

# **AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO TENDÃO DO MÚSCULO GASTROCNÊMIO DE COELHOS APÓS LESÃO EXPERIMENTAL E PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE ISOLAMENTO E CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS: RESULTADOS PRELIMINARES**

Paulo José Bastos Queiroz<sup>1</sup>; Luiz Antônio Franco da Silva<sup>2</sup>; Benito Juarez Nunes Alves de Oliveira<sup>3</sup>; Luiz Augusto de Souza<sup>3</sup>; Damila Batista Caetano<sup>4</sup>;  
Lucas Alves Rodrigues Martins<sup>4</sup>;

<sup>1</sup>Escola de Veterinária e Zootecnia, EVZ/UFG, Goiânia, GO. email: paulo\_pj0109@hotmail.com

Palavras-chave: lesão tendínea, colágeno, medula óssea, terapia celular

## **INTRODUÇÃO**

Os tendões têm como função transferir a força biomecânica dos músculos para os ossos, promovendo a movimentação do esqueleto (SMITH & WEBBON, 1996). Algumas lesões tendíneas são importantes e envolvem a secção parcial ou total por objetos cortantes. Caso ocorra ruptura do tendão calcâneo comum ou flexores digitais, o problema resulta em alteração postural grave que poderá ser de difícil correção, sendo frequentemente observada em cães (VAUGHAN, 1980), equinos (GOODSHIP, 1993) e no homem (NYSTRON & HOLMLUND, 1983). A reparação tendínea e o restabelecimento morfofuncional dos tendões dependem de fatores intrínsecos e extrínsecos, como vascularização, migração e adesão celular, além das manobras operatórias e da terapia utilizada (GOODSHIP et al., 1985).

Apesar de vários métodos de tratamento de lesões tendinosas já terem sido testados, ainda se faz necessário o desenvolvimento de métodos que permitam o retorno morfológico e funcional do tendão (GOODSHIP et al., 1985). Nesse contexto, a terapia celular descreve um conjunto de limites, pouco precisos, de métodos e abordagens tecnológicas que visam à utilização de células para o tratamento de doenças. O principal foco atual de interesse da terapia celular é a medicina regenerativa, a qual busca a substituição de células ou tecidos lesados de forma a restaurar sua função. Dessa forma, a terapia celular procura utilizar

<sup>1</sup>Orientando. Graduação em Medicina Veterinária, EVZ/UFG. email: paulo\_pj0109@hotmail.com *Revisado pelo orientador.*

<sup>2</sup>Orientador. Departamento de Patologia, Clínica e Cirurgia Animal. EVZ/UFG.

<sup>3</sup>Doutorando em Ciência Animal. Bolsista do CNPq.

<sup>4</sup>Graduação em Medicina Veterinária, EVZ/UFG.

células-tronco, dirigindo sua diferenciação no sentido de um tecido específico, para repor ou reparar células lesadas ou destruídas (LEVEMBERG et al., 2003).

As células-tronco mesenquimais (CTMs) têm sido isoladas da medula óssea (MO) de diversas espécies, incluindo roedores (SIMMONS et al., 1991), humanos (PITTENGER et al., 1999), gatos (MARTIN et al., 2002) e cães (HUSS et al., 1995). Elas apresentam como principal característica, capacidade de renovação e diferenciação em diversas linhagens de tecidos como conjuntivo, ósseo, cartilaginoso, adiposo, tendíneo e muscular (CAMPAGNOLI et al., 2001). Portanto, os aspirados da MO contêm CTMs e células já diferenciadas em linhagens específicas, bem como algumas proteínas bioativas que estimulam a regeneração (KRAUS & KIRKER-HEAD, 2006). Além disso, têm demonstrado ser uma atrativa fonte celular para reparação tecidual, devido à facilidade de seu isolamento e expansão de aspirados de MO em adultos, bem como à versatilidade na diferenciação pluripotente em tecidos mesenquimais (MAUNEY et al., 2005).

Apesar da importância dessas células, seu mecanismo de ação em determinadas situações ainda foi pouco estudado. Como o tratamento das desordens nos tendões e ligamentos, tradicionalmente, envolve a redução da inflamação, restauração da sua flexibilidade e sua reparação cirúrgica (AHMAD et al., 2000), muitos materiais vêm sendo utilizados na reconstrução tendínea, como os biomateriais absorvíveis, autoenxertos, aloenxertos e xenoenxertos, cada qual com resultados de eficácia variáveis (KATO et al., 1991; DUNN et al., 1992; BADYLAK et al., 1995; LOUIE et al., 1997). Conseqüentemente, é muito provável que as células-tronco apresentem resultados favoráveis no reparo de tendões, representando, portanto um avanço no processo de reparação dessa modalidade tecidual.

Por último, fazendo uma análise geral de protocolos terapêuticos empregando terapia celular e considerando o fato de as CTMs apresentarem elevado potencial regenerador e serem facilmente isoladas da MO, a sua utilização como fonte terapêutica em lesões tendíneas merece ser melhor compreendida. Acrescenta-se sobre este assunto, que existe uma clara escassez de trabalhos científicos referendando essas suposições. Mas, sem dúvida, ao ser compreendido o mecanismo de ação de tais células e comprovar sua eficácia no tratamento de lesões tendíneas, o protocolo terapêutico poderá ser usado no homem e em diferentes espécies animais.

## **OBJETIVOS**

O presente estudo tem como objetivo padronizar a técnica de cultivo de CTMs e realizar a avaliação histológica do tendão do músculo gastrocnêmio de coelhos após lesão experimental.

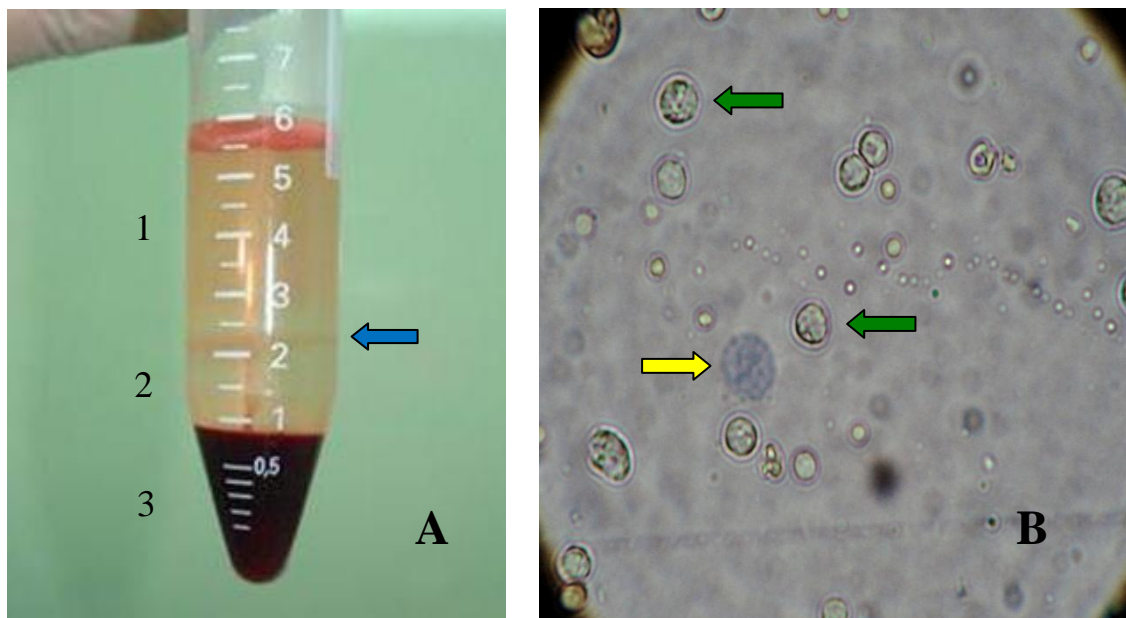
## **METODOLOGIA**

O trabalho teve início após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFG, sob o protocolo nº220/09. Foram selecionados aleatoriamente 48 coelhos, machos, da raça Nova Zelândia, pesando em média 3,5 kg, para serem submetidos ao procedimento cirúrgico de tenotomia parcial do tendão do músculo gastrocnêmio e posterior inoculação de CTMs alógenas cultivadas da MO, associadas ou não ao PuraMatrix<sup>®</sup> hidrogel. Esses foram distribuídos em quatro grupos, cada qual contendo 12 animais: o grupo controle (C) foi submetido apenas a tenotomia parcial do tendão do músculo gastrocnêmio; grupo GI que, após tenotomia parcial, recebeu a inoculação no local da lesão de  $1 \times 10^5$  CTMs cultivadas; o grupo GII foi submetido ao implante do PuraMatrix<sup>®</sup> hidrogel e o grupo GIII foi realizada a inoculação de  $1 \times 10^5$  CTMs associada ao PuraMatrix<sup>®</sup> hidrogel. No presente estudo procedeu-se apenas a padronização da técnica de cultivo celular e dos exames histológicos, ficando os grupos GI, GII e GIII para avaliação posterior. Portanto, o emprego das CTMs, do PuraMatrix<sup>®</sup> hidrogel e as demais avaliações ocorrerão nas próximas etapas.

Nessa etapa aqui desenvolvida, foi utilizado apenas um coelho para a realização da colheita de MO do úmero. Para tanto, administrou-se como medicação anestésica cetamina (30mg/kg) e xilazina (5mg/kg), por via intramuscular, em dose única. Após tricotomia e anti-sepsia preconizada, uma agulha metálica de Rosenthal 16G foi introduzida na epífise proximal do tubérculo umeral, sendo aspirados 8mL de MO empregando uma seringa de 10mL contendo solução heparinizada (1:500). A amostra foi então homogeneizada e encaminhada ao Laboratório de Biologia Molecular e Citogenética da Universidade Federal de Goiás, para isolamento e cultura de CTMs.

A amostra de MO foi acondicionada em quatro tubos Falcon 15mL, cada qual contendo 2mL e diluídos (vol/vol, 1:1) em solução salina tamponada (PBS) acrescida de soro fetal bovino (SFB) a 10% e 10Mm EDTA (RoboSep, StemCell<sup>®</sup>, Vancouver, Canadá). Posteriormente, as amostras foram lentamente depositadas sobre 2mL do gradiente de densidade Ficoll-Paque<sup>®</sup> PLUS 1.077 g/mL (AmershamBiosciences, São Paulo, SP),

conforme recomendado em estudos de BOYÚM (1968). O sangue e o gradiente ficoll foram centrifugados a 495 x g por 30 minutos a 15°C e a fração de células mononucleares (CMNs) coletadas com pipeta de Pasteur na interface entre o plasma e o ficoll (Figura 1A). Duas lavagens do sedimento celular foram realizadas com 10 mL de PBS, e uma terceira lavagem com 10mL de meio de cultivo Mesencult humano suplementado com soro fetal bovino a 10% (StemCells®). Em todas as lavagens se realizou centrifugação a 493 x g por 10 minutos a 4°C. Uma alíquota de 10µL da suspensão celular foi diluída a 10µL do corante azul de trypan a 4 % para obtenção dos valores de rendimento e viabilidade das CMNs. Essa suspensão foi depositada na câmara hemocitométrica de Neubauer para contagem das células viáveis e inviáveis utilizando microscópio óptico (Figura 1B).



**FIGURA 1** -(A) Amostra de aspirado de medula óssea de coelhos após a separação por gradiente de densidade Ficoll-paque. Notar o anel celular (seta azul) situado entre o plasma (1) e o ficoll (2), formando um sedimento de eritrócitos e polimorfonucleares no fundo do tubo falcon (3). (B) Avaliação do rendimento e viabilidade de CMNs em câmara de Neubauer, demonstrando as células viáveis (setas verdes) e células inviáveis com citoplasma corado com azul de tripan (seta amarela). Microscopia óptica (aumento 100x).

As CTMs foram obtidas da fração de células mononucleares pela depleção negativa das células hematopoiéticas, utilizando o anticorpo monoclonal CD45 de camundongo anti-coelho, complexo tetramérico e nanopartículas magnéticas, preparadas conforme a recomendação do fabricante (EasySep, StemCell®, Vancouver, Canadá). Inicialmente, foi adicionado as células IgG1 de camundongo à 5%, permanecendo em repouso durante cinco minutos. Em seguida, foi adicionado 20µL do anticorpo CD45, com repouso de 15 minutos, sendo adicionado 20µL das nanopartículas magnéticas. A amostra de células foi acondicionada em tubos de poliestireno (BD® Biosciences, São Paulo, SP) e acrescida solução de PBS suplementada SFB e EDTA, até que atingisse o volume final de 2,5mL. O tubo foi inserido na base magnética para seleção negativa das CTMs, permanecendo em repouso durante dez minutos (Figura 2A). A seguir, esse tubo foi evertido e as CTMs depositadas em um tubo falcon de 15 mL. Uma nova contagem celular foi realizada em câmara de Neubauer para avaliar o rendimento e viabilidade, após a seleção negativa por nanopartículas magnéticas.

As CTMs foram cultivadas em garrafas de cultura de tecidos de 75 cm<sup>3</sup>, imersas em meio de cultivo MesenCult humano suplementado com SFB a 10%, gentamicina e anfotericina B (Figura 2B). A primeira passagem foi realizada no quinto dia, após as células atingirem uma confluência de ±80-90%, sendo procedidas novas passagens com troca do meio de cultura a cada dois dias. Após 16 dias do início do cultivo, as células foram suspendidas com solução de tripsina a 0,25mg/mL e contadas em câmara de Neubauer para ajuste da quantidade de CTMs a serem inoculadas nos tendões.

Para padronização da avaliação histológica dos tendões operaram-se dois coelhos. No primeiro, realizou-se apenas a lesão experimental e no segundo realizou-se a lesão e inoculou-se CTMs. Como protocolo anestésico, foram administrados os mesmos fármacos utilizados para colheita de MO. Com o animal em decúbito lateral, realizou-se uma incisão de 2 cm na pele da região do tendão calcâneo comum, seguida de divulsão do tendão calcâneo comum, abertura da bainha tendínea e exposição do tendão do músculo gastrocnêmio. Com auxílio de lâmina de bisturi nº 15, foi realizada uma lesão parcial de 1 cm no tendão do músculo gastrocnêmio, seguida da síntese da bainha tendínea e da pele com fio de náilon nº 4-0 em sutura padrão simples isolados. Logo após a oclusão da bainha, foi realizada a inoculação das CTMs cultivadas no local da tenotomia. Na analgesia pós-operatória, foi administrado o cloridrato de tramadol (3mg/kg), por via subcutânea, durante três dias.



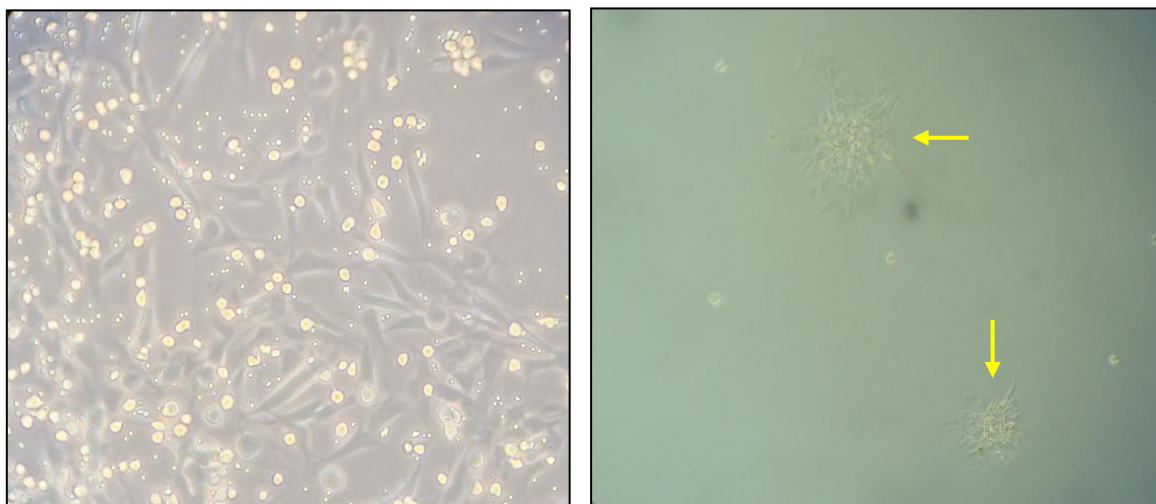
**FIGURA 2– (A)** Base magnética para purificação e seleção das CTMs da MO de coelho. **(B)** Garrafas de 75cm<sup>3</sup> utilizada na cultura das CTMs, essas imersas em meio MesenCult.

As amostras dos tendões do músculo gastrocnêmio foram fixadas em formalina tamponada a 10% e descalcificadas em ácido nítrico a 5%. Foram preparadas secções transversais de 5µm e coradas com hematoxilina-eosina (H&E). As principais alterações avaliadas foram quanto à morfologia das células formadas no local da tenotomia, sua semelhança às células do tecido normal, bem como a disposição das fibras colágenas e da qualidade da matriz tendíneoformadas.

Os resultados de rendimento e viabilidade celular obtidos durante o processo de isolamento das CTMs foram avaliados por estatística de tendência central (média aritmética).

## RESULTADOS

O processo de isolamento celular com nanopartículas magnéticas foi objetivo e rápido, obtendo-se as células desejáveis no período de uma hora após o isolamento das Células-Tronco Mononucleares (CTM). Observou-se contaminação do cultivo celular em quatro ensaios pilotos, porém, a cultura primária de CTMs da MO foi obtida com êxito pela observação da aderência e proliferação das CTMs no fundo da placa (Figura 3A), bem como a formação de unidades formadoras de colônias fibroblásticas (UFC-F) (Figura 3B).



**FIGURA 3** – Fotomicroscopia de células-tronco mesenquimais (CTMs) isoladas da medula óssea de coelhos, apresentando formato filamentoso semelhante a fibroblastos e com núcleos arredondados (A). As setas amarela indicam as unidades formadoras de colônias fibroblásticas (UFC-F) (B).

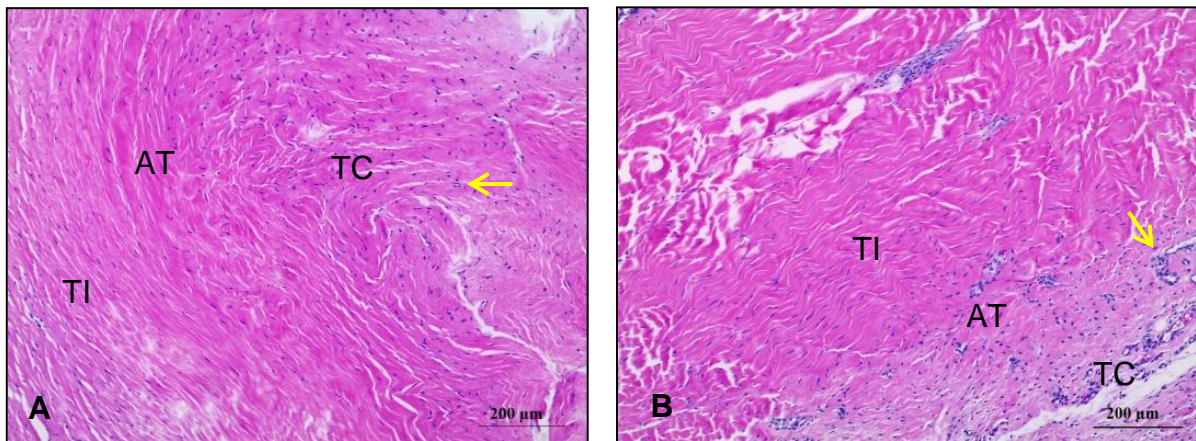
Os resultados de rendimento e viabilidade das células da fração mononuclear e das CTMs, averiguadas por contagem em câmara de Neubauer, estão expressos na tabela 1.

**TABELA 1** – Rendimento e viabilidade da fração de células mononucleares e células-tronco mesenquimais isoladas da medula óssea de coelhos.

Amostras	Células mononucleares (CNMs)		Células-tronco mesenquimais (CTMs)	
	Rendimento (cél./mL) x 10 <sup>6</sup>	Viabilidade (%)	Rendimento (cél./mL x 10 <sup>6</sup> )	Viabilidade (%)
1	7,04	98,05	5,00	97,20
2	13,00	96,74	3,77	96,15
3	13,70	95,32	1,50	96,77
4	3,72	99,46	2,22	99,10
5	9,22	98,71	3,45	98,57
6	3,20	94,67	0,22	100
7	1,06	96,36	1,16	98,30
8	6,88	98,00	1,32	100
9	8,16	96,91	1,42	95,94
10	7,12	97,26	2,70	95,74
<b>Média</b>	7,31	97,15	2,28	97,77

Nesse estudo, observou-se rendimento médio de 7,31 e 2,28 x 10<sup>6</sup> células/mL de CMNs e CTMs respectivamente, e esses resultados confirmam que as CTMs representam aproximadamente 30% do total de CMNs.

No grupo controle aos 45 e 90 dias, os cortes oblíquos dos tendões corados com H&E revelaram a presença de um tecido pobre em células e fibras colágenas organizadas, constituindo a porção íntegra do tendão. Já na área de cicatrização, observou-se um tecido rico em células, porém com fibras colágenas menos organizadas (Figura 3A e B).



**FIGURA 3**–Fotomicrografia dos tendões do grupo controle. Observa-se a área de transição (AT) entre o tecido íntegro (TI) e o tecido cicatricial (TC), este último composto de alta celularidade (seta amarela) e fibras colágenas desorganizadas (A e B).

## DISCUSSÃO

Nesse experimento, observou-se que o processo de isolamento por seleção magnética das CTMs demonstrou-se eficaz na purificação da fração de células mononucleares, essas averiguadas pelo rendimento celular em câmara de Neubauer. A depleção negativa com o anticorpo monoclonal CD45 permitiu a separação das células-tronco hematopoiéticas e mesenquimais, sendo esta últimas adicionadas em meio MesenCult para expansão celular. ITO et al., (2004) avaliaram a seleção e isolamento de CTMs da MO de humanos com nanopartículas magnéticas de  $Fe_4O_3$ , essas positivas para CD34 e negativas para CD45. Estes observaram que, no início da cultura celular, ocorreu aumento nas ligações CTMs com as nanopartículas de  $Fe_4O_3$ , atingindo o pico máximo nas primeiras quatro horas de cultivo. Esse período foi atribuído como ideal para isolamento das CTMs da MO.

Tanto na morfologia celular quanto no tempo de observação da UFC-F, mesmo utilizando o meio de cultivo MesenCult, os resultados deste estudo foram semelhante ao de BITTENCOURT et al., (2005), que realizaram o cultivo de CTMs coletadas da MO de camundongos em meio Knockout DMEM, e observaram a formação de colônias de células



com morfologia fibroblastóide após 72 horas de cultivo, sendo no terceiro dia observado a formação de UFC-F.

Já em um estudo utilizando CMNs da MO de coelhos no reparo de lesões osteocondrais, OLIVEIRA, (2009) encontrou rendimentos médios de  $6,25 \times 10^6$  células/mL e viabilidade de 93,56% utilizando o mesmo protocolo de isolamento celular MO. Portanto, os resultados apresentados no presente estudo foram superiores aos dos referidos autores, porém, as CMNs foram obtidas a partir de uma amostra de 2 mL de MO.

Quanto ao aumento da celularidade na área de reparação tecidual os achados do presente estudo foram semelhantes aos de JUNCOSA-MELVIN et al., (2006). Os autores não informaram sobre a organização das fibras colágenas, sendo relatada apenas a presença de uma coloração imunoistoquímica mais forte das fibras colágenas tipo III e V, em relação às fibras do tendão normal. Os autores obtiveram em seu grupo controle aos 84 dias, no qual foi utilizada apenas a esponja de colágeno-gel, cortes histológicos corados com H&E que revelaram a presença de um moderado alinhamento celular e um leve aumento na celularidade na área de cicatrização.

Ainda considerando os resultados aqui obtidos aos 45 e 90 dias, em especial os achados referentes ao grupo controle, verificou-se que os cortes oblíquos dos tendões corados com H&E revelaram a presença de um tecido com fibras colágenas organizadas e pobre em células, caracterizando a porção íntegra do tendão. O tecido rico em células, porém com fibras colágenas menos organizadas identificado na área de cicatrização, indica que para processo de reparo tecidual ocorrer de forma completa, de modo que a área lesionada retome o aspecto histológico da porção íntegra do tendão, é necessário associá-lo a protocolos terapêuticos. Em outro estudo realizado por JUNCOSA-MELVIN et al., (2005), no qual foi utilizado biomateriais com diferentes proporções de colágeno preenchidos com CTMs no reparo de lesões do tendão de Aquiles de coelhos, obteve-se aos 84 dias, cortes histológicos corados com H&E que também mostraram aumento na celularidade na área de cicatrização.

Finalizando, pode-se inferir que mesmo havendo formação de um tecido cicatricial rico em células, porém com fibras colágenas menos organizadas, para que o processo ocorra em sua plenitude são necessários métodos terapêuticos auxiliares conforme citado por GOODSHIP et al., (1985) Assim, apesar de haver um preenchimento celular satisfatório na área lesionada, o tecido de reparação pode não apresentar a mesma eficiência biomecânica do tendão normal, visto que suas fibras colágenas são menos organizadas.

Portanto, para consolidação desse método terapêutico é necessário concluir o presente estudo, principalmente quanto a análise da eficiência das CTMs e do PuraMatrix<sup>®</sup> hidrogel no reparo de lesões tendíneas.

## CONCLUSÃO/CONSIDERAÇÕES FINAIS

Atualmente, o estabelecimento de um cultivo primário de CTMs é dependente de diversos fatores como o alto rendimento de células isoladas, a utilização de meios de cultivo apropriados, eliminação de fontes de contaminação, entre outros. Apesar da ocorrência de contaminações nas amostras piloto, concluiu-se que os protocolos de isolamento e cultivo celular adotados nesse experimento foram eficazes, obtendo-se como resultado final a expansão das CTMs em cultura. Contudo, acredita-se que uma criteriosa padronização laboratorial desses protocolos devem ser previamente estabelecida.

Foi observado que após 45 e 90 dias da realização da tenotomia parcial do tendão do músculo gastrocnêmio, houve formação de um tecido cicatricial rico em células, porém com fibras colágenas menos organizadas. Portanto, houve um preenchimento celular satisfatório na área lesionada, entretanto este tecido de reparação pode não apresentar a mesma eficiência biomecânica do tendão normal, visto que suas fibras colágenas são menos organizadas. Portanto, é necessária a conclusão deste estudo, para que se possa analisar a eficiência das CTMs e do PuraMatrix<sup>®</sup> hidrogel no reparo de lesões tendíneas.

## REFERÊNCIAS

AHMAD, C.S.; STEIN, B.E.; MATUZ, D.; HENRY, J.H. Immediate surgical repair of the medial patellar stabilizers for acute patellar dislocation. A review of eight cases. **The American Journal of Sports Medicine**, Baltimore, v.28, n.6, p.804-810, 2000.

BITTENCOURT, R. A. C.; PEREIRA, R. H.; FELISBINO, S. L.; MURADOR, P.; DE OLIVEIRA, A. P. E.; DEFFUNE, E. Isolamento de células-tronco mesenquimais da medula óssea. **Acta Ortopédica Brasileira**, São Paulo, v.14, n.1, p.22-24, 2006.

BOYÛM, A. Isolation of leukocytes from human blood. Further observations. Methylcellulose, dextran, and ficoll as erythrocyte aggregating agents. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, Oslo, v.97, p.31-50, 1968.

CAMPAGNOLI, C.; ROBERTS, A.G.; KUMAR, S.; BENNETT, P.R.; BELLANTUONO, I.; FISK, N.M. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. **Blood**, Washington, v.98, n.8, p.2396-2402, 2001.

DUNN, M.G.; TRIA, A.J.; KATO, Y.P.; BECHLER, J. R.; OCHNER, R.S.; ZAWADSKY, J.P.; SILVER, F.H. Anterior cruciate ligament reconstruction using a composite collagenous prosthesis. A biomechanical and histologic study in rabbits. **The American Journal of Sports Medicine**, Baltimore, v.20, n.5, p.507-515, 1992.

GOODSHIP, A.E. The pathophysiology of flexor tendon injury in the horse. **Equine Veterinary Journal**, Cambridgeshire, v.5, p.23-29, 1993.

GOODSHIP, A.E.; WILCOCK, S.A.; SHAH, J.S. The development of tissue around various prosthetic implants used as replacements for ligaments and tendons. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Philadelphia, v.196, p.61-68, 1985.

HUSS, R.; HOY, C.A.; DEEG, H.J. Contact and growth factor-dependent survival in a canine marrow-derived stromal cell line. **Blood**, Washington, v.85, n.9, p.2414-2421, 1995.

ITO, A.; HIBINO, E.; HONDA, H.; HATA K.; KAGAMI, H.; UEDA, M.; KOBAYASHI, T. A new methodology of mesenchymal stem cell expansion using magnetic nanoparticles. **Biochemical Engineering Journal**, Manchester, v.20, n.2-3, p.119-125, 2004.

JUNCOSA-MELVIN, N.; BOIVIN, G. P.; GALLOWAY, M. T.; GOOCH, C.; WEST, J. R.; SKLENKA A. M.; BUTLER, D. L. Effects of Cell-to-Collagen Ratio in Mesenchymal Stem Cell-Seeded Implants on Tendon Repair Biomechanics and Histology. **Tissue Engineering**, New York, v.11, n. 3/4, p. 448-457, 2005

JUNCOSA-MELVIN, N.; BOIVIN, G. P.; GOOCH, C.; GALLOWAY, M. T.; WEST, J. R.; DUNN, M. G.; BUTLER, D.L. The Effect of Autologous Mesenchymal Stem Cells on the Biomechanics and Histology of Gel-Collagen Sponge Constructs Used for Rabbit Patellar Tendon Repair. **Tissue Engineering**, New York, v. 12, n. 2, p. 369-379, 2006

KATO, Y.P.; DUNN, M.G.; ZAWADSKY, J.P.; TRIA, A.J.; SILVER, F.H. Regeneration of Achilles tendon with a collagen tendon prosthesis. Results of a one-year implantation study. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, Massachusetts, v.73, n.4, p.561-574, 1991.  
KRAUS, K.H.; KIRKER-HEAD, C. Mesenchymal stem cells and bone regeneration. **Veterinary Surgery**, Philadelphia, v.35, n.3, p.232-242, 2006.

LEVENBERG, S.; HUANG, N.F.; ROGERS, A.B.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; LANGER, R. Differentiation of human embryonic stem cells on threedimensional polymer scaffolds. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v.10, n.22, 2003.

LOUIE, L.K.; YANNA, I.V.; HSU, H.P.; SPECTOR, M. Healing of tendon defects implanted with a porous collagen- GAG matrix: histological evaluation. **Tissue Engineering**, New York, v.3, n.2, p.187-195, 1997.

MARTIN, D.R.; COX, N.R.; HATHCOCK, T.L.; NIEMEYER, G.P.; BAKER, H.J. Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. **Experimental Hematology**, Washington, v.30, n.8, p.879-886, 2002.

MAUNEY, J.R.; VOLLOCH, V.; KAPLAN, D.L. Role of adult mesenchymal stem cells in bone tissue-engineering applications: current status and future prospects. **Tissue Engineering**, New York, v.11, n.5-6, p.787-802, 2005.

NYSTROM, B.; HOLMLUND, D. Experimental evaluation of immobilization in operative and nonoperative treatment of achilles tendon. A radiographic study in the rabbit. **Acta Chirurgica Scandinavica**, Stockholm, v.149, n.7, p.669-673, 1983.

PITTENGER, M.F.; MACKAY, A.M.; BECK, S.C.; JAISWAL, R.K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J.D.; MOORMAN, M.A.; SIMONETTI, D.W.; CRAIG, S.; MARSHAK, D.R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, Pennsylvania, v.284, n.5411, p.143-147, 1999.

SIMMONS, D.J.; SEITZ, P.; KIDDER, L.; KLEIN, G.L.; WAELTZ, M.; GUNDBERG, C.M.; TABUCHI, C.; YANG, C.; ZHANG, R.W. Partial characterization of rat marrow stromal cells. **Calcified Tissue International**, New York, v.48, n.5, p.326-334, 1991.

SMITH, R.K.W.; WEBBON, P.M. The physiology of normal tendon and ligament. In: **Dubai International Equine Symposium**, p.55-81, 1996.

VAUGHAN, L.C. Tendon injuries in dogs. **California Veterinary**, Nevada, v.1, p.15-19, 1980.