franciozi CE da S, Tamaoki MJS, de Almeida FG, et al. Biomechanical evaluation of tendon regeneration with adipose-derived stem cell. *J Orthop Res.* 2019 Jun 4;37(6):1281–6.
- Littler JW. Free tendon grafts in secondary flexor tendon repair. *Am J Surg.* 1947;74(3):315–21.
- Liu GM, Pan J, Zhang Y, Ning LJ, Luo JC, Huang FG, et al. Bridging Repair of Large Rotator Cuff Tears Using a Multilayer Decellularized Tendon Slices Graft in a Rabbit Model. *Arthrosc - J Arthrosc Relat Surg.* Arthroscopy Association of North America; 2018;34(9):2569–78.
- Livesey SA, Herndon DN, Hollyoak MA, Atkinson YH, Nag A.

- Transplanted acellular allograft dermal matrix: Potential as a template for the reconstruction of viable dermis. *Transplantation*. 1995. p. 1–9.
- Longo UG, Berton A, Papapietro N, Maffulli N, Denaro V. Epidemiology, genetics and biological factors of rotator cuff tears. *Rotator Cuff Tear*. 2011;57:1–9.
- Longo UG, Lamberti A, Rizzello G, Maffulli N, Denaro V. Synthetic augmentation in massive rotator cuff tears. *Med Sport Sci*. 2012;57(January):168–77.
- Lovati AB, Bottagisio M, Moretti M. Decellularized and Engineered Tendons as Biological Substitutes: A Critical Review. *Stem Cells Int*. 2016;2016:1–24.
- Mason ML, Shearon CG. The process of tendon repair. An experimental study of tendon suture and tendon graft. *Arch Surg*. 1932;25(4):615–92.
- Moraes VY, Lenza M, Tamaoki MJS, Faloppa F, Belloti JC. Platelet-rich therapies for musculoskeletal soft tissue injuries. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013;(4):1–126.
- Nichols A, Burns DC, Christopher R. Studies On The Sterilization Of Human Bone And Tendon Musculoskeletal Allograft Tissue Using Supercritical Carbon Dioxide. *J Orthop*. 2009;
- Oh JH, Chung SW, Kim SH, Chung JY, Kim JY. 2013 Neer Award: Effect of the adipose-derived stem cell for the improvement of fatty degeneration and rotator cuff healing in rabbit model. *J Shoulder Elb Surg*. Elsevier Ltd; 2014;23(4):445–55.
- Ono Y, Dávalos Herrera DA, Woodmass JM, Boorman RS, Thornton GM, Lo IKY. Graft Augmentation Versus Bridging for Large to Massive Rotator Cuff Tears: A Systematic Review. *Arthrosc - J Arthrosc Relat*

- Surg. Arthroscopy Association of North America; 2017;33(3):673–80.
- Ouyang HW, Goh JCH, Thambyah A, Teoh SH, Lee EH. Knitted Polylactide-co-glycolide Scaffold Loaded with Bone Marrow Stromal Cells in Repair and Regeneration of Rabbit Achilles Tendon. *Tissue Eng.* 2003;9(3):431–9.
- Pan J, Liu GM, Ning LJ, Zhang Y, Luo JC, Huang FG, et al. Rotator cuff repair using a decellularized tendon slices graft: an in vivo study in a rabbit model. *Knee Surgery, Sport Traumatol Arthrosc.* 2015;23(5):1524–35.
- Park JP, Arnold JA, Coker TP, Harris WD, Becker DA. Treatment of acromioclavicular separations. *Am J Sports Med.* 1980 Jul 23;8(4):251–6.
- Parmaksiz M, Dogan A, Odabas S, Elçin AE, Elçin YM. Clinical applications of decellularized extracellular matrices for tissue engineering and regenerative medicine. *Biomed Mater.* 2016;11(2).
- Peacock EE, Madden JW. Human composite flexor tendon allografts. *Ann Surg.* 1967;166(4):624–9.
- Percie du Sert N, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, Browne WJ, et al. Reporting animal research: Explanation and elaboration for the ARRIVE guidelines 2.0. Boutron I, editor. *PLOS Biol.* 2020 Jul 14;18(7):e3000411.
- Ricci JL, Gona AG, Alexander H. In vitro tendon cell growth rates on a synthetic fiber scaffold material and on standard culture plates. *J Biomed Mater Res.* 1991;25(5):651–66.
- Robson M. Tendon grafting. *Hosp (Lond 1886).* 1889;Jun 8(6):141–9.

- Rodkey WG, Cabaud HE, Feagin JA, Perlik PC. A partially biodegradable material device for repair and reconstruction of injured tendons. *Am J Sports Med.* 1985;13(4):242–7.
- Rossi CA, Pozzobon M, De Coppi P. Advances in musculoskeletal tissue engineering: Moving towards therapy. *Organogenesis.* 2010;6(3):167–72.
- Roth SP, Glauche SM, Plenge A, Erbe I, Heller S, Burk J. Automated freeze-thaw cycles for decellularization of tendon tissue - a pilot study. *BMC Biotechnol. BMC Biotechnology;* 2017;17(1):1–10.
- Schulze-Tanzil G, Al-Sadi O, Ertel W, Lohan A. Decellularized Tendon Extracellular Matrix—A Valuable Approach for Tendon Reconstruction? *Cells.* 2012;1(4):1010–28.
- Seyler TM, Bracey DN, Plate JF, Lively MO, Mannava S, Smith TL, et al. The Development of a Xenograft-Derived Scaffold for Tendon and Ligament Reconstruction Using a Decellularization and Oxidation Protocol. *Arthrosc J Arthrosc Relat Surg. Arthroscopy Association of North America;* 2017 Feb;33(2):374–86.
- Shepherd HM, Lam PH, Murrell GAC. Synthetic Patch Rotator Cuff Repair: A 10-year Follow-Up. *Shoulder Elb.* 2014;6(1):35–9.
- Smith JC. The pathology of human aortic valve homografts. *Thorax.* 1967 Mar 1;22(2):114–38.
- Tashjian RZ. Epidemiology, Natural History, and Indications for Treatment of Rotator Cuff Tears. *Clin Sports Med. Elsevier Inc;* 2012;31(4):589–604.
- Ventura A, Terzaghi C, Legnani C, Borgo E, Albisetti W. Synthetic grafts for anterior cruciate ligament rupture: 19-year outcome study. *Knee.*

Elsevier B.V.; 2010;17(2):108–13.

Vracko R, Benditt EP. Basal Lamina: the Scaffold for Orderly Cell Replacement. *J Cell Biol.* 1972;55(2):406–19.

Walton JR, Bowman NK, Khatib Y, Linklater J, Murrell GAC. Restore orthobiologic implant: Not recommended for augmentation of rotator cuff repairs. *J Bone Jt Surg - Ser A.* 2007;89(4):786–91.

Wang S, Wang Y, Song L, Chen J, Ma Y, Chen Y, et al. Decellularized tendon as a prospective scaffold for tendon repair. *Mater Sci Eng C.* Elsevier B.V.; 2017 Aug;77:1290–301.

White WL. Tendon grafts: a consideration of their source, procurement and suitability. *Surg Clin North Am.* Elsevier Masson SAS; 1960;40(2):403–13.

Whitlock PW, Seyler TM, Parks GD, Ornelles DA, Smith TL, Van Dyke ME, et al. A Novel Process for Optimizing Musculoskeletal Allograft Tissue to Improve Safety, Ultrastructural Properties, and Cell Infiltration. *J bone Jt Surg.* 2012 Aug;94(16):1458–67.

Whitlock PW, Smith TL, Poehling GG, Shilt JS, Van Dyke M. A naturally derived, cytocompatible, and architecturally optimized scaffold for tendon and ligament regeneration. *Biomaterials.* 2007;28(29):4321–9.

Wise DM. New technique: AlloDerm® interposition arthroplasty of thumb carpo-metacarpal joint. *J Biomed Eng Informatics.* 2015;2(2):36.

Wollmann LCF de N, Laurindo CAH, da Costa FDA, Moreno AN. Efeito da criopreservação e/ou da descclularização na matriz extracelular de condutos valvados porcinos. *Brazilian J Cardiovasc Surg.* 2011;26(3):490–6.

- Wong I, Burns J, Snyder S. Arthroscopic GraftJacket repair of rotator cuff tears. *J Shoulder Elb Surg.* 2010;19(2 SUPPL.):104–9.
- Wood LK, Brooks S V. Ten weeks of treadmill running decreases stiffness and increases collagen turnover in tendons of old mice. *J Orthop Res.* 2016;34(2):346–53.
- Xie S, Zhou Y, Tang Y, Chen C, Li S, Zhao C, et al. -Book-shaped decellularized tendon matrix scaffold combined with bone marrow mesenchymal stem cells-sheets for repair of achilles tendon defect in rabbit. *J Orthop Res.* 2019;37(4):887–97.
- Xing S, Liu C, Xu B, Chen J, Yin D, Zhang C. Effects of various decellularization methods on histological and biomechanical properties of rabbit tendons. *Exp Ther Med.* 2014;8(2):628–34.
- Youngstrom DW, Barrett JG. Engineering Tendon: Scaffolds, Bioreactors, and Models of Regeneration. *Stem Cells Int.* Hindawi Publishing Corporation; 2016;2016:1–11.
- Zaricznyj B. Reconstruction of the anterior cruciate ligament using free tendon graft. *Am J Sports Med.* 1983 May 23;11(3):164–76.
- Zhang Y, He Y, Bharadwaj S, Hammam N, Carnagey K, Myers R, et al. Tissue-specific extracellular matrix coatings for the promotion of cell proliferation and maintenance of cell phenotype. *Biomaterials.* Elsevier Ltd; 2009;30(23–24):4021–8.



## **APÊNDICES**

## APÊNDICE 1

## Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais



*Comissão de Ética no  
Uso de Animais*

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da reparação do tendão gastrocnêmio em coelhos após reconstrução com células troncos e scaffolds de tendão descelularizado", protocolada sob o CEUA nº 5272080916 (ID 005341), sob a responsabilidade de **Alex de Lima Santos e equipe; Fernando Gonçalves de Almeida; Leticia Siqueira de Sá Barreto** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo (CEUA/UNIFESP) na reunião de 10/03/2017.

We certify that the proposal "", utilizing 34 Rabbits (34 males), protocol number CEUA 5272080916 (ID 005341), under the responsibility of **Alex de Lima Santos and team; Fernando Gonçalves de Almeida; Leticia Siqueira de Sá Barreto** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Sao Paulo (CEUA/UNIFESP) in the meeting of 03/10/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **11/2016** a **10/2019**

Área: **Urologia/cirurgia**

Origem: **Animais provenientes de estabelecimentos comerciais**

Espécie: **Coelhos**

sexo: **Machos**

idade: **90 a 90 dias**

N: **34**

Linhagem: **Nova Zelândia**

Peso: **2000 a 2500 g**

Local do experimento: **CEDEME- UNIFESP**

São Paulo, 04 de março de 2020

Prof. Dra. Monica Levy Andersen  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de São Paulo

Prof. Dra. Daniela Santoro Rosa  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de São Paulo

## APÊNDICE 2

## Aprovação Relatório Parcial da Comissão de Ética no Uso de Animais

*Comissão de Ética no  
Uso de Animais*

São Paulo, 30 de maio de 2018  
CEUA N 5272080916

Ilmo(a). Sr(a).  
Responsável: Alex De Lima Santos  
Área: Urologia/cirurgia

Título da proposta: "Avaliação da reparação do tendão gastrocnêmio em coelhos após reconstrução com células troncos e scaffolds de tendão descelularizado".

**Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UNIFESP** (ID 003671)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** o Relatório Parcial (versão de 29/maio/2018) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "1. Qual o estágio do estudo no momento? Resp: Até o momento ocorreu a finalização do subprojeto I e do subprojeto II. Estamos viabilizando a realização do subprojeto III. 2. Qual o N amostral alocado até o momento? Resp: 16 coelhos nova zelândia. Obs.: O subprojeto I utilizou os mesmos animais do subprojeto II. 3. Por quanto tempo mais o estudo se estenderá? Resp: Até março de 2021 (33meses) conforme programação inicial. 4. Resultados parciais ou totais apresentados em congresso? Resp: Aguardando resposta do Congresso Brasileiro de Cirurgia de Ombro e Cotovelo. 5. Resultados parciais ou totais já publicados? Resp: Cada subprojeto foi submetida a um periódico diferente.No atual momento estamos aguardando resposta das revistas."

Comentário da CEUA: "RELATÓRIO PARCIAL APROVADO".

Profa. Dra. Monica Levy Andersen  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de São Paulo

Profa. Dra. Daniela Santoro Rosa  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de São Paulo

## APÊNDICE 3

## Aprovação Relatório Parcial da Comissão de Ética no Uso de Animais

*Comissão de Ética no  
Uso de Animais*

São Paulo, 02 de março de 2020  
CEUA N 5272080916

Ilmo(a). Sr(a).  
Responsável: Alex De Lima Santos  
Área: Urologia/cirurgia

Título da proposta: "Avaliação da reparação do tendão gastrocnêmio em coelhos após reconstrução com células troncos e scaffolds de tendão descelularizado".

**Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UNIFESP (ID 005079)**

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** o Relatório Parcial (versão de 20/fevereiro/2020) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "1. Qual o estágio do estudo no momento? Resp: Finalizamos o Subprojeto III, que consistia na utilização do scaffold em um modelo experimental "in vivo" 2. Por quanto tempo mais o estudo se estenderá? Resp: O estudo possui previsão de finalização em Março de 2021, conforme previsto no cronograma inicial. 3. Resultados parciais ou totais apresentados em congresso? Resp: Sim. Os resultados foram apresentados no Congresso Brasileiro de Ortopedia e Traumatologia (CBOT-2019) além do Congresso Internacional de Cirurgia do Ombro e Cotovelo (ICSES-2019) 4. Resultados parciais ou totais já publicados? Resp: Resultados foram publicados no JOR (<https://doi.org/10.1002/jor.24182>), e um segundo artigo foi encaminhado para análise em periódico internacional. "

Comentário da CEUA: "Relatório parcial aprovado. Prezado pesquisador, Por gentileza, submeter uma Emenda adequando o cronograma do projeto. "

Profa. Dra. Monica Levy Andersen  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de São Paulo

Profa. Dra. Daniela Santoro Rosa  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de São Paulo

## APÊNDICE 4

## Aprovação da emenda pela Comissão de Ética no Uso de Animais

*Comissão de Ética no  
Uso de Animais*

São Paulo, 14 de outubro de 2020  
CEUA N 5272080916

Ilmo(a). Sr(a).  
Responsável: Alex De Lima Santos  
Área: Urologia/cirurgia

Título da proposta: "Avaliação da reparação do tendão gastrocnêmio em coelhos após reconstrução com células troncos e scaffolds de tendão descelularizado".

**Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UNIFESP** (ID 005950)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 06/outubro/2020) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Segue em anexo a adequação do cronograma. Lembrando que o cronograma não será alterado, estamos apenas adequando ao período de realização do projeto. "

Comentário da CEUA: "EMENDA APROVADA. O início do Projeto estava previsto para 11/2016 com término em 10/2019. A Emenda solicita alteração do término para 03/2021."

Profa. Dra. Monica Levy Andersen  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de São Paulo

Profa. Dra. Daniela Santoro Rosa  
Vice-Cordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de São Paulo

## APÊNDICE 5

### Resultados biomecânicos consolidados

CONTROL										
ID	D (mm)	Espessura (mm)	Asecção (mm <sup>2</sup> )	FMax (N)	Def final (mm)	TMax (Mpa)	Mod (Mpa)	Def relativa	Rigidez (N/mm)	
a	1,85	1,45	2,69	102,99	4,45	38,31	43,09	0,89	23,16	
b	1,70	2,70	4,59	117,38	2,68	25,57	47,71	0,54	43,80	
c	1,25	2,45	3,06	94,43	3,46	30,84	44,57	0,69	27,29	
d	1,75	2,10	3,68	88,96	4,11	24,21	29,45	0,82	21,64	
e	2,00	1,57	3,14	105,90	10,11	33,70	16,67	2,02	10,47	
f	1,90	1,49	2,84	114,53	8,20	40,40	24,64	1,64	13,97	
g	1,60	1,26	2,01	105,10	8,23	52,26	31,75	1,65	12,77	
Media	1,72	1,86	3,14	104,18	5,89	35,04	33,98	1,18	21,87	
Mediana	1,75	1,57	3,06	105,10	4,45	33,70	31,75	0,89	21,64	
Variancia	0,05	0,27	0,57	87,61	7,15	80,35	113,72	0,29	112,44	
desvio padrao	0,25	0,56	0,81	10,11	2,89	9,68	11,52	0,58	11,45	
SCAFFOLD										
h	2,00	4,40	8,80	63,00	2,50	7,16	14,32	0,50	25,20	
i	1,95	3,40	6,63	100,04	10,44	15,09	7,23	2,09	9,58	
j	1,90	2,00	3,80	112,91	4,46	29,71	33,31	0,89	25,32	
k	1,80	2,60	4,68	84,69	5,11	18,10	17,71	1,02	16,57	
l	1,70	2,31	3,92	100,01	3,98	25,51	32,05	0,80	25,13	
m	1,80	2,93	5,27	93,49	4,50	17,74	19,71	0,90	20,78	
n	1,80	1,73	3,12	89,96	4,82	28,83	29,91	0,96	18,66	
o	1,75	2,95	5,16	112,99	3,88	21,88	28,20	0,78	29,12	
p	1,80	2,35	4,23	120,36	5,83	28,45	24,40	1,17	20,64	
q	1,60	2,90	4,64	121,99	6,73	26,29	19,53	1,35	18,13	
r	1,90	2,90	5,51	86,88	5,60	15,77	14,08	1,12	15,51	
s	2,00	2,80	5,60	130,35	4,63	23,28	25,14	0,93	28,15	
t	2,70	2,12	5,73	108,06	3,27	18,87	28,86	0,65	33,05	
Media	1,90	2,72	5,16	101,90	5,06	21,28	22,65	1,01	21,99	
Mediana	1,80	2,80	5,16	100,04	4,63	21,88	24,40	0,93	20,78	
Variancia	0,07	0,43	1,92	314,71	3,53	40,28	58,22	0,14	38,21	
desvio padrao	0,27	0,68	1,44	18,46	1,95	6,61	7,94	0,39	6,43	

## APÊNDICE 6

### Resultados da contagem de núcleos consolidados

<i>Scaffold</i>	ID	Nucleos	área	ID	Nucleos	área	2 sem PO	nucleos	área	ID	8 sem PO	nucleos	área
Scaffold	image 1	45	0,184% 0,184	image 41	139	1,555% 1,555	image 121	70	0,734% 0,734	image 81	184	2,050% 2,050	
	image 2	53	0,249% 0,249	image 42	124	1,360% 1,360	image 122	78	0,661% 0,661	image 82	121	1,148% 1,148	
	image 3	50	0,307% 0,307	image 43	84	0,753% 0,753	image 123	37	0,345% 0,345	image 83	158	1,333% 1,333	
	image 4	51	0,310% 0,310	image 44	228	3,040% 3,040	image 124	39	0,406% 0,406	image 84	124	1,313% 1,313	
	image 5	94	0,605% 0,605	image 45	211	2,621% 2,621	image 125	45	0,327% 0,327	image 85	139	1,178% 1,178	
	image 6	89	0,802% 0,802	image 46	147	1,279% 1,279	image 126	59	0,471% 0,471	image 86	175	1,322% 1,322	
	image 7	63	0,505% 0,505	image 47	139	1,161% 1,161	image 127	80	0,538% 0,538	image 87	212	1,384% 1,384	
	image 8	41	0,193% 0,193	image 48	181	1,392% 1,392	image 128	37	0,361% 0,361	image 88	263	2,881% 2,881	
	image 9	28	0,134% 0,134	image 49	257	1,879% 1,879	image 129	32	0,231% 0,231	image 89	394	4,840% 4,840	
	image 10	70	0,410% 0,410	image 50	153	1,326% 1,326	image 130	11	0,047% 0,047	image 90	156	1,374% 1,374	
	image 11	88	0,506% 0,506	image 51	364	2,826% 2,826	image 131	84	0,975% 0,975	image 91	323	5,819% 5,819	
	image 12	33	0,154% 0,154	image 52	314	3,325% 3,325	image 132	112	1,511% 1,511	image 92	249	4,458% 4,458	
	image 13	73	0,319% 0,319	image 53	234	2,473% 2,473	image 133	14	0,107% 0,107	image 93	249	4,485% 4,485	
	image 14	64	0,313% 0,313	image 54	264	3,361% 3,361	image 134	14	0,035% 0,035	image 94	158	1,811% 1,811	
	image 15	57	0,322% 0,322	image 55	311	2,900% 2,900	image 135	2	0,016% 0,016	image 95	176	1,645% 1,645	
	image 16	40	0,155% 0,155	image 56	349	3,189% 3,189	image 136	16	0,074% 0,074	image 96	79	0,515% 0,515	
	image 17	51	0,196% 0,196	image 57	376	3,017% 3,017	image 137	196	1,957% 1,957	image 97	89	0,538% 0,538	
	image 18	47	0,221% 0,221	image 58	400	3,628% 3,628	image 138	192	1,544% 1,544	image 98	65	0,617% 0,617	
	image 19	75	0,354% 0,354	image 59	418	3,902% 3,902	image 139	41	0,133% 0,133	image 99	232	3,245% 3,245	
	image 20	68	0,288% 0,288	image 60	307	3,852% 3,852	image 140	141	1,075% 1,075	image 100	232	3,153% 3,153	
	image 21	21	0,087% 0,087	image 61	196	1,660% 1,660	image 141	131	1,811% 1,811	image 101	23	0,246% 0,246	
	image 22	24	0,090% 0,090	image 62	172	1,564% 1,564	image 142	8	0,025% 0,025	image 102	8	0,101% 0,101	
	image 23	23	0,093% 0,093	image 63	138	1,390% 1,390	image 143	13	0,072% 0,072	image 103	51	0,349% 0,349	
	image 24	96	0,473% 0,473	image 64	185	1,685% 1,685	image 144	75	0,667% 0,667	image 104	188	2,722% 2,722	
	image 25	87	0,426% 0,426	image 65	189	1,934% 1,934	image 145	36	0,379% 0,379	image 105	143	1,939% 1,939	
	image 26	84	0,404% 0,404	image 66	342	3,851% 3,851	image 146	31	0,368% 0,368	image 106	11	0,032% 0,032	
	image 27	38	0,197% 0,197	image 67	265	3,374% 3,374	image 147	117	1,658% 1,658	image 107	59	0,533% 0,533	
	image 28	76	0,344% 0,344	image 68	280	3,322% 3,322	image 148	90	1,345% 1,345	image 108	111	1,757% 1,757	
	image 29	70	0,317% 0,317	image 69	246	3,472% 3,472	image 149	15	0,106% 0,106	image 109	153	1,639% 1,639	
	image 30	7	0,033% 0,033	image 70	183	3,211% 3,211	image 150	17	0,063% 0,063	image 110	75	0,762% 0,762	
	image 31	27	0,420% 0,420	image 71	283	4,628% 4,628	image 152	19	0,241% 0,241	image 111	98	1,049% 1,049	
	image 32	28	0,186% 0,186	image 72	245	2,947% 2,947	image 153	22	0,313% 0,313	image 112	102	1,212% 1,212	
	image 33	58	0,639% 0,639	image 73	203	1,816% 1,816	image 154	59	0,620% 0,620	image 113	124	2,264% 2,264	
	image 34	43	0,415% 0,415	image 74	121	1,180% 1,180	image 155	29	0,290% 0,290	image 114	116	1,481% 1,481	
	image 35	41	0,479% 0,479	image 75	301	3,580% 3,580	image 156	12	0,054% 0,054	image 115	194	2,476% 2,476	
	image 36	29	0,123% 0,123	image 76	349	3,630% 3,630	image 157	61	0,391% 0,391	image 116	142	0,970% 0,970	
	image 37	14	0,050% 0,050	image 77	366	3,558% 3,558	image 158	13	0,059% 0,059	image 117	126	1,176% 1,176	
	image 38	26	0,113% 0,113	image 78	423	4,995% 4,995	image 159	138	1,239% 1,239	image 118	170	2,340% 2,340	
	image 39	24	0,190% 0,190	image 79	308	3,393% 3,393	image 160	109	0,776% 0,776	image 119	216	3,032% 3,032	
	image 40	22	0,102% 0,102	image 80	159	1,108% 1,108	image 161	21	0,284% 0,284	image 120	59	0,616% 0,616	

**ANEXOS**



## ANEXO 1

## Seleção para os melhores trabalhos do 51º Congresso Brasileiro de Ortopedia e Traumatologia



Prezado colega Alex de Lima Santos

O trabalho abaixo foi aprovado pela Comissão Científica do 51º Congresso Brasileiro de Ortopedia e Traumatologia, para ser apresentado oralmente, na **SESSÃO DE TEMAS LIVRES**, conforme as regras do regulamento publicado:

Número do trabalho: 4439

Tipo de apresentação: APRESENTAÇÃO ORAL

Título do trabalho: The development and evaluation of a decellularized tendon scaffold

Subspecialidade do trabalho: CIENCIA BÁSICA

**Informamos que o mesmo foi também um dos trabalhos melhores avaliados e está concorrendo ao prêmio na categoria Estudo Experimental.**

A Comissão de Educação Continuada – CEC, irá assistir a todas as apresentações dos trabalhos que estão concorrendo ao prêmio e o resultado será divulgado presencialmente na cerimônia de encerramento do Congresso.

**É indicado que um dos autores do trabalho esteja presente no momento da premiação.**

Novamente agradecemos e o parabenizamos pelo excelente trabalho enviado.

A Comissão Científica e a Comissão de Temas Livres estão a disposição para quaisquer esclarecimentos necessários, através do telefone (11) 2137-5400 ou e-mail: [cbot@sbot.org.br](mailto:cbot@sbot.org.br)

Atenciosamente,

**Adrian Piratello**

Eventos SBOT

Telefone: +55 11 2137-5427

Whats App: +55 11 97660-9318

Site: [www.sbot.org.br](http://www.sbot.org.br)



## ANEXO 2

## Capa da publicação na BMC Musculoskeletal Disorders

de Lima Santos et al. *BMC Musculoskeletal Disorders* (2020) 21:689  
<https://doi.org/10.1186/s12891-020-03680-w>

BMC Musculoskeletal  
Disorders

## RESEARCH ARTICLE

## Open Access

## A new decellularized tendon scaffold for rotator cuff tears – evaluation in rabbits



Alex de Lima Santos<sup>1\*</sup>, Camila Gonzaga da Silva<sup>2</sup>, Leticia Siqueira de Sá Barreto<sup>2</sup>, Katia Ramos Moreira Leite<sup>3</sup>, Marcel Jun Sugawara Tamaoki<sup>1</sup>, Lydia Massako Ferreira<sup>4</sup>, Fernando Gonçalves de Almeida<sup>2</sup> and Flavio Faloppa<sup>1</sup>

### Abstract

**Background:** Scaffolds have considerably advanced in recent years. In orthopaedic surgery, scaffolds have been used as grafts in procedures involving tendon and ligament reconstruction. This paper aimed to produce and evaluate decellularized tendon scaffolds (DTSs) from biomechanical, microscopic, macroscopic and in vivo perspectives.

**Methods:** Bilateral gastrocnemius muscle tendons from 18 adult New Zealand rabbits were collected. Of these 36 tendons, 11 were used as controls (Group A - control), and 25 were used in the decellularization protocol (Group B - DTS). The groups were subjected to histological, biomechanical and macroscopic analyses, and Group B - DTS was subjected to an additional in vivo evaluation. In the decellularization protocol, we used a combination of aprotinin, ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), sodium dodecyl sulfate (SDS) and *n*-octyl-phenoxypolyethoxyethanol (Triton X-100) for six days. During this period, the scaffolds were kept at room temperature on an orbital shaker with constant motion.

**Results:** The DTSs showed an increased cross-sectional area and inter-fascicular distance and no change in parallelism or matrix organization. The nuclear material was not organized in the DTSs as it was in the control. In the biomechanical analysis, no significant differences were found between the groups after analysing the ultimate tensile load, stiffness, and elongation at the ultimate tensile load. During the in vivo evaluation, mononuclear cell infiltration was noted.

**Conclusions:** The evaluated decellularization protocol generated a tendon scaffold, maintained the most important biomechanical characteristics and permitted cell infiltration.

**Keywords:** Scaffold, Tissue engineering, Extracellular matrix, Decellularization, Tendon

### Background

Rotator cuff tears are a common cause of shoulder disability and are normally associated with weakness, loss of motion, debilitating pain and a reduced capacity for daily activities [1]. Treatment ranges from “wait-and-see” approaches to surgery. Typically, the treatment is selected according to the patient characteristics, tear size and symptoms [2, 3]. In patients with large and massive rotator cuff tears submitted for surgical treatment, the

clinical results and healing process are inferior to those following surgical repairs of small lesions [4, 5].

An alternative by which to achieve better surgical results for massive rotator cuff tears is the use of tissue-engineered tendons, and current research has shown that scaffolds are a reliable alternative that can be used similarly to tissue-engineered tendons [6, 7]. An ideal scaffold for tendon disorders and rotator cuff tears should be (a) three-dimensional in structure with high porosity; (b) devoid of cellular material to minimize the inflammatory potential, disease transmission, and host immune response; (c) cytocompatible; and (d) of sufficient biomechanical capacity to withstand rehabilitation until complete remodelling has occurred [8, 9].

\* Correspondence: [alexidsb@gmail.com](mailto:alexidsb@gmail.com)

<sup>1</sup>Department of Orthopedic and Traumatology, IPM - Federal University from São Paulo, 715 Napoleão de Barros, São Paulo, SP 04038-000, Brazil  
 Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2020 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.