

RODRIGO SOUSA MACEDO

**Análise do perfil morfológico e molecular da matriz extracelular no
tendão tibial posterior em fetos humanos de diferentes idades
gestacionais**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Ciências do Sistema Musculoesquelético

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Leme Godoy dos Santos

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 13 de outubro de 2011. A versão original
está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2023

RODRIGO SOUSA MACEDO

**Análise do perfil morfológico e molecular da matriz extracelular no
tendão tibial posterior em fetos humanos de diferentes idades
gestacionais**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Ciências do Sistema Musculoesquelético

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Leme Godoy dos Santos

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 13 de outubro de 2011. A versão original
está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Macedo, Rodrigo Sousa

Análise do perfil morfológico e molecular da
matriz extracelular no tendão tibial posterior em
fetos humanos de diferentes idades gestacionais /
Rodrigo Sousa Macedo. -- São Paulo, 2023.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências do Sistema
Musculoesquelético.

Orientador: Alexandre Leme Godoy dos Santos.

Descritores: 1.Disfunção do tendão tibial
posterior 2.Embriologia 3.Matriz extracelular
4.Colágeno 5.Células-tronco fetais

USP/FM/DBD-309/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Macedo RS. Análise do perfil morfológico e molecular da matriz extracelular no tendão tibial posterior em fetos humanos de diferentes idades gestacionais [doutorado]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

Aprovado em: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais **Angely Oliveira Macedo** e **Núbia Cristina Sousa Macedo**, pela dedicação e cuidado durante toda a minha vida. Obrigado por acreditarem no meu sonho.

À minha esposa **Rayssa Kovacsik Carvalho Macedo**, pela confiança e parceira inabalável que estamos construindo ao longo da nossa jornada. Por ser esposa e mãe maravilhosa. Agradeço a Deus todos os dias por poder compartilhar minha vida com você.

Aos meus filhos **Joaquim Kovacsik Carvalho Macedo** e **Manuela Kovacsik Carvalho Macedo**, por me fazerem entender o verdadeiro sentido da vida. Graças a vocês hoje sou um ser humano melhor.

Aos meus irmãos **Lucas Sousa Macedo** e **Taís Sousa Macedo**, com quem compartilho os pais e a profissão. Obrigado pela amizade sincera e apoio incondicional ao longo da vida. Tenho muito orgulho de ser irmão de vocês.

Aos meus avós maternos **Roosevelt Edward Góes de Souza** e **Antonia Martins Souza** e aos paternos **Manoel Matos Macedo** (*in memoriam*) e **Angelina Oliveira Fraga de Macedo**, obrigado por permitirem que eu desfrutasse da presença e carinho de vocês.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor **Alexandre Leme Godoy dos Santos**, orientador, por ter confiado a sua ideia a mim e acreditado na minha capacidade em levar o projeto adiante, bem como por todo o suporte durante essa jornada.

Ao Professor Doutor **Túlio Diniz Fernandes**, mentor, que durante minha jornada acadêmica na ortopedia e traumatologia me fez despertar o interesse pelo grupo de tornozelo e pé e me ensinou a essência do que é ser médico.

Ao **Dr. Rafael Barban Sposeto**, grande amigo que a ortopedia me deu, por apontar os caminhos e pelos conselhos que me ajudaram a melhorar essa tese.

À Professora Doutora **Walcy Paganelli Rosolia Teodoro**, pela amizade, ensinamentos, e apoio durante a realização deste trabalho.

A todos os membros do LIM 17, pelos ensinamentos, dedicação e suporte durante o desenho e evolução desse projeto, principalmente à **Vitória Elias Contini**, **Lisandre Keren da Silveira** e **Jurandir Tomás de Miranda**.

Ao Professor Doutor **Cesar de Cesar Netto**, pela parceria no projeto, contribuindo sobremaneira com dicas valiosas e sua experiência internacional para engrandecer esse projeto.

Ao Professor Doutor **Camilo Paternazi Helito**, pelo apoio e por compartilhar sua vasta experiência científica, contribuindo de maneira fundamental para confecção dessa tese.

Aos Professores **Gilberto Luis Camanho**, **Olavo Pires de Camargo** e **Tarcísio E. P. de Barros**, pela oportunidade de realizar a Pós-Graduação no Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo.

À Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

A todos os meus colegas de turma de residência, por compartilharem as angústias e conquistas durante a nossa formação, todos vocês fazem parte desta tese.

A todos os membros do Grupo de Tornozelo e Pé do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, pelos ensinamentos teóricos e práticos, que forneceram o alicerce para minha formação.

Aos amigos **Fabio Correa de Paiva Fonseca, Fabio Yuiti Hirata, Pedro Nogueira Giglio, Bruno Azevedo Veronesi, Luiz Renato de Angeli e Lucas da Ponte Melo**, pela força, apoio e principalmente pela confiança e tempo que dedicaram a mim durante a confecção desta tese. A todos os colegas médicos e residentes que passaram pelo Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, que contribuíram de alguma forma na conclusão deste estudo.

À **Priscilla Vargas e Maria Helena Vargas**, pelo apoio e suporte durante a revisão desta tese.

À **Tânia Borges e Rosana Moreno** por toda a ajuda e carinho, fornecendo todo o suporte na secretaria do programa de Pós-Graduação.

A todos os fetos e aos seus pais que participaram deste estudo que, mesmo durante um momento de perda profunda, foram extremamente nobres, contribuindo para o avanço da ciência pela compreensão do desenvolvimento do tecido tendíneo fetal. Sem vocês seria impossível.

RESUMO

Macedo RS. Análise do perfil morfológico e molecular da matriz extracelular no tendão tibial posterior em fetos humanos de diferentes idades gestacionais [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

Introdução: o conhecimento relacionado à etiologia, diagnóstico e ao tratamento da deformidade colapsante progressiva do pé mudou consideravelmente nas últimas décadas, no entanto o entendimento relacionado ao processo de cicatrização tecidual do tendão tibial posterior continua sendo um fator relevante. Os tendões de indivíduos adultos são tecidos altamente diferenciados com baixa capacidade regenerativa e após uma lesão cicatrizam por meio da formação de tecido fibrótico, perdendo suas características morfológicas e biomecânicas iniciais. Em contraste, o tecido tendíneo fetal, apresenta grande potencial regenerativo, o que pode ser um fator importante no tratamento das desordens relacionadas a esse tendão. **Objetivo:** avaliar a evolução da morfologia, a distribuição dos colágenos e a celularidade no tendão tibial posterior em fetos humanos. **Métodos:** o perfil morfológico foi avaliado em nove fetos frescos abortados espontaneamente: Grupo I: cinco fetos com idade entre 22 e 28 semanas de gestação; Grupo II: quatro fetos com idade entre 32 e 38 semanas de gestação. Os espécimes foram estudados pelas técnicas de histologia, fluorescência e imunohistoquímica. **Resultados:** no Grupo I, o tendão tibial posterior apresentou maior celularidade e maior percentual dos colágenos III ($31,19 \pm 2,10$ vs. $17,20 \pm 1,37$; $p < 0,015$) e V ($12,52 \pm 0,76$ vs. $4,39 \pm 0,76$; $p < 0,016$) do que nos tendões do Grupo II. O Grupo II apresentou predomínio de colágeno I ($31,11 \pm 1,74$ vs. $51,40 \pm 1,71$; $p < 0,0159$) e melhor organização da matriz extracelular em comparação aos tendões do Grupo I. Além disso, uma taxa maior, estatisticamente significativa, de CD90 ($7,20 \pm 1,06$ vs. $4,01 \pm 0,51$; $p < 0,0159$), marcador de células-tronco mesenquimais, foi encontrada nos tendões mais imaturos, do Grupo I. **Conclusão:** durante o desenvolvimento do tendão tibial posterior ocorrem modificações quantitativas e qualitativas. Neste estudo foi identificado uma maior organização da matriz extracelular, com maior paralelismo das fibras, um aumento do colágeno tipo I acompanhado da redução dos colágenos organizacionais dos tipos III e V além de uma redução da celularidade e da quantidade do marcador CD90 para células-tronco mesenquimais durante o desenvolvimento.

Palavras-chave: Disfunção do tendão tibial posterior. Embriologia. Matriz extracelular. Colágeno. Células-tronco fetais.

ABSTRACT

Macedo RS. Analysis of the morphological and molecular profile of the extracellular matrix in the posterior tibial tendon in human fetuses of different gestational ages [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2023.

Introduction: the knowledge related to the etiology, diagnosis, and treatment of Progressive Collapsing Foot Deformity has changed considerably in recent decades. However, the understanding of the tissue healing process of the posterior tibial tendon remains relevant. Adult tendons are highly differentiated tissues with low regenerative capacity that heal through the formation of fibrotic tissue, losing their initial morphological and biomechanical characteristics. In contrast, fetal tendon tissue has a great regenerative potential, which may be a relevant factor in the treatment of posterior tibial tendon related pathologies. **Objective:** to evaluate the morphology, distribution of collagens I, III, and V, and cellular components during fetal development in the human posterior tibial tendon. **Methods:** The morphological profile was evaluated in nine fresh spontaneously aborted fetuses: Group I: five fetuses aged between 22 and 28 weeks of gestation; Group II: four fetuses aged between 32 and 38 weeks of gestation. The specimens were studied using histology, fluorescence, and immunohistochemistry techniques. **Results:** in Group I, the posterior tibial tendon had higher cellularity and a higher percentage of collagens III ($31,19 \pm 2,10$ vs. $17,20 \pm 1,37$; $p < 0,015$) and V ($12,52 \pm 0,76$ vs. $4,39 \pm 0,76$; $p < 0,016$) compared to the tendons in Group II. Group II showed a predominance of collagen I ($31,11 \pm 1,74$ vs. $51,40 \pm 1,71$; $p < 0,0159$) and better organization of the extracellular matrix compared to Group I tendons. In addition, a statistically significant higher rate of CD90, a mesenchymal cell marker, was found in the more immature tendons of Group I. **Conclusion:** quantitative and qualitative modifications occur during fetal development of the posterior tibial tendon. This study identified a higher organization of the extracellular matrix, with greater parallelism of the fibers, an increase in collagen type I accompanied by a reduction in organizational collagens III and V, as well as a reduction in cellularity and the number of mesenchymal stem cells during development.

Key words: Posterior tibial tendon dysfunction. Embryology. Extracellular matrix. Collagen. Fetal stem cells.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Gráfico tensão-deformação demonstrando uma região inicial de aumento não linear da tensão, que corresponde microscopicamente ao alinhamento das fibras demonstrado pela imagem 1 (microscopia eletrônica). O ponto de transição é atingido após o alinhamento das fibras, imagem 2 (microscopia eletrônica), momento em que o gráfico assume um crescimento linear associado a rigidez aumentada da estrutura tendínea22
- Figura 2 - Tenócitos, produzindo colágeno, que se organiza sob a forma de tropocolágeno em uma cadeia de tripla hélice, dando origem a fibrila, que se organizam em fibras, que por sua vez se organizam em fascículos, para enfim formarem o tendão24
- Figura 3 - Montagem das moléculas de colágeno dando origem às fibrilas, em seguida o papel dos colágenos III e V no crescimento fibrilar linear, em sequência o papel destes mesmos colágenos no crescimento lateral, a partir da união das fibras em paralelo para definição do diâmetro fibrilar26
- Figura 4 - À esquerda, fotografias da região medial do tornozelo de um feto humano, demonstrando uma incisão medial e exposição do tendão tibial posterior após dissecação: (a) Grupo I e (b) Grupo II. À direita, imagens dos espécimes tendíneos coletados, com presença de músculo na região proximal e cartilagem na região distal: (c) Grupo I e (d) Grupo II.....41
- Figura 5 - Amostras de tendões fetais humanos obtidas do Grupo I (22-28 semanas) e do Grupo II (32-38 semanas) mostram a manutenção da histoarquitetura em preparações de H&E. Em um aumento menor, observa-se maior quantidade de células imersas na matriz fibrilar dos tendões do Grupo I, quando comparados ao Grupo II. Em uma ampliação maior, percebe-se as células distribuídas entre as fibras de colágeno nos tendões fetais humanos do grupo I (setas), de maneira difusa, em comparação com os tendões fetais humanos do grupo II (setas), dispostos na orientação linear aos feixes de colágeno.....48
- Figura 6 - Sob microscopia de fluorescência pela coloração DAPI, que caracteriza o núcleo celular, as imagens evidenciam uma maior quantidade de células com padrão de distribuição difuso nos tendões do Grupo I. Nos espécimes de tendão do grupo II, arranjo uniforme e linear dos núcleos (setas brancas).....48

Figura 7 - Fibras colágenas birrefringentes com coloração laranja avermelhadas, analisadas pela coloração Picrosirius sob polarização no tendão tibial posterior de fetos humanos. No Grupo I, à esquerda, observa-se um padrão fragmentado e desarranjado das fibras, enquanto as fibras de colágeno ficam em orientação paralela ou linear no Grupo II (seta branca).....	49
Figura 8 - Lâminas com imunomarcacão para o colágeno I visualizado na cor verde (setas brancas) em microscopia de fluorescência. Grupo I, à esquerda, e o Grupo II, à direita.....	50
Figura 9 - Lâminas com imunomarcacão para o colágeno III visualizado na cor verde (setas brancas) em microscopia de fluorescência. Grupo I à esquerda e o Grupo II à direita.....	51
Figura 10 - Lâminas com imunomarcacão para o colágeno V visualizado em microscopia de fluorescência com a marcação verde (setas brancas). Grupo I à esquerda e o Grupo II à direita.....	51
Figura 11 - Alta expressão de CD90 em tendões fetais humanos do Grupo I, mais imaturos, quando comparado ao Grupo II. Observa-se a presença intensa de células CD90 positivas em toda a matriz do tendão no Grupo I sob imuno-histoquímica (setas).....	52

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Demonstração da diferença entre duas médias independentes (dois grupos). No eixo vertical o tamanho total da amostra e no eixo longitudinal o poder do estudo de $1-\beta$, considerando um erro α de 0,05 e um tamanho de efeito $d = 1,21$	39
Gráfico 2 - Aumento significativo do percentual de células do grupo I em relação ao grupo II ($p < 0,0357$).....	49
Gráfico 3 - Diferença entre as quantidades de colágeno do tipo I entre os tendões dos grupos I e II ($p < 0,015$).....	50
Gráfico 4 - Diferença entre as quantidades de colágeno do tipo III entre os tendões dos grupos I e II ($p < 0,016$).....	51
Gráfico 5 - Diferença entre as quantidades de colágeno do tipo III entre os tendões dos grupos I e II ($p < 0,015$).....	52
Gráfico 6 - Aumento significativo do percentual de células positivas do Grupo I em relação ao Grupo II para marcação pelo CD90 ($p < 0,015$).....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados epidemiológicos dos espécimes do Grupo I.....47

Tabela 2 - Dados epidemiológicos dos espécimes do Grupo II.....47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	- Albumina bovina
CD90	- <i>Cluster of differentiation</i>
Col V	- Colágeno tipo V
Col I	- Colágeno tipo I
Col III	- Colágeno tipo III
DAPI	- 4,6-diamidino-2-fenilindol
D CPP	- Deformidade colapsante progressiva do pé
H&E	- Hematoxilina Eosina
IgG	- Imunoglobulina G
IOT-HCFMUSP	- Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
LIM 17	- Laboratório de Investigações Médicas 17
PBS	- Solução tampão fosfato
SVO	- Serviço de verificação de óbitos
TCLE	- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TFLD	- Tendão flexor longo dos dedos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	19
2.1	OBJETIVO PRIMÁRIO	20
2.2	OBJETIVOS SECUNDÁRIOS	20
3	REVISÃO DA LITERATURA	21
3.1	CARACTERÍSTICAS DO TENDÃO NORMAL	22
3.1.1	Função, propriedades, estrutura e composição	22
3.1.2	Fibrilogênese	25
3.1.3	Celularidade	27
3.2	DEGENERAÇÃO DO TENDÃO TIBIAL POSTERIOR	30
3.3	CICATRIZAÇÃO TENDÍNEA	32
3.4	REGENERAÇÃO TENDÍNEA	34
3.5	TENDÃO FETAL HUMANO	36
4	MÉTODOS	37
4.1	ESTUDO	38
4.2	CÁLCULO AMOSTRAL	39
4.3	DISSECÇÃO E PREPARO DOS ESPÉCIMES	40
4.4	HISTOLOGIA	42
4.5	IMUNOFLUORESCÊNCIA	42
4.6	HISTOMORFOMETRIA DOS COLÁGENOS DOS TIPOS I, III E V	43
4.7	IMUNOMARCAÇÃO PARA CD90	43
4.8	ANÁLISE MORFOMÉTRICA CELULAR	44
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
5	RESULTADOS	46
5.1	CASUÍSTICA	47
5.2	HISTOLOGIA E DISTRIBUIÇÃO CELULAR	47
5.3	HISTOARQUITETURA E DISTRIBUIÇÃO DOS COLÁGENOS I, III E V	49
5.4	IMUNOMARCAÇÃO PARA O CD90	52
6	DISCUSSÃO	54
	REFERÊNCIAS	60
	ANEXOS	69
	APÊNDICES	79

1 INTRODUÇÃO

O tendão tibial posterior tem origem na região posterior da tíbia, fíbula e membrana interóssea, apresentando trajeto posteromedial no tornozelo com inserção na tuberosidade do osso navicular, cuneiforme, cuboide e base plantar dos metatarsais dois, três e quatro, podendo apresentar interconexões variáveis para o tendão fibular longo, flexor curto do hálux e a base do quinto metatarso. Esse tendão é um importante flexor plantar e o principal inversor do pé, sendo um dos principais estabilizadores do arco plantar, juntamente com as estruturas capsulares e ligamentares presentes na região medial do tornozelo e pé^{1,2}.

A deformidade colapsante progressiva do pé (DCPP), outrora denominada disfunção do tendão tibial posterior ou pé plano adquirido do adulto, é uma patologia prevalente, podendo acometer até 10% da população feminina acima dos 60 anos^{3,4}. Durante anos a etiologia da DCPP foi atribuída quase que exclusivamente à degeneração ou rotura do tendão tibial posterior, no entanto, atualmente ela é considerada uma condição complexa e multifatorial, que envolve os tecidos moles posteromediais, incluindo os ligamentos deltoide e mola, alterações motoras, bem como o formato e as relações ósseas das articulações do retopé e mediopé⁵⁻⁷. Apesar do estabelecimento desses novos conceitos, o tendão tibial posterior mantém o seu papel de principal estabilizador dinâmico das estruturas mediais e seja como causa ou consequência, a sua degeneração mantém-se relacionada à patologia^{3,8-13}.

Os tendões adultos são estruturas diferenciadas que, após uma lesão, desencadeiam um processo reparativo, resultando na formação de uma cicatriz fibrótica. Esse novo tecido formado apresenta propriedades estruturais, organizacionais e mecânicas inferiores ao tendão normal, com piora qualitativa das propriedades intrínsecas tais como elasticidade e resistência. Devido a essas características, os mecanismos de lesão e reparo dos tendões são estudados extensivamente tanto no cenário clínico quanto no experimental¹⁴⁻¹⁸.

Estudos histopatológicos revelam que a alteração tecidual ocorre devido à uma resposta reparativa, representada por uma tendinose degenerativa caracterizada por: neovascularização, deposição excessiva de mucina e aumento da quantidade e da atividade dos fibroblastos, refletida respectivamente pelo aumento da celularidade, da prolina e hidroxiprolina no tendão degenerado. Outra alteração relevante é a modificação da composição dos diferentes tipos de colágeno no tecido tendíneo, com a redução do colágeno tipo I e aumento proporcional dos tipos III e V, principais tipos de colágeno que compõem a matriz tendinosa^{8,14}. Modificações essas que, em última

análise, levam a quebra da formação linear das fibras colagênicas, pois a maior quantidade de colágeno I no tendão sadio permite a formação de fibrilas capazes de se organizarem paralelamente no sentido longitudinal e lateral, dando origem a fibra tendínea. Esse arranjo tecidual é diretamente responsável pelas características mecânicas e funcionais desse tecido altamente especializado^{14,19-22}.

A reduzida propriedade regenerativa do tendão está diretamente relacionada à idade. Os tecidos fetais, por exemplo, possuem alta capacidade de regeneração, de maneira estritamente relacionada e inversamente proporcional à maturidade fetal. De fato, esses tecidos em estágio inicial e médio da gestação respondem às lesões de maneira mais eficiente, formando um novo tecido similar ao original, sem a formação de fibrose²³. As avaliações macro e microscópica do tendão lesionado de espécimes de fetos animais revelam diferenças na restauração da organização das fibras tendíneas, que não apresentam descontinuidade estrutural e não demonstram células inflamatórias presentes no local lesado. Entretanto, os tendões adultos revelam descontinuidade das fibras, presença de infiltrado inflamatório local e desorganização tecidual^{24,25}.

As diferenças relacionadas às características regenerativas dos tendões fetais e adultos dependem de uma interação complexa entre as propriedades extrínsecas e intrínsecas dos tenócitos. Fatores extrínsecos que influenciam a cicatrização do tendão podem envolver alterações de sinais locais ou sistêmicos presentes no ambiente intrauterino, no entanto, o papel das vias intrínsecas das células do tendão parece ser fundamental nesse processo, uma vez que tendões fetais ovinos transplantados para um ambiente adulto, respondem a lesão com rápida regeneração de fibras colágenas alinhadas, com mínima infiltração de células inflamatórias ou expressão de citocinas e ausência de cicatriz, recuperando rapidamente suas propriedades mecânicas originais mesmo fora do ambiente uterino²⁵⁻²⁷. Além disso, as células presentes nos tendões de fetos de espécimes animais expressam marcadores de células-tronco mesenquimais em maior quantidade do que os tecidos adultos, sugerindo um mecanismo que pode estar relacionado à maior eficiência no processo regenerativo desse tecido²⁸.

Poucos estudos avaliam as características tendíneas em fetos humanos e, em sua maioria, restringem-se à avaliação de características morfológicas macroscópicas²⁹⁻³³. A maior parte dos estudos disponíveis relacionados a histomorfologia e moléculas em tendões fetais refere-se camundongos, ratos, coelhos e ovinos^{25,34-39}.

A descrição da composição e conformação tendínea em fetos de diferentes idades, no tendão tibial posterior, ainda não foi realizada, e compreender o tecido fetal e as suas características celulares e moleculares, pode ser o passo inicial para descoberta de fatores específicos que podem ser usados no ambiente clínico no intuito de melhorar a cicatrização tendínea. Associado a essa lacuna, nos últimos anos, diversas técnicas têm sido utilizadas com o objetivo de melhorar o reparo tendíneo, incluindo projetos relacionados a células-tronco mesenquimais e engenharia de tecidos, e embora ainda faltem evidências robustas, muitos estudos estão sendo realizados por se tratar de uma área promissora, que pode melhorar sobremaneira o prognóstico dos pacientes portadores de DCP^{40,41}.

Dessa forma, a motivação para o presente trabalho é avaliar a histoarquitetura, celularidade e a composição molecular da matriz extracelular do tendão tibial posterior de fetos humanos em fases distintas da embriogênese, acreditando que a compreensão do desenvolvimento estrutural do tendão tibial posterior saudável seja um passo inicial e fundamental para fomentar novos projetos que podem fornecer substrato à criação de estratégias terapêuticas capazes de promover um processo regenerativo do tecido lesado e conseqüentemente melhores desfechos clínicos.

A hipótese do presente estudo é que existe diferença na celularidade bem como na composição e arranjo da matriz extracelular, do tendão tibial posterior de fetos humanos em estágios mais precoces quando comparados às idades gestacionais tardias.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRIMÁRIO

Avaliar a evolução da morfologia e a distribuição dos colágenos I, III e V no tendão tibial posterior em fetos humanos de diferentes idades gestacionais.

2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

Avaliar a celularidade no tendão tibial posterior em fetos humanos de diferentes idades gestacionais.

Avaliar a expressão de marcadores de células-tronco mesenquimais no tendão tibial posterior em fetos humanos de diferentes idades gestacionais.

3 REVISÃO DA LITERATURA

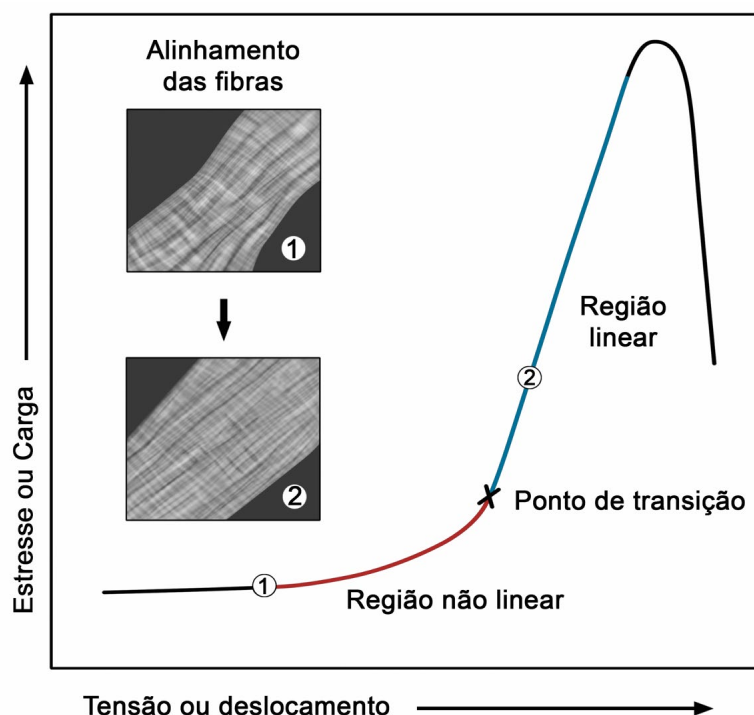
3.1 CARACTERÍSTICAS DO TENDÃO NORMAL

3.1.1 Função, propriedades, estrutura e composição

As propriedades, estrutura e composição dos tendões, determinam as características específicas desse tecido diferenciado, que são fundamentais para realização da sua função.

Os tendões conectam o músculo ao osso, e dessa forma permitem a transmissão de forças geradas pela contração das fibras musculares às articulações, gerando o movimento⁴². Segundo Atkinson *et al.*⁴³, eles exibem um comportamento biomecânico não linear, demonstrado por meio de uma curva tensão-deformação com uma região inicial “não linear” com baixa rigidez, seguida pela “região linear” com rigidez aumentada (Figura 1). Clinicamente, essa propriedade permite que o tendão guie o movimento durante o momento de baixa rigidez, enquanto fornece estabilidade, momento de alta rigidez. Histologicamente isso ocorre devido à configuração tecidual em formato de onda periódica.

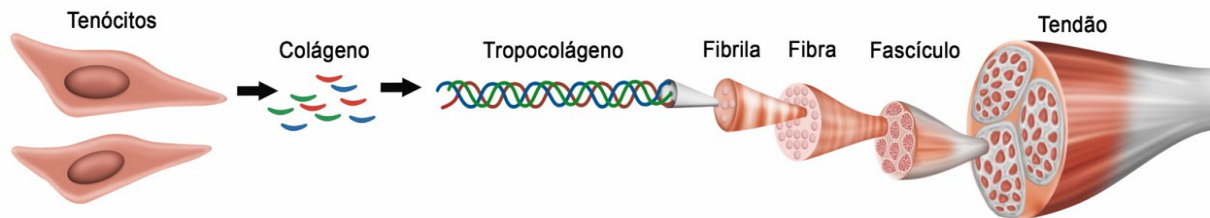
Figura 1 - Gráfico tensão-deformação demonstrando uma região inicial de aumento não linear da tensão, que corresponde microscopicamente ao alinhamento das fibras demonstrado pela imagem 1 (microscopia eletrônica). O ponto de transição é atingido após o alinhamento das fibras, imagem 2 (microscopia eletrônica), momento em que o gráfico assume um crescimento linear associado a rigidez aumentada da estrutura tendínea



Além da não linearidade, os tendões exibem propriedades viscoelásticas identificadas como relaxamento de tensão, histerese e fluência. Em 2007, Einhorn *et al.*⁴⁴, definiram que o relaxamento de tensão se refere a uma diminuição não linear da tensão durante um período de tempo quando um tendão é mantido sob tensão constante. A histerese é representada pela perda de energia em ciclos repetidos, sendo responsável por uma mudança gradual nas curvas de alongamento durante a carga e descarga. Já a fluência é definida por um aumento no comprimento tendíneo ao longo do tempo quando o mesmo é mantido sob tensão constante. Essas propriedades apontam para a capacidade tendínea de se adaptar estruturalmente a cargas constantes ou cíclicas com o intuito de atingir o equilíbrio mecânico necessário para realização da sua função com melhor desempenho e menor gasto energético possível. Outra característica relevante é a sensibilidade à taxa de deformação, demonstrando que o comportamento mecânico do tecido depende da velocidade com que o tendão é tensionado. A associação dessas propriedades torna o tendão um tecido complexo com função altamente dependente da sua estrutura e composição tecidual, na qual a sua matriz extracelular é o componente principal, que o torna capaz de suportar cargas mecânicas.

Asahara *et al.*⁴⁵ descrevem que os tendões normais apresentam textura fibroelástica e coloração branca brilhante. Sua massa seca corresponde a 30% do seu peso e, em geral, o tendão desidratado tem aproximadamente 80% de colágeno tipo I, com os 20% restantes do seu peso, composto por: elastina, proteoglicanos, glicolípídeos, material celular e colágenos menores, principalmente os tipos III e V. O colágeno é arranjado de forma hierárquica em relação ao seu nível de complexidade, iniciando com a formação do tropocolágeno, polipeptídeo com cadeia em tripla hélice, que se organiza em fibrilas. As fibrilas são dispostas paralelamente, formando as fibras, que se organizam em fascículos, e em seguida em feixes terciários, para só então formar o tendão (Figura 2). As fibras são as menores unidades tendíneas que podem ser testadas mecanicamente, sendo vistas sob a microscopia de luz. Elas são orientadas longitudinalmente em sua maioria, no entanto, elas também se distribuem de forma transversal e horizontal, para realizar a conexão entre fibras longitudinais e formar tranças e espirais.

Figura 2 - Tenócitos, produzindo colágeno, que se organiza sob a forma de tropocolágeno em uma cadeia de tripla hélice, dando origem a fibrila, que se organizam em fibras, que por sua vez se organizam em fascículos, para enfim formarem o tendão



Os proteoglicanos desempenham papel fundamental na montagem do colágeno e no desenvolvimento da matriz extracelular. Kalamajski e Oldberg⁴⁶ demonstram que pequenos proteoglicanos ricos em leucina, especialmente a decorina, proteoglicano presente em maior quantidade no tendão, são reguladores da montagem da fibrila, pois agem como restritores do crescimento lateral descontrolado, mantendo as fibrilas em um perfil de diâmetro fino e uniforme. Dourte *et al.*⁴⁷, em um estudo que avalia as propriedades mecânicas dos proteoglicanos no tendão patelar, sugerem que a decorina, além da sua ação estática, desempenha um papel dinâmico com influência direta na taxa de deformação tendínea.

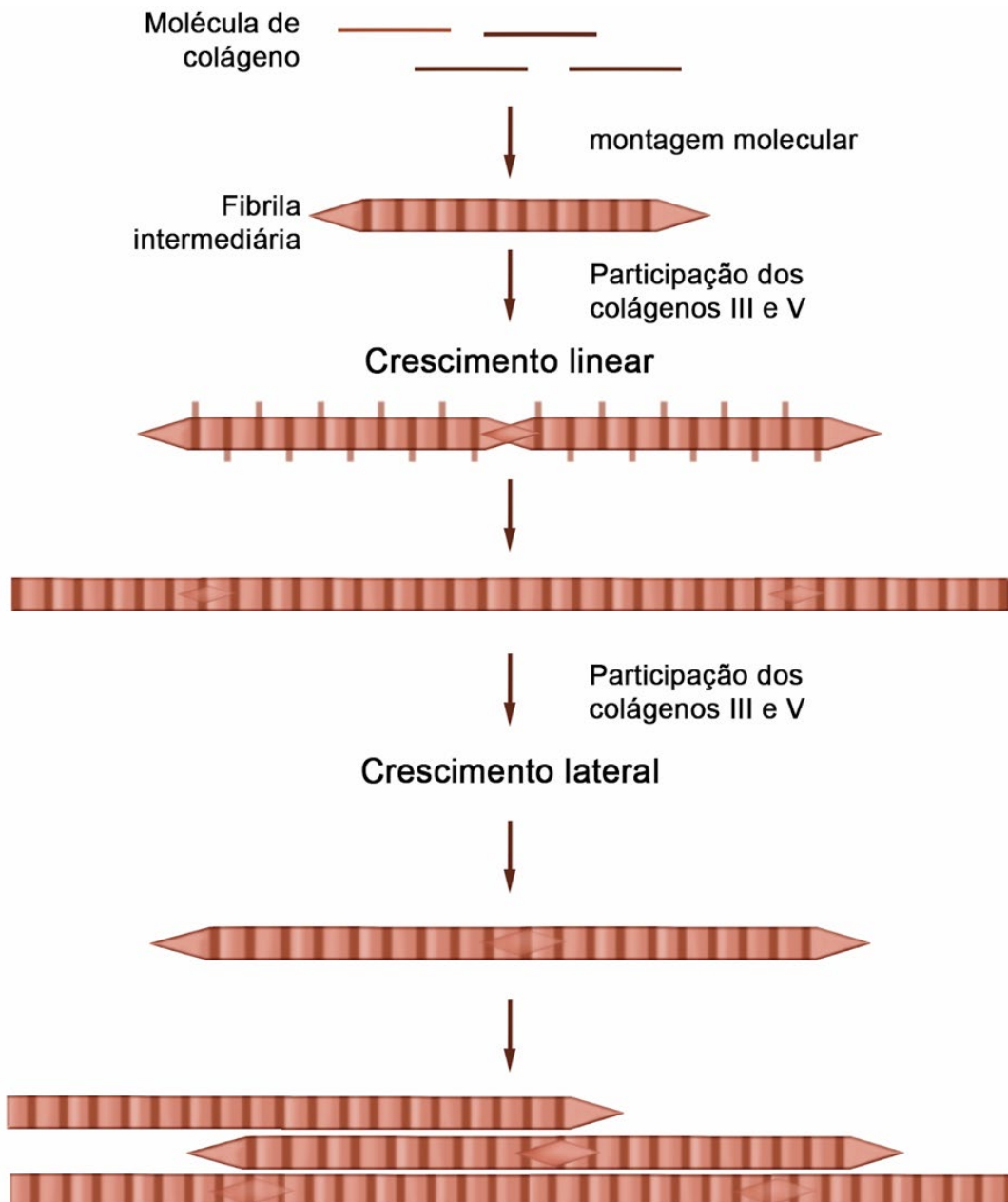
Connizzo *et al.*⁴⁸, afirmam que a matriz extracelular é o principal componente do tendão, determinando, dessa forma, as propriedades do tecido em relação à sua biomecânica. Eles demonstram que a tensão sobre esse tecido no sentido de direção ao alinhamento do colágeno predominante, que é definido pela sua microestrutura, estimula os componentes matriciais a contribuírem estruturalmente para o comportamento não linear, anisotrópico e viscoelástico característico, conforme descrito anteriormente. Além da resistência mecânica das fibrilas, todas as interações arquitetônicas microestruturais participam do processo, tais como as interações entre diferentes fibrilas, interações entre fibrilas e proteoglicanas e interações moleculares.

3.1.2 Fibrilogênese

Nos tendões, as moléculas de colágeno se unem para formar fibrilas longas com uma estrutura axial periódica característica. Essas fibrilas formam o arcabouço biomecânico essencial para fixação celular e ancoragem de macromoléculas, permitindo que a forma dos tecidos seja definida e mantida. A formação de fibrilas de colágeno é basicamente um processo de automontagem determinado pelas propriedades intrínsecas das moléculas de colágeno, sendo sensíveis à regulação mediada por células, particularmente em tecidos jovens ou em cicatrização, como descrito a seguir.

A regulação da construção da fibrila de colágeno é crítica para que se atinja uma estrutura de matriz específica do tendão. Kadler *et al.*⁴⁹ descrevem que a síntese de moléculas de colágeno e sua associação para a formação de fibrilas requer uma série de etapas sequenciais que são comuns aos colágenos fibrilares. Isso engloba eventos intracelulares, como glicosilação e hidroxilação, bem como extracelulares, representados pelo processamento de procolágeno e reticulação por exemplo. Tresoldi *et al.*²² afirmam que a fibrilogênese começa durante a embriogênese e continua após o nascimento com a montagem de moléculas de colágeno tipo I, seguida de crescimento linear e lateral associado a interações do colágeno com proteínas como outros colágenos e proteoglicanos (Figura 3). Em particular, o crescimento linear e lateral é determinado por uma variedade de moléculas, incluindo outros colágenos, principalmente os tipos III e V, que são expressos de maneira variável. Inicialmente, as moléculas de colágeno se reúnem para formar intermediários de fibrilas imaturas, e após essa montagem molecular, os intermediários de fibrila se agrupam ponta a ponta para formar fibrilas mais longas, consistentes com fibrilas maduras mecanicamente funcionais. Zhang *et al.*⁵⁰ demonstram que elas então se associam lateralmente para gerar diâmetros de fibrilas maiores, definindo características específicas de cada um dos tendões.

Figura 3 - Montagem das moléculas de colágeno dando origem às fibrilas, em seguida o papel dos colágenos III e V no crescimento fibrilar linear, em sequência o papel destes mesmos colágenos no crescimento lateral, a partir da união das fibras em paralelo para definição do diâmetro fibrilar



O colágeno tipo III desempenha um papel fundamental na regulação da fibrilogênese e extensibilidade do tendão. Tozer e Duprezm⁵¹ afirmam que a sua expressão diminui gradualmente durante o desenvolvimento, e que a sua alta expressão nas fases precoces sugere um papel na montagem inicial da fibrila. Além disso, a sua expressão é elevada após a lesão tecidual, sugerindo que este colágeno pode desempenhar um papel no processo de cicatrização, talvez por meio do estímulo à fibrilogênese, efetuando um papel na organização estrutural.

Romanic *et al.*⁵² avaliam que o colágeno III, na forma de pró-colágeno III pode regular o diâmetro das fibrilas de colágeno I, revestindo a sua superfície, dessa forma, ele permite o crescimento longitudinal, mas não o crescimento lateral das fibrilas com eventual espessamento do tendão.

Em 2002, Hansen *et al.*⁵³ demonstram que colágeno tipo V existe na forma de heterodímeros sequestrados nas fibrilas de colágeno tipo I e na forma de homodímeros como filamentos finos que podem atuar na matriz extracelular, exercendo o papel de um ligante molecular entre fibrilas de colágeno ou entre fibrilas e macromoléculas dependendo de sua respectiva distribuição nos diferentes tecidos. Dessa forma, ele está associado a quantidade e a qualidade da distribuição das fibras de colágeno I e conseqüentemente do tendão.

Connizzo *et al.*⁵⁴, demonstram que após a deleção dos genes responsáveis pela produção do colágeno tipo V em camundongos, ocorre uma montagem de fibrilas de grande diâmetro com ampla distribuição, características semelhantes às fibrilas produzidas em tecidos conjuntivos com baixas concentrações desse colágeno. Isso sugere que os níveis de colágeno tipo V regulam o diâmetro das fibrilas e que sua redução pode ser suficiente para alterar a montagem da fibrila de modo que fibrilas de diâmetro anormalmente grande sejam depositadas na matriz.

3.1.3 Celularidade

O'Brien *et al.*⁵⁵ descrevem que as células estão localizadas entre as fibras de colágeno ao longo do tecido tendíneo e são compostas em 90% a 95% por tenoblastos e tenócitos. Os tenoblastos são células fusiformes e imaturas com alta atividade metabólica, refletida pela numerosa quantidade de organelas em seu citoplasma. Os tenócitos apresentam relação núcleo citoplasma invertida em relação aos tenoblastos e conseqüentemente menor atividade metabólica. As outras células correspondem a células da bainha sinovial do tendão, células de origem vascular e os condrócitos na zona de fixação do tendão ao osso. Em 2011, Steiner *et al.*⁵⁶ demonstram que além da população de células maduras, o tendão também inclui pequenos subconjuntos de células progenitoras, as células-tronco mesenquimais.

Dekoninck e Blanpain⁵⁷ afirmam que as células-tronco correspondem a um grupo de células caracterizadas por sua capacidade de diferenciação em várias linhagens teciduais. Essas células estão presentes em todas as etapas da vida e apresentam papel central no desenvolvimento do indivíduo e em processos

restauradores após lesões. Nos fetos elas se proliferam nas diferentes linhagens necessárias ao desenvolvimento, enquanto em indivíduos maduros o seu papel está relacionado ao reparo tecidual.

Poliwoda *et al.*⁵⁸ afirmam que as células-tronco podem ser classificadas de acordo com o seu local de origem, sendo divididas em dois grandes grupos: As células-tronco embrionárias e as células-tronco somáticas ou adultas. As células-tronco embrionárias são aquelas derivadas do organismo até a fase de blastocisto, enquanto as somáticas são aquelas presentes nos fetos, crianças e adultos. Em relação ao seu potencial de diferenciação, elas podem ser subdivididas em totipotentes, quando capazes de formar tecidos embrionários, se diferenciando em toda e qualquer linhagem celular, são aquelas originárias do zigoto. As pluripotentes, que podem se diferenciar em todas as três camadas germinativas (ectoderma, mesoderma e endoderma), mas não são capazes de formar tecidos embrionários de apoio ao feto, como a placenta por exemplo, e as multipotentes que podem se diferenciar apenas em um tipo de tecido da linha germinal, sendo os principais exemplos as hematopoiéticas e as mesenquimais.

O termo células-tronco mesenquimais foi definido pela primeira vez por Caplan⁵⁹, em 1991, com o objetivo de descrever uma população hipotética de células multipotentes com capacidade intrínseca de autorrenovação e de regular o equilíbrio e o reparo dos tecidos musculoesqueléticos. Essas células foram identificadas pela primeira vez na medula óssea, e desde então já foram encontradas em vários tecidos conjuntivos diferentes, como gordura, músculo, pele, osso, periósteo, sinóvia, menisco, disco intervertebral, cartilagem, ligamentos e tendões.

As células-tronco mesenquimais adultas são capazes de se diferenciar em: osso, cartilagem, músculo, estroma medular, tendão, ligamento, gordura assim como em outros tecidos conjuntivos em uma sequência de transições de linhagem. Estudos recentes mostram que as células-tronco mesenquimais auxiliam no processo de cura do dano tecidual diretamente pela sua diferenciação ou indiretamente por meio da secreção de fatores imunomoduladores e tróficos. Caplan *et al.*⁶⁰ demonstram que uma série de moléculas bioativas secretadas por estas células foram capazes de promover neovascularização, migração, imunorregulação, proliferação celular, síntese de matriz extracelular e remodelação. No entanto, afirma que ainda não está claro se as células-tronco do tendão agem para substituir o tendão danificado ou para estabelecer um microambiente ideal ao reparo da lesão, mas ambos podem ocorrer in vivo após a lesão tendínea.

Rui *et al.*⁶¹ afirmam que o tendão abriga um conjunto de células-tronco, capazes de desempenhar diferentes papéis na cicatrização de um eventual dano tecidual, apesar de não haver nenhum estudo que aborde diretamente o destino e as funções destas células após a lesão do tendão *in vivo*. Em modelos de ratos, células-tronco isoladas do tendão patelar induzidas por acolagenase e, portanto, com falha nos mecanismos de cicatrização, apresentaram capacidade tenogênica reduzida em comparação com as células isoladas do tendão saudável. Esses dados sugerem que provavelmente as células-tronco mesenquimais participam de forma direta na cicatrização ou da falha de cicatrização tecidual.

Russo *et al.*²⁵ demonstram durante a comparação das características celulares do tecido tendíneo ovino fetal *versus* adulto, que existem diferenças tanto na quantidade quanto nas características celulares dos diferentes tecidos. Em seu estudo o desenvolvimento do tendão ovino é acompanhado por modificações morfológicas do núcleo celular, bem como por uma redução progressiva da celularidade. Além disso, marcadores de células-tronco mesenquimais estão presentes em maior quantidade em tecidos mais jovens e essas células, em geral, ficam localizadas no endotendão, que por sua vez é mais robusto nos espécimes mais imaturos.

Houlihan *et al.*⁶² descrevem que o isolamento tradicional dessa linhagem dependia de técnicas relacionadas à sua capacidade característica de aderência ao plástico. No entanto existem muitas limitações para a realização do procedimento desta maneira, pois desta forma as populações de células isoladas são heterogêneas e podem conter células hematopoiéticas contaminantes. No intuito de minimizar esse problema, são realizadas trocas frequentes de meio e cultura, porém este processo requer pelo menos várias semanas e frequentemente modifica a natureza mesenquimal conforme as células amadurecem e perdem a capacidade de diferenciação. Objetivando superar essas limitações na identificação de células tronco mesenquimais humanas, além da aderência ao plástico se utilizam marcadores de superfície celular tais como CD73, CD90 e o CD105⁶³.

Cristante e Narazaki⁶⁴, em uma revisão sobre o avanço do uso das células-tronco na ortopedia, afirmam que diversos estudos correlacionam essas células com patologias ortopédicas e que esse campo de pesquisa é extremamente promissor, pois apresenta a capacidade de revolucionar terapias clínicas e cirúrgicas, auxiliando no tratamento de patologias que atualmente apresentam difícil manejo, incluindo aquelas relacionadas aos tendões.

3.2 DEGENERAÇÃO DO TENDÃO TIBIAL POSTERIOR

Desde a década de 1930 alguns estudos versam sobre processos degenerativos relacionados ao tendão tibial posterior. Em 1936, Kulowski* *apud* Lapidus e Seidenstein⁶⁵ pela primeira vez faz referência a esta patologia ao descrever uma série de casos relacionados a um aumento de líquido sinovial na bainha do tendão tibial posterior de três indivíduos. Em 1955, Fowler† *apud* Langenskiöld⁶⁶, menciona um espessamento relevante da região inferior do tendão e o fato de que alguns de seus cortes histológicos apresentam depósitos de hemossiderina, levantando a possibilidade de que a condição pudesse ser causada por hemorragia recorrente na bainha. Williams⁶⁷, em 1963, descreve os achados pós-operatórios de 12 tendões de pacientes refratários ao tratamento conservador. Macroscopicamente, a bainha flexora fibrosa é espessada e edemaciada com o tendão saliente, enquanto a sinóvia apresenta vilosidades e aumento da espessura. Microscopicamente os achados são relacionados a sinovite inespecífica associada a aglomerados de colágeno. Esses são os primeiros relatos que descrevem as patologias relacionadas a esse tendão e os seus achados macro e microscópicos.

Johnson⁶⁸, em 1983, descreve que patologias relacionadas a este tendão eram reconhecidas e tratadas com alta frequência, enfatizando a necessidade de entendimento e aprofundamento nos estudos relacionados. Em 1989, Johnson e Strom⁶⁹ desenvolvem uma classificação que considera a presença de uma peritendinite pura nos estágios iniciais, na qual o tendão em si parece normal macroscopicamente, associado a uma proliferação sinovial na bainha tendínea. Com o avançar do processo, ocorre um espessamento sinovial e o tendão aparece firme, mais largo e esbranquiçado, podendo haver algumas lesões longitudinais dentro de sua substância, caracterizando a presença de um processo degenerativo. No último estágio é considerada a rotura do tendão. Os autores questionam se as apresentações representam causas diferentes de acometimento do tendão tibial posterior, como por exemplo, peritendinite por doença inflamatória sistêmica ou degradação intersticial por lesões traumáticas agudas *versus* espectros diferentes de uma mesma patologia.

* Kulowski J. Tendovaginitis (tenosynovitis). General discussion and report of one case involving the posterior tibial tendon. *J Missouri State Med Assn.* 1936;33:135-7.

† Fowler AW. Tibialis posterior syndrome. *J Bone Jt Surg.* 1955;520:37-B.

Com o objetivo de determinar e comparar a resistência do tendão tibial posterior em indivíduos de diferentes sexo e idade, Salomão *et al.*⁶⁹ avaliam o comportamento mecânico tendíneo em 28 tornozelos de 14 indivíduos através de tração axial em máquina de ensaios mecânicos. Os seus resultados evidenciam que não existe diferença significativa na resistência máxima entre os lados nem com a idade entre os homens, no entanto em mulheres acima de 50 anos a resistência à tração é significativamente reduzida.

Mosier *et al.*¹⁹ descrevem que embora existam muitas teorias sobre a etiologia da tendinopatia do tibial posterior, dentre elas a tenossinovite, traumas repetitivos e hipovascularização, a histopatologia não havia sido bem documentada. Com o intuito de determinar a patologia microscópica presente na lesão tendínea, os autores comparam o aspecto macro e microscópico de 15 tendões excisados durante procedimento cirúrgico de pacientes portadores desta patologia com 15 tendões de cadáveres embalsamados utilizados como controle. Todas as amostras cirúrgicas apresentam anomalias grosseiras quando comparadas com os espécimes cadavéricos. Os tendões operados exibem uma característica bulbosa, com aparência branca opaca, e muitas vezes apresentam divisão incompleta na superfície lateral ou profunda. No exame histológico, 12 de 15 tendões de cadáveres apresentam estrutura tendínea normal caracterizada por orientação linear de feixes de colágeno, celularidade normal e baixa densidade. As amostras cirúrgicas evidenciam uma degeneração tendínea caracterizada por excesso do conteúdo de mucina, aumento do número de fibroblastos, neovascularização e metaplasia com surgimento de tecido cartilaginoso, resultando em uma interrupção da orientação linear dos feixes de colágeno.

Gonçalves *et al.*²¹ avaliam tendões tibiais posteriores normais em comparação com espécimes de pacientes portadores de tendinopatia. À microscopia, o tendão tibial posterior normal exhibe estrutura caracterizada por orientação paralela ou linear dos feixes de colágeno, com baixa densidade vascular e celularidade. Caracteristicamente são compostos por mais de 95% de colágeno I, com quantidades relativamente pequenas de outros colágenos, como III e V. No tendão doente observa-se a interrupção da orientação linear dos feixes, caracterizados pela dispersão do colágeno ou presença de um padrão ondulado. Áreas de hiper celularidade com aumento do número de fibroblastos também são observadas. Além disso, ocorre uma redução quantitativa do colágeno I, com aumento proporcional dos tipos III e V. Os autores sugerem que o estresse crônico colocado no tendão tibial posterior pode

potencialmente levar a áreas de microtrauma, que cicatrizam pelo aumento da produção de colágeno tipo III e tipo V. As fibrilas formadas neste processo modificam as propriedades tendíneas e resultam em uma zona crítica, onde a resistência do tecido às forças de tração é comprometida na região de maior fragilidade com possibilidade inclusive de ruptura do tendão.

3.3 CICATRIZAÇÃO TENDÍNEA

Em seu experimento, Ansorge *et al.*⁷¹ citam que os tendões adultos são estruturas altamente diferenciadas que, quando lesadas, ativam processos reparativos para conter a lesão pela formação de tecido cicatricial. Esse tecido apresenta aspecto desorganizado, perdendo seu arranjo paralelo e a distribuição das fibrilas pós lesão consiste principalmente em fibrilas de pequeno diâmetro por um período de tempo prolongado após a lesão, sendo incapazes de recapitular a estrutura tecidual original, o que modifica suas características mecânicas.

Mosier *et al.*⁷² demonstram uma alteração tendínea caracterizada pela ausência de células inflamatórias, aumento da deposição de mucina, maior presença dos fibroblastos e neovascularização que alteram a estrutura dos feixes de colágeno por meio da desorientação das suas fibras, em pacientes com lesão crônica do tendão tibial posterior. A essas alterações degenerativas, quando o tendão falha no processo de reparo do tecido lesado, levando a alterações acentuadas na estrutura e orientação dos feixes de colágeno, denomina-se tendinose. Diversos autores, como Sarkar⁷³, em 1980, e Regan⁷⁴ em 1992, documentam as anormalidades do colágeno presentes na tendinose, descrevendo a matriz como estando em um estado de reparo contínuo do processo degenerativo, com presença de colágeno desorganizado e imaturo no local.

Fleischmajer⁷⁵ e Rest e Garrone⁷⁶ afirmam que a estrutura e força do tendão dependem da composição de colágeno presente em sua matriz. No tendão saudável, as proteínas dos tipos I e III respondem por manter a arquitetura e rigidez dos tecidos, pois enquanto a primeira corresponde a base do tecido biológico a segunda é responsável pelas conexões e extensibilidade longitudinal tendínea. Já o colágeno do tipo V regula o diâmetro, ou crescimento lateral das fibrilas, bem como as conexões laterais entre elas. Satomi *et al.*¹⁴ demonstram à microscopia, que o tendão tibial posterior normal exibe estrutura caracterizada por orientação paralela ou linear dos feixes de colágeno com baixa densidade vascular e celularidade e, assim como em outros tendões, ele é caracteristicamente composto por mais de 95% de colágeno I,

com quantidades relativamente pequenas de outros colágenos, como III e V. Entretanto, no tecido degenerado são observadas áreas de interrupção da orientação linear dos feixes de colágeno, caracterizados pela sua dispersão e presença de um padrão ondulado de distribuição. Áreas de hiper celularidade com aumento do número de fibroblastos também são observadas associadas a uma redução significativa do colágeno tipo I, com aumento dos colágenos III e V.

O tecido reparativo no local da lesão possui características biomecânicas inferiores quando comparados com o tendão normal. Gautieri *et al.*⁷⁷ comparam, em escala nanoscópica, as fibrilas de colágeno a cabos biológicos, e mostra que o estudo isolado de suas propriedades mecânicas é possível. Neste trabalho, o comportamento das microfibrilas demonstra que as principais deformações durante o carregamento mecânico ocorrem por meio do endireitamento da estrutura de hélice tripla do colágeno, seguido por alongamento axial e eventual desenrolamento molecular. Quando o tendão está sendo solicitado, as fibras de colágeno mudam sua orientação em direção ao eixo de ativação, diminuindo a distribuição dos ângulos das fibras, sendo esse mecanismo denominado de realinhamento. Para que o realinhamento ocorra do modo mais favorável possível, as fibrilas devem estar organizadas tanto no sentido longitudinal quanto umas em relação às outras.

Andarawis-Puri *et al.*⁷⁸ afirmam que diferentes aspectos da celularidade contribuem para a progressão da lesão tendínea e estão associados aos mecanismos de reparo. Existem evidências de que o tenócito desempenha importante função na resposta do tendão e sua incapacidade em restabelecer totalmente sua estrutura nativa. O equilíbrio fisiológico normal da síntese e da renovação da matriz é mantido até que uma lesão ocorra, levando a mudanças no fenótipo celular tendíneo, que pode perpetuar a degeneração da matriz e a síntese inadequada de colágenos. Clegg *et al.*⁷⁹, em seu estudo de revisão sobre fenótipo celular em tendões normais e patológicos, citam que a morfologia arredondada de tenócitos nativos que é comumente observada em tendões doentes pode contribuir para a degradação da matriz principalmente devido a síntese ineficaz de matriz extracelular.

Zhang *et al.*⁸⁰ caracterizam diferentes propriedades nas células de tendões de coelhos, demonstrando que além da população nativa de tenócitos, existe uma população de células-tronco mesenquimais residente no tendão. Essas células diferem dos tenócitos em relação a sua morfologia, potencial proliferativo e expressão de marcadores específicos e, com o avançar da idade, tornam-se menos responsivas.

Em seu estudo discutem que provavelmente esse grupo celular aí presente contribui para os mecanismos de reparo da lesão tecidual, mas a sua natureza molecular e celular ainda não estão bem caracterizadas, sugerindo novas pesquisas.

3.4 REGENERAÇÃO TENDÍNEA

Lorenz *et al.*⁸¹ e Armstrong e Ferguson^{81,82} afirmam que, em contraste com o reparo tecidual adulto, existem extensas evidências experimentais de que o tecido fetal, principalmente nos estágios inicial e intermediário de desenvolvimento, responde de maneira diferente a uma lesão quando comparado ao tecido maduro. Os autores sustentam que a cicatrização de feridas fetais ocorre em um ritmo mais rápido, com menor inflamação e na ausência de formação de cicatrizes, como já foi demonstrado em múltiplos tecidos em modelos animais variados, caracterizando um processo regenerativo ao invés do reparativo^{81,82}.

Beredjiklian *et al.*²⁴ comparam o tecido tendíneo em um modelo de lesão no cordeiro adulto e no feto. Macroscopicamente, durante a dissecação do membro lesionado, o tendão adulto demonstra uma ruptura facilmente identificável na área de ferimento. Além disso, as feridas adultas exibem tecido de granulação, aderido ao tendão e às estruturas circunjacentes. Em contraste, o tendão fetal não mostra sinais de anormalidade nem aderências em seu entorno. O local da ferida é apenas identificável pela presença de tinta nanquim em local previamente demarcado, com a arquitetura original normal, demonstrando que houve um processo regenerativo no local da lesão, diferente da formação de cicatriz que ocorre no tecido maduro.

Stalling *et al.*²³ demonstram diferenças nas propriedades regenerativas entre tecidos fetais e adultos. Por meio da avaliação da ação dos fibroblastos ovinos adultos e fetais na lesão do ligamento cruzado anterior, mostra que com o desenvolvimento e maturação, a capacidade de cura regenerativa dos tecidos fetais diverge em direção ao processo de cura reparadora observada em adultos, sugerindo que a capacidade regenerativa dos fibroblastos não é intrinsecamente pobre, mas sim dependente da sua idade. Além disso, a caracterização do ambiente fetal revela uma mudança em direção a uma redução no número de células inflamatórias localizadas.

Chen *et al.*⁸³, avaliando a pele de fetos de camundongos de diferentes idades gestacionais e adultos, mostram que à medida em que o desenvolvimento gestacional progride, ocorre variação nos principais fatores de crescimento e citocinas, importantes na formação do tecido cicatricial. Entretanto, além da atividade parácrina,

os tecidos fetais também possuem uma migração celular peculiar, exibindo quantidade diferenciada de moléculas que podem permitir uma produção diferenciada de colágeno, suportando sua capacidade regenerativa mais alta.

Com o objetivo de avaliar se a alta capacidade tecidual regenerativa está associada a propriedades intrínsecas do tecido fetal ou se isso se deve a propriedades específicas do ambiente intrauterino, Favata *et al.*²⁷ transplanta tendões fetais ovinos lesionados para animais adultos, obtendo uma rápida regeneração tecidual, com ausência de tecido cicatricial desorganizado e presença de mínima infiltração de células inflamatórias ou expressão de citocinas. Além disso, há uma rápida recuperação das propriedades mecânicas originais, sugerindo que as características intrínsecas do tendão fetal são as principais responsáveis pela sua alta capacidade regenerativa, pois nesse caso o processo foi capaz de ocorrer fora do ambiente uterino.

Stanley *et al.*⁸⁴ afirmam que durante a maturação do tendão em espécimes animais ocorre uma redução progressiva da celularidade associada a uma especialização morfológica celular. O tecido fetal imaturo apresenta células com formato heterogêneo e disposição aleatória, enquanto nos fetos mais maduros as células adquirem formato fusiforme e aparecem em menor número. Isso pode ser atribuído a um maior índice de proliferação celular no tecido mais imaturo com menor acúmulo de matriz extracelular. Chuen *et al.*⁸⁵ e Hosaka *et al.*⁸⁶ corroboram essa hipótese por meio de estudos com espécimes de tendões patelares humanos e tendões equinos, respectivamente, sugerindo que a diminuição da celularidade ao longo do desenvolvimento tendíneo não se deva a um processo de apoptose, pois na avaliação das amostras não há evidência de picnose ou fragmentação nuclear, mas sim por redução da sua capacidade proliferativa.

Lui²⁸ afirma que as células dos tendões fetais em espécimes animais são capazes de expressar marcadores de células-tronco mesenquimais em maior quantidade do que os tecidos mais maduros, sugerindo um mecanismo possivelmente implicado no processo de reparo mais eficiente do tendão fetal. A presença dessas células foi observada principalmente próximo aos vasos sanguíneos, sugerindo que elas podem responder a sinais regulatórios locais e sistêmicos, tais como tensão de oxigênio, carga mecânica e fatores biológicos, assim como sugerido para tendões adultos. Esse achado ajuda a explicar a menor capacidade dos tendões adultos de se reparar de forma espontânea e eficiente, e sugere que estimular a proliferação desse tipo de célula pode ser um caminho para um reparo mais eficaz.

3.5 TENDÃO FETAL HUMANO

Poucos estudos têm focado na organização tecidual dos tendões humanos em seu desenvolvimento inicial. A maioria dos autores, como por exemplo Waśniewska-Włodarczyk *et al.*²⁹, Karauda *et al.*³⁰ e Olewnik *et al.*³¹, restringem-se à descrição da variabilidade morfológica desse tecido na população fetal, ou assim como Helito *et al.*⁸⁷ realizam a descrição anatômica e histológica de estruturas ligamentares. De la Cuadra-Blanco *et al.*³³ descrevem o desenvolvimento morfológico do tendão do bíceps braquial e do ligamento coracoide em fetos de diferentes idades gestacionais, avaliando o seu desenvolvimento com foco nas suas relações anatômicas. Dziedzic *et al.*³² descrevem características do tendão semitendíneo em cadáveres de 10 adultos e 10 fetos, avaliando correlação entre a porção intra e extramuscular do tendão bem como do seu comprimento total.

Grognuz *et al.*⁸⁸ avaliam tenócitos progenitores fetais em tendões de Aquiles humanos. Nesse estudo eles demonstraram que essas células apresentaram um crescimento rápido e estável com capacidade de estimular os tenócitos humanos adultos a depositarem uma nova matriz extracelular. Eles também foram capazes de armazenar essas células em gel, permitindo aplicações variadas desse material, como injeções ou enxertos com capacidade de preencher espaços.

4 MÉTODOS

4.1 ESTUDO

Trata-se de um estudo experimental cadavérico em fetos humanos. Todos os procedimentos descritos no presente estudo foram aprovados pela Comissão Científica do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (IOT-HCFMUSP), pelo do protocolo IOT nº 1340 (Anexo A) e pela Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob o número: 01905018.5.0000.0065 (Anexo B).

Os fetos humanos foram divididos em dois grupos: Grupo I composto por fetos com idades gestacionais entre 22 e 28 semanas e o Grupo II, composto por fetos com idades gestacionais entre 32 e 38 semanas. Essa diferença de tempo foi definida com o intuito de criar um espaço de transição entre os fetos mais imaturos e maduros possíveis de serem dissecados, permitindo de forma mais efetiva a análise comparativa entre os grupos. Fetos com menos de 22 semanas não foram inclusos devido ao fato de serem considerados aborto e não darem entrada no Serviço de Verificação de Óbito da Capital da Universidade de São Paulo

As idades gestacionais foram determinadas pela medida do comprimento cabeça-nádega, comprimento do pé e peso fetal⁸⁹, o que foi aferido juntamente com a idade gestacional mencionada pelos pais e descrita no cartão de acompanhamento da gestação, ao assinar o termo de consentimento livre esclarecido (TCLE) (Anexo C).

Critérios de inclusão:

- Fetos abortados espontaneamente com idade gestacional entre 22 e 38 semanas.

Critérios exclusão:

- Presença de malformações ou anomalias evidentes na inspeção externa ou após autópsia.
- Estado avançado de decomposição do feto.
- Não identificação do tendão tibial posterior.

Os espécimes foram posteriormente submetidos à avaliação da histoarquitetura e análise histomorfométrica dos componentes da matriz extracelular, incluindo os colágenos I, III e V, bem como a avaliação de marcadores sugestivos da presença de células-tronco mesenquimais.

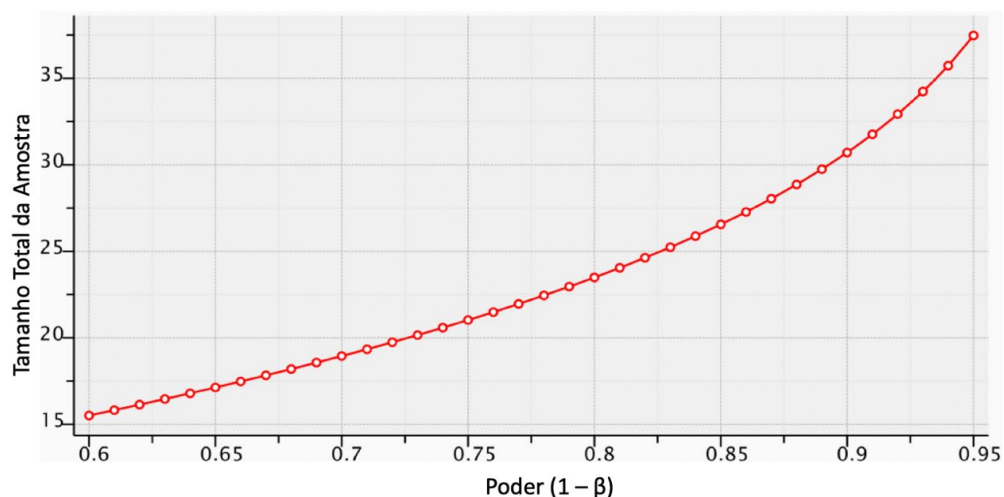
4.2 CÁLCULO AMOSTRAL

O cálculo da amostra partiu da premissa de que o estudo busca avaliar diferenças quantitativas na presença de três tipos de colágeno (I, III e V) e células-tronco mesenquimais em tendões de fetos humanos. A estimativa do tamanho de amostra necessário para garantir um poder de teste ($1-\beta$) de 80% depende de valores esperados da variância das medidas a serem testadas estatisticamente.

Há poucos estudos desse tipo na literatura, não tendo sido encontrados estudos similares em tendões fetais humanos na plataforma PubMed. Estudos realizados experimentalmente em porcos, ovelhas e camundongos, indicaram tamanhos de amostra díspares, com números totais variando entre 8 e 66 indivíduos respectivamente.

Nesse contexto, o estudo que melhor pode informar essa avaliação da variância em medidas dos tipos de colágeno, foi “Changes in collagen matrix composition in human posterior tibial tendon dysfunction” de Gonçalves-Neto *et al.*²¹, que avaliaram o colágeno em tendões tibiais posteriores de humanos adultos. Considerando que dentre os resultados obtidos nesse estudo, o que demonstrou menor diferença relativa entre os grupos foi o do colágeno V e para um teste t com dois grupos, espera-se um tamanho de efeito (d) de 1,847. Como demonstrado no Gráfico 1, um tamanho total de amostra de 24 indivíduos (dois grupos de 12) garantiria um poder de teste de 80,92%.

Gráfico 1 - Demonstração da diferença entre duas médias independentes (dois grupos). No eixo vertical o tamanho total da amostra e no eixo longitudinal o poder do estudo de $1-\beta$, considerando um erro α de 0,05 e um tamanho de efeito $d = 1,21$



Após a definição do cálculo amostral ficou pré-determinada uma análise interina, a ser realizada após coleta da metade da amostra. No entanto devido a pandemia secundária ao Covid-19, e a impossibilidade de prosseguir a coleta pela suspensão das atividades didáticas e científicas no Serviço de Verificação de Óbito da Capital da Universidade de São Paulo (SVO), foi optado pela análise interina naquele momento, quando havia nove espécimes coletados, cinco do grupo I e quatro do Grupo II. Após avaliação e análise dos dados obtidos até aquele momento, foi evidenciado um poder de teste de 87% com a amostra coletada, sendo então definida a amostra.

4.3 DISSECÇÃO E PREPARO DOS ESPÉCIMES

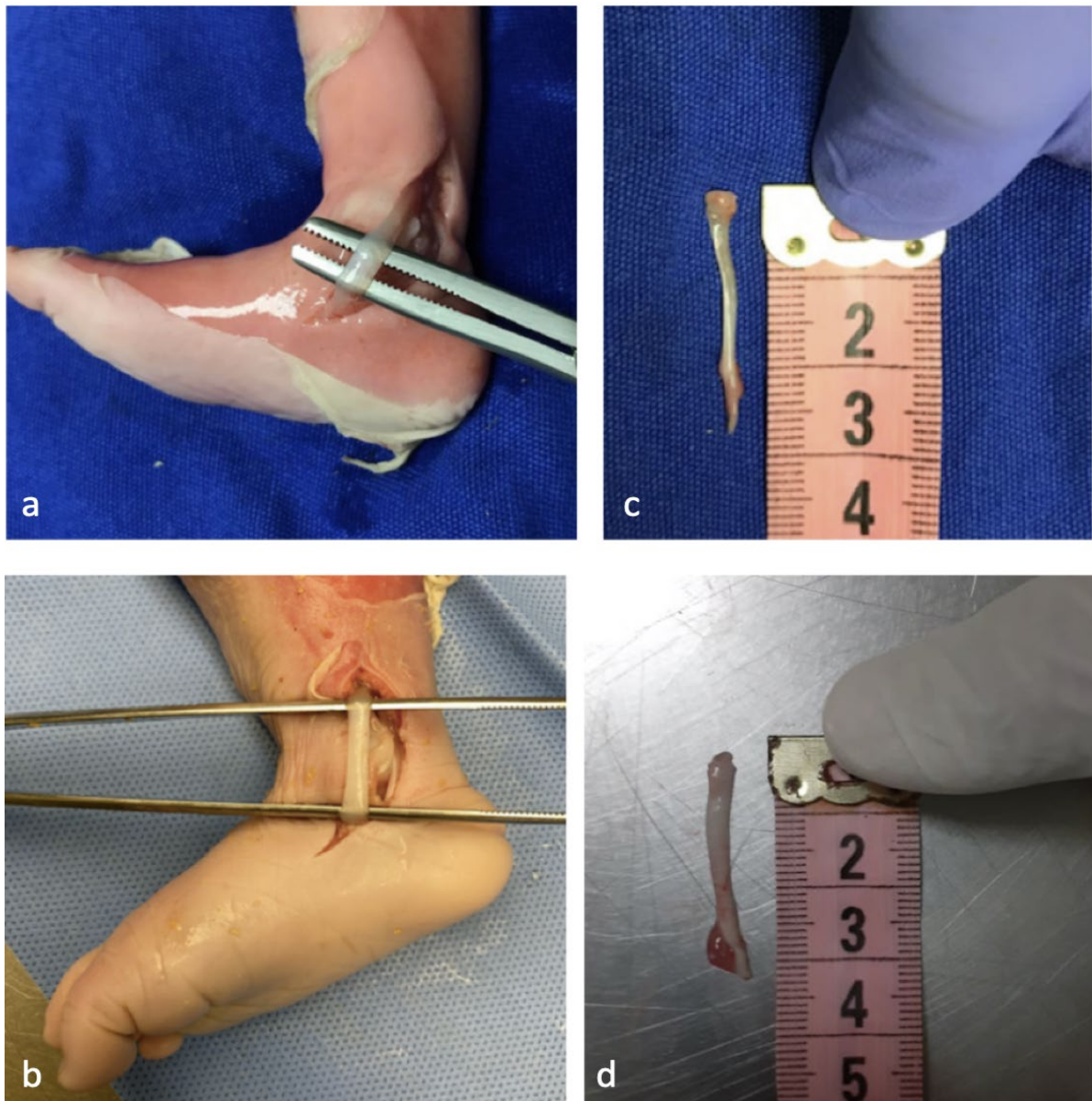
As dissecções seguidas das ressecções dos fragmentos do tendão tibial posterior de fetos humanos foram realizadas no Serviço de Verificação de Óbito da Capital da Universidade de São Paulo, autorizadas conforme manifestação prévia a respeito dos aspectos técnicos relacionados à obtenção de material de estudo para pesquisa científica (Anexo D).

Após autorização prévia dos responsáveis e assinatura do TCLE, o feto foi preparado em uma mesa metálica, sobre campos de tecido. Dois ortopedistas especialistas em tornozelo e pé, com mais de 5 anos de atuação, foram responsáveis pela coleta. Com auxílio de uma lâmina de bisturi curva de 15 mm, foi realizada uma via de aproximadamente 1 cm sobre o tendão tibial posterior na região posteromedial do tornozelo. Em seguida foi aberto o retináculo e foram identificados os tendões tibial posterior, flexor longo dos dedos e o flexor longo do hálux, dispostos nessa sequência de anterior para posterior. Os espécimes tendíneos do tendão tibial posterior foram então coletados desde sua região mais proximal, local ainda com inserção muscular à região mais distal, local no qual o mesmo está inserido no osso navicular. Padronizou-se a coleta dos tendões do lado direito para os procedimentos morfológicos e de imunomarcção, enquanto os espécimes do lado esquerdo foram destinados para armazenamento em nitrogênio e realização de procedimentos futuros relacionados à biologia molecular (Figura 4).

Imediatamente após a coleta, os espécimes foram separados em tubos plásticos, previamente identificados, contendo 20 mL de formalina tamponada a 10%, onde foram imersos e armazenados por aproximadamente 24 horas, permitindo ideal

acondicionamento para efeito das análises histológicas e morfométricas. Após este período, as amostras do tecido foram envolvidas por papel de seda, com o objetivo de garantir melhor disposição espacial, incluídas em parafina, a fim de facilitar o manuseio através da formação de um bloco que contém o espécime em seu interior. Depois de endurecido, o bloco foi cortado, com auxílio do micrótomo, em secções extremamente finas de 3 μm a 4 μm e em seguida foram montados sobre lâminas de vidro.

Figura 4 - À esquerda, fotografias da região medial do tornozelo de um feto humano, demonstrando uma incisão medial e exposição do tendão tibial posterior após dissecação: (a) Grupo I e (b) Grupo II. À direita, imagens dos espécimes tendíneos coletados, com presença de músculo na região proximal e cartilagem na região distal: (c) Grupo I e (d) Grupo II



4.4 HISTOLOGIA

Seções de tendão (3 μm -4 μm) foram submetidas ao processo de desparafinização em xilol e hidratadas em etanol graduado. Posteriormente foram coradas com coloração hematoxilina eosina (H&E) e avaliadas em microscópio óptico (Olympus Instrument BX51, Tokyo, Japan) para avaliação da estrutura e celularidade do tecido. Posteriormente, para realizar a avaliação do conteúdo de colágeno tecidual em microscópio óptico e luz polarizada, as amostras foram coradas pelo Picrosirius, preparado a partir de Sirius red 0,2% em solução saturada de ácido pícrico (Direct Red 80, C.I.35780, Aldrich, Milwaukee, WI).

4.5 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Para a imunomarcação do colágeno dos tipos I, III e V, cortes de amostras de tecido tendíneo de 3-4 μm foram aderidos em lâminas com aminosilane (Sigma Chemical Co.; St. Louis, Missouri, USA). Elas foram imersas em xilol e reidratadas em concentrações decrescentes de etanol. Os sítios imunogênicos foram expostos pelo tratamento enzimático com pepsina bovina (10,000 UTD; Sigma Chemical Co.; St. Louis, Missouri, USA), na concentração de 10 mg/mL em ácido acético 0,5 N, pH 2,2 por 45 min, a 37°C. Após sucessivas lavagens com PBS as lâminas foram incubadas em 5% de albumina bovina (BSA), diluída em tampão fosfato pH 7,0 durante 30 minutos. Posteriormente foram incubadas durante uma noite a 4°C com Col I policlonal de coelho anti-humano (1: 100, Rockland, Carlsbad, CA, EUA), Col III anti-humano (1: 200, Rockland, Carlsbad, CA, EUA), e anticorpos anti-Col V humano (1: 2000, Rockland, Carlsbad, CA, EUA) diluídos em BSA (albumina bovina, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) e revelados com anticorpo de cabra ALEXA FLUOR 488 IgG anti-coelho (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) diluído 1: 200 em uma solução de PBS contendo 0,006% de azul de Evans. Como controle negativo, o anticorpo primário foi substituído por PBS. Após lavagem com PBS/Tween₂₀ 0,05%, as lâminas foram novamente incubadas com 1 $\mu\text{g/mL}$ bisbenzimidazina Hoechst 33258 (DAPI) (Invitrogen) para se evidenciar o núcleo das células. Finalmente as lâminas foram montadas com tampão glicina em PBS (v/v) e analisadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX51, Olympus Co, St Laurent, Quebec, Canadá)^{20,90}.

4.6 HISTOMORFOMETRIA DOS COLÁGENOS DOS TIPOS I, III E V

A análise histomorfométrica foi realizada para quantificar a densidade de fibras imunomarcadas de colágeno dos tipos I, III e V, por meio de análise de imagem. Este sistema é constituído por uma câmara fotográfica (Olympus Co, St Laurent, Quebec, Canadá) acoplada a um microscópio (Olympus BX-51, Olympus Co, Tokyo, Japan), que captura as imagens e as envia para o monitor, por um sistema de digitalização (Oculus TCX, Coreco, Inc, St. Laurent, Quebec, Canadá). As imagens são então processadas por um *software* (*Image-Pro Plus 6.0*) que permite quantificar as fibras imunomarcadas em verde fluorescente.

A densidade das fibras de colágeno foi medida em todos os campos microscópicos, por observador, às cegas, sendo adquiridas aleatoriamente 10 imagens de cada caso, em aumento de 400x. A área de cada campo analisado foi medida em μm^2 e utilizando-se os recursos do *software* (*Image-Pro Plus 6.0*), através da seleção de cores, a tonalidade verde fluorescente foi quantificada. A média da área do conteúdo de colágeno foi dividida pela média da área total analisada e o resultado final expresso em percentagem⁹¹.

4.7 IMUNOMARCAÇÃO PARA CD90

Para analisar a presença de células-tronco mesenquimais no tecido tendinoso, seções de 3 μm -4 μm foram aderidas em lâminas com aminossilano (Sigma Chemical Co.; St. Louis, Missouri, EUA). As lâminas foram imersas em xileno e reidratadas em concentrações decrescentes de etanol. Em seguida, uma solução de peróxido de hidrogênio a 0,3% foi utilizada quatro vezes por 5 minutos para inibir a atividade da peroxidase endógena e a recuperação antigênica foi processada imediatamente. Os sítios imunogênicos foram expostos ao tratamento enzimático com pepsina de mucosa gástrica suína (P7000; Sigma Chemical Co.; St. Louis, Missouri, EUA) a uma concentração de 0,4% em tampão de glicina pH 2,2 por 30 minutos a 37 °C e, em seguida, incubados com o anticorpo primário monoclonal CD90 (Abcam Ab 92574) diluído 1:200 em BSA a 0,01%, durante a noite a 4°C. De acordo com as recomendações do fabricante, a reação foi desenvolvida usando um kit de detecção de polímero biotina-estreptavidina-peroxidase (Novolink, Leica Biosystems, Reino Unido). Depois disso, a 3,3-diaminobenzidina (Sigma Chemical, St Louis, MO) foi

utilizada como cromógeno e corada com hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, HE Germany). O isotipo IgG foi utilizado como controle negativo. Para acessar amostras de tendão uniformes e proporcionais, 10 campos foram analisados aleatoriamente no tendão com aumento de $\times 1000$ para expressão de CD90 e a contagem de células foi realizada por contagem manual de pontos em cada campo com o software de sistema Image Pro-Plus 6.0, composto por uma câmera Olympus (Olympus Co, St Laurent, Quebec, Canadá) acoplada a um microscópio Olympus (Olympus BX51), a partir do qual as imagens foram enviadas para um monitor LG utilizando um sistema de digitalização (Oculus TCX, Coreco, Inc., St. Laurent, Quebec, Canadá). Os resultados são relatados como a porcentagem de células positivas no tendão por micrômetro quadrado⁹².

4.8 ANÁLISE MORFOMÉTRICA CELULAR

Para a avaliação da imunomarcaçã das células presentes no tendão dos fetos, foi utilizado o método estereológico do *point-counting*, que consiste num retículo contendo 100 pontos e cinquenta retas. A avaliação foi realizada por observador, sem conhecimento do grupo da amostra, em 10 campos randomizados do tecido tendíneo, em aumento de 1000X, capturados através de uma câmera fotográfica (Olympus Co, St Laurent, Quebec, Canadá) acoplada a um microscópio (Olympus BX-51, Olympus Co, Tokyo, Japan) com sistema de digitalização (Oculus TCX, Coreco, Inc, St. Laurent, Quebec, Canadá). Após a captura, as imagens foram finalmente processadas pelo *software Image-Pro Plus 6.0*. A porcentagem (P) de pontos marcados no compartimento de referência para o marcador estudado foi expressa pela fórmula: $P = (P_i \times 100) / P_t$; sendo P_i , o número de pontos que incide sobre a marcação positiva por imuno-histoquímica e P_t , o número total de pontos analisados. A porcentagem (P) de cada antígeno foi calculada a partir da soma dos resultados de todos os campos analisados para cada amostra⁹³.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com o software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Prism, Inc., San Diego, CA, EUA), valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos. As diferenças estatísticas entre os grupos foram determinadas pelo teste U de Mann Whitney para uma área da fração ocupada por células mesenquimais e imunofluorescência para colágeno I, III e V dos tendões. Testes post-hoc, corrigidos para comparações múltiplas com o ajuste de Tukey-Kramer, foram usados para avaliar diferenças significativas quando efeitos principais ou efeitos de interação foram identificados. A correlação de Spearman foi realizada entre as células e os tipos de colágeno.

5 RESULTADOS

5.1 CASUÍSTICA

Foram obtidas amostras de nove espécimes de tendão tibial posterior de fetos oriundos do SVO, sendo sete fetos do sexo masculino e dois do sexo feminino. Os espécimes foram divididos em dois grupos: Grupo I: 5 fetos - 22-28 semanas de gestação, média de 25 semanas de idade gestacional, e Grupo II: 4 fetos - 32-38 semanas de gestação, média de 34,5 semanas de idade gestacional. Todos os pais entrevistados autorizaram a realização do estudo e apenas um feto selecionado não foi incluído devido a presença de anomalias após autópsia.

Tabela 1 - Dados epidemiológicos dos espécimes do Grupo I

Grupo 1	Peso (g)	Sexo	Comprimento cabeça-nádega (cm)	Comprimento pé (cm)	Idade gestacional (semanas)
Feto 1	640	Masculino	21,5	4,5	22
Feto 2	968	Feminino	25	5,3	26
Feto 3	1300	Masculino	27	6,0	28
Feto 4	1210	Feminino	25	5,5	25
Feto 5	804	Masculino	22	4,3	24
Média	984,4	-	24,1	5,1	25

Tabela 2 - Dados epidemiológicos dos espécimes do Grupo II

Grupo 1	Peso (g)	Sexo	Comprimento cabeça-nádega (cm)	Comprimento pé (cm)	Idade gestacional (semanas)
Feto 1	2880	Masculino	34	7,2	36
Feto 2	2200	Masculino	31	6,8	32
Feto 3	3500	Masculino	35	8,0	38
Feto 4	2340	Masculino	30	7,0	32
Média	2730	-	32,5	7,2	34,5

5.2 HISTOLOGIA E DISTRIBUIÇÃO CELULAR

O Grupo I (22-28 semanas) apresentou tendões com grande número de células com distribuição assimétrica, formatos variados, imersas em feixes de colágeno, disposto em um padrão desordenado, principalmente em torno do endotendão. No Grupo II (32-38 semanas), foram encontrados tendões com menor grau de celularidade, com formato fusiforme e aumento da orientação paralela ou linear aos feixes de colágeno (Figuras 5 e 6). Houve uma diferença estatística significativa entre o número total de células nos grupos I e II ($23,35\% \pm 1,74\%$ vs. $16,07\% \pm 0,77\%$, respectivamente; $p < 0,0357$) (Gráfico 2).

Figura 5 - Amostras de tendões fetais humanos obtidas do Grupo I (22-28 semanas) e do Grupo II (32-38 semanas) mostram a manutenção da histoarquitetura em preparações de H&E. Em um aumento menor, observa-se maior quantidade de células imersas na matriz fibrilar dos tendões do Grupo I, quando comparados ao Grupo II. Em uma ampliação maior, percebe-se as células distribuídas entre as fibras de colágeno nos tendões fetais humanos do grupo I (setas), de maneira difusa, em comparação com os tendões fetais humanos do grupo II (setas), dispostos na orientação linear aos feixes de colágeno

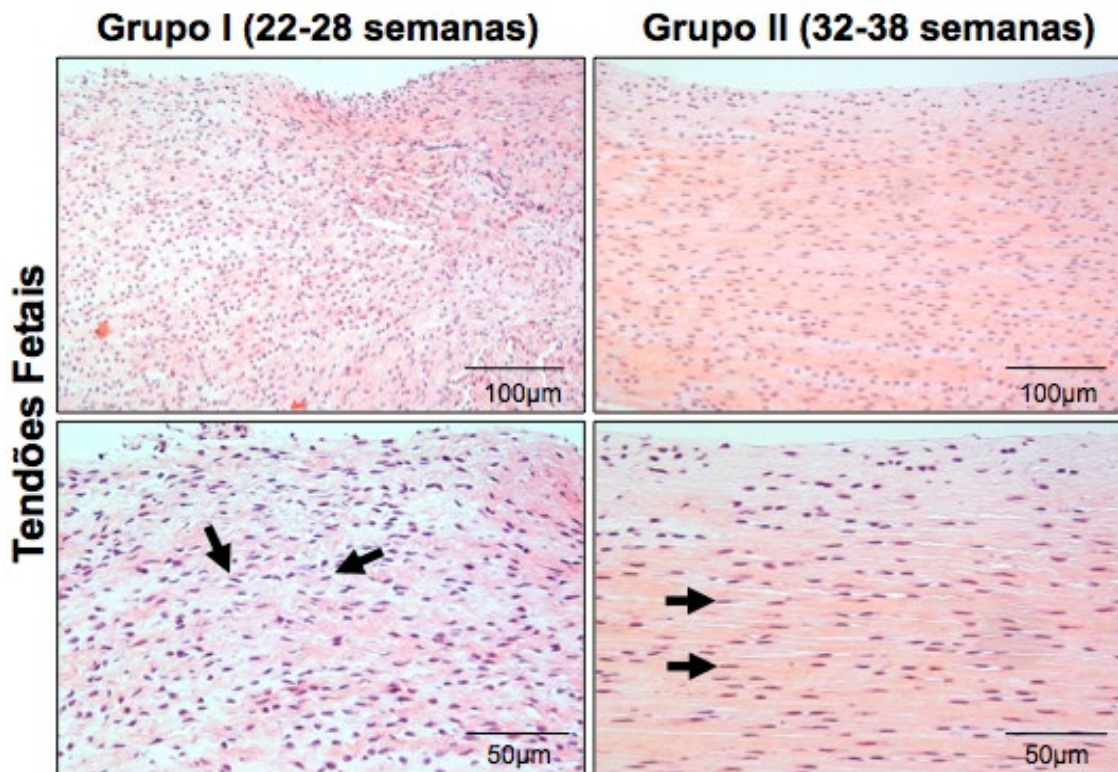


Figura 6 - Sob microscopia de fluorescência pela coloração DAPI, que caracteriza o núcleo celular, as imagens evidenciam uma maior quantidade de células com padrão de distribuição difuso nos tendões do Grupo I. Nos espécimes de tendão do grupo II, arranjo uniforme e linear dos núcleos (setas brancas)

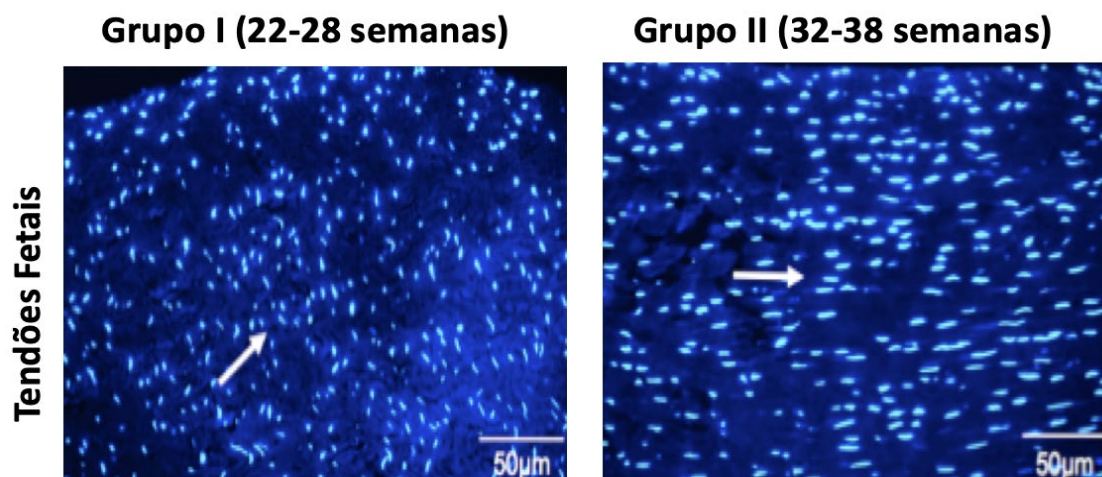
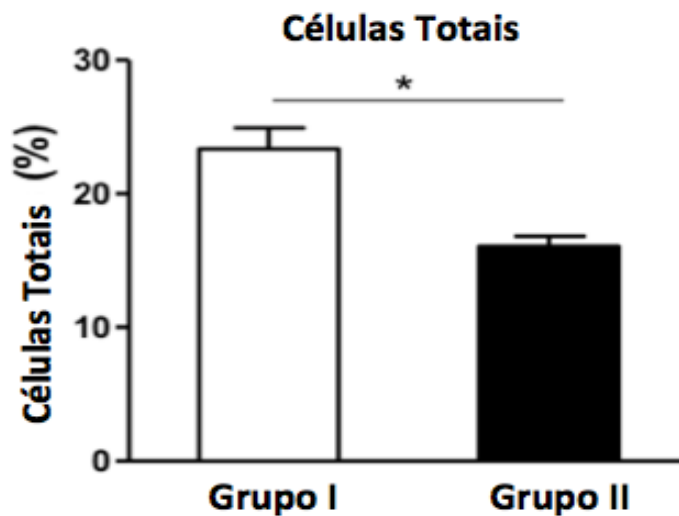


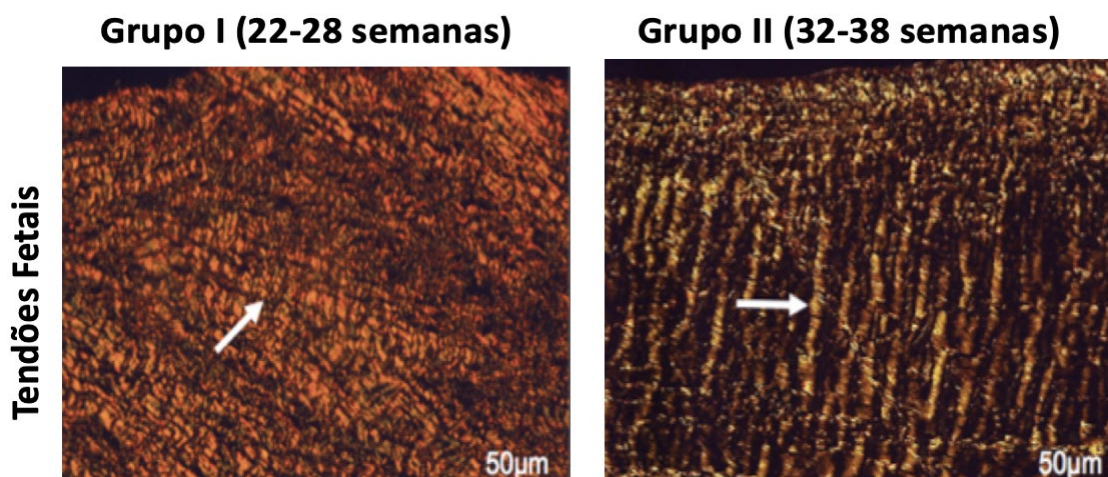
Gráfico 2 - Aumento significativo do percentual de células do grupo I em relação ao grupo II ($p < 0,0357$)



5.3 HISTOARQUITETURA E DISTRIBUIÇÃO DOS COLÁGENOS I, III E V

No Grupo I, foi identificada uma rede de fibras birrefringentes laranja avermelhadas na coloração de Picrosirius. Elas apresentaram um padrão fragmentado e quebrado que cobre toda a superfície do tendão. Em contraste, nos tendões fetais humanos do Grupo II, as fibras de colágeno mostraram uma orientação paralela ou linear do feixe de colágeno presente do tecido (Figura 7).

Figura 7 - Fibras colágenas birrefringentes com coloração laranja avermelhadas, analisadas pela coloração Picrosirius sob polarização no tendão tibial posterior de fetos humanos. No Grupo I, à esquerda, observa-se um padrão fragmentado e desarranjado das fibras, enquanto as fibras de colágeno ficam em orientação paralela ou linear no Grupo II (seta branca)



Na análise do colágeno I, os resultados mostraram um aumento significativo na matriz dos tendões do Grupo II em comparação com os tendões do Grupo I, apresentando respectivamente os seguintes resultados com significância estatística ($51,40\% \pm 1,71\%$ vs. $31,11\% \pm 1,74\%$; $p < 0,0159$) (Figura 8 e Gráfico 3).

Figura 8 - Lâminas com imunomarcção para o colágeno I visualizado na cor verde (setas brancas) em microscopia de fluorescência. Grupo I, à esquerda, e o Grupo II, à direita

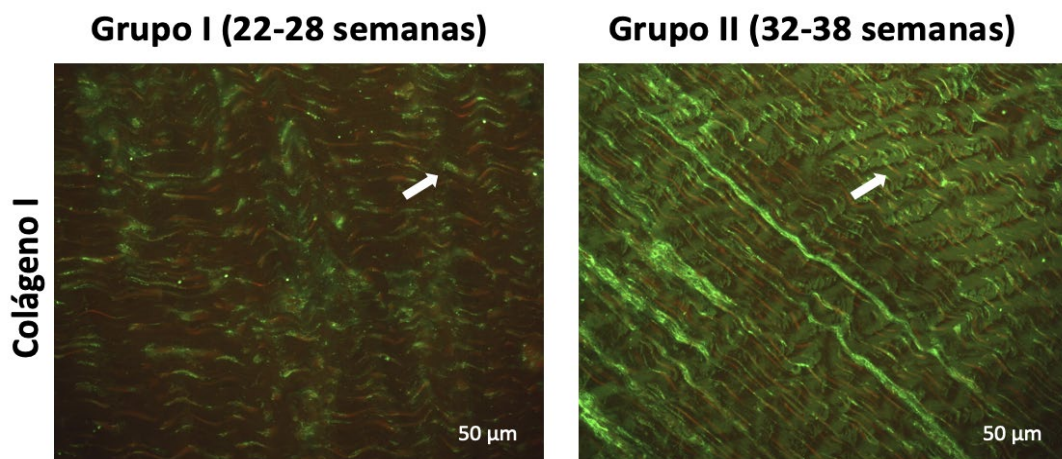
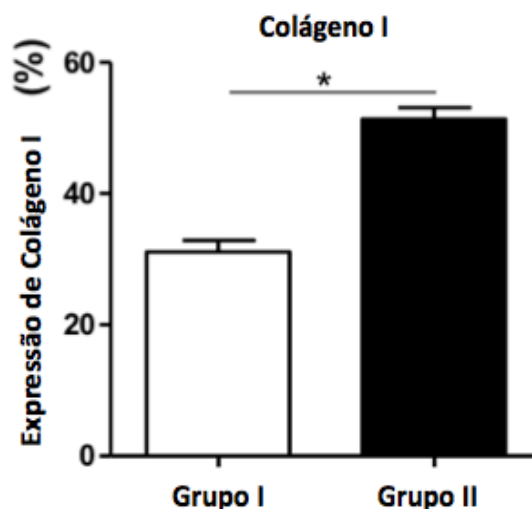


Gráfico 3 - Diferença entre as quantidades de colágeno do tipo I entre os tendões dos grupos I e II ($p < 0,015$)



Na análise de imunofluorescência dos colágenos tipos III (Figura 9) e V (Figura 10), houve uma quantidade significativamente maior de colágeno tipo III nos tendões do Grupo I em comparação ao Grupo II, $31,19\% \pm 2,10\%$ vs. $17,02\% \pm 1,37\%$; $p < 0,015$ (Gráfico 3), bem como colágeno tipo V, $12,52\% \pm 0,76\%$ vs. $4,39\% \pm 0,76\%$; $p < 0,016$ (Gráfico 4).

Figura 9 - Lâminas com imunomarcção para o colágeno III visualizado na cor verde (setas brancas) em microscopia de fluorescência. Grupo I à esquerda e o Grupo II à direita

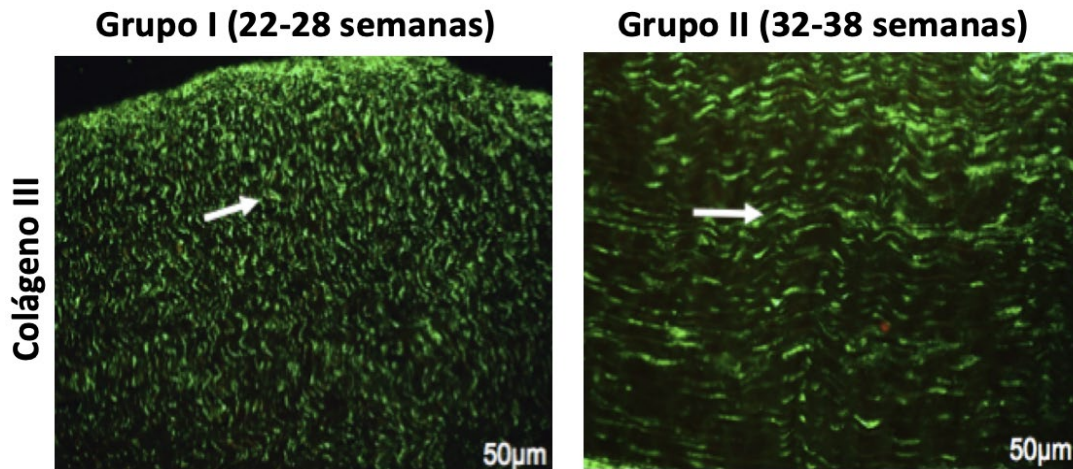


Gráfico 4 - Diferença entre as quantidades de colágeno do tipo III entre os tendões dos grupos I e II ($p < 0,016$)

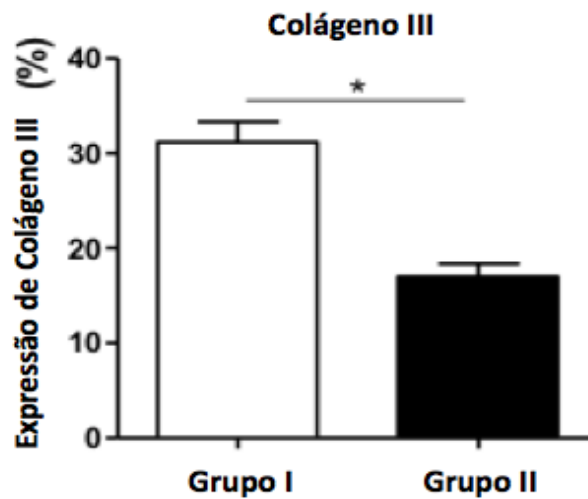


Figura 10 - Lâminas com imunomarcção para o colágeno V visualizado em microscopia de fluorescência com a marcação verde (setas brancas). Grupo I à esquerda e o Grupo II à direita

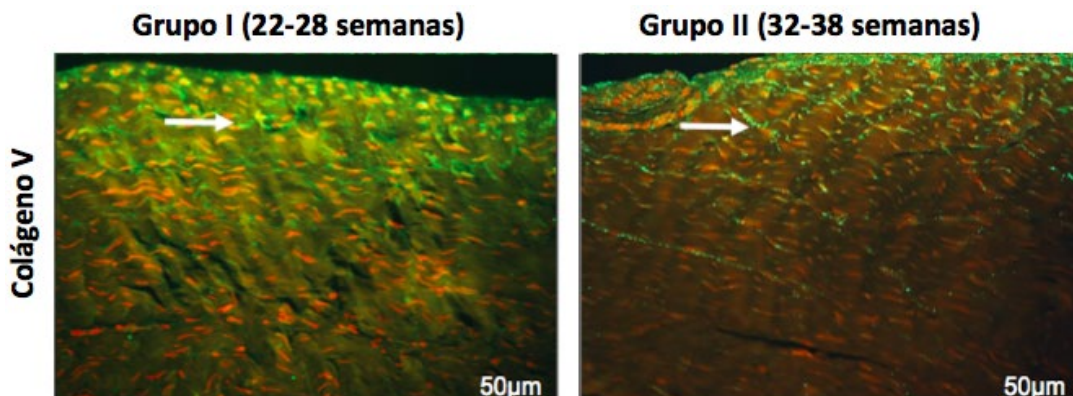
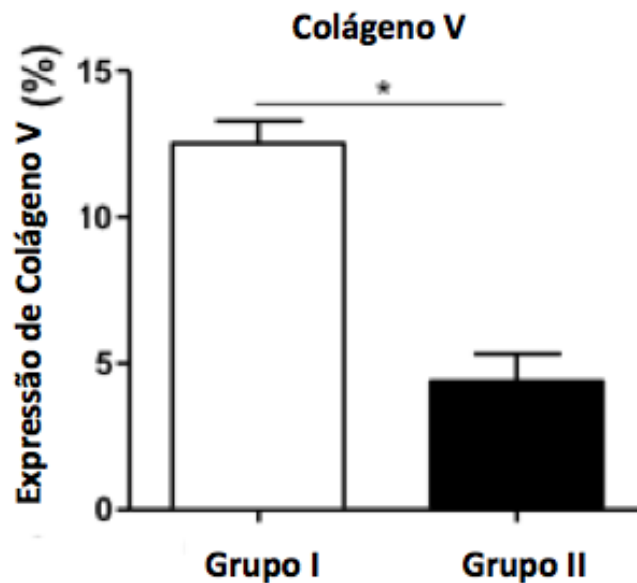


Gráfico 5 - Diferença entre as quantidades de colágeno do tipo V entre os tendões dos grupos I e II ($p < 0,015$)



5.4 IMUNOMARCAÇÃO PARA O CD90

Em relação à imunomarcação para CD90, foi encontrado intensa expressão desse marcador em tendões humanos do Grupo I, quando comparada ao Grupo II (Figura 11). Além disso, os resultados histomorfométricos mostraram uma quantidade significativa de CD90 em tendões fetais humanos do Grupo I, quando comparados ao Grupo II ($7,20 \pm 1,06$ vs. $04,01 \pm 0,51$; $p < 0,0159$) (Gráfico 6). A marcação foi mais intensa na região do endotendão.

Figura 11 - Alta expressão de CD90 em tendões fetais humanos do Grupo I, mais imaturos, quando comparado ao Grupo II. Observa-se a presença intensa de células CD90 positivas em toda a matriz do tendão no Grupo I sob imuno-histoquímica (setas)

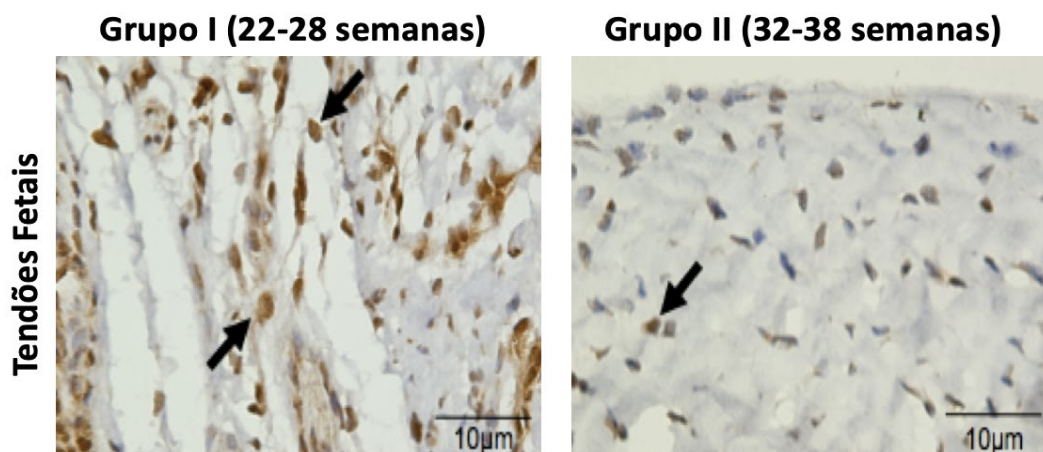
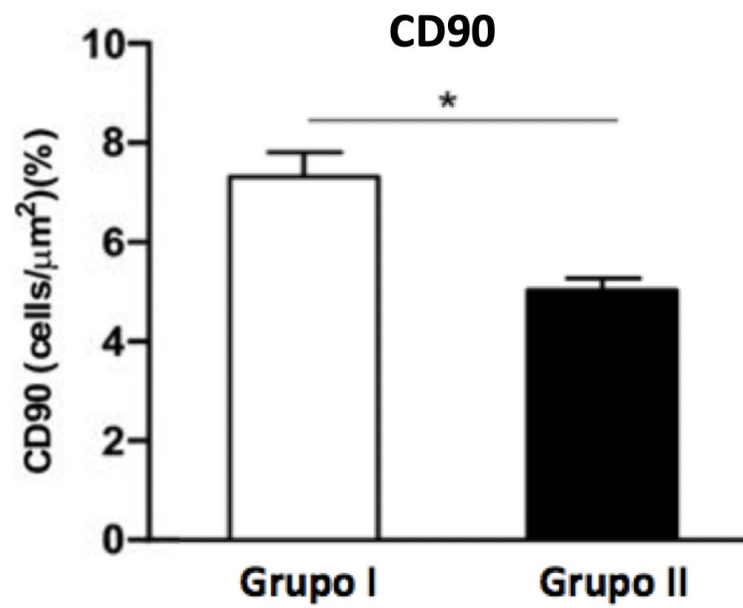


Gráfico 6 - Aumento significativo do percentual de células positivas do Grupo I em relação ao Grupo II para marcação pelo CD90 ($p < 0,015$)



6 DISCUSSÃO

Assim como em outros tecidos conjuntivos, o tendão tibial posterior humano sofre alterações morfológicas e moleculares durante seu desenvolvimento, que envolvem tanto suas características celulares quanto a matriz extracelular. O processo de maturação intraútero do tendão tibial posterior é acompanhado por uma diminuição progressiva da celularidade. Observa-se uma diferença estatística significativa com aumento dos tenócitos por campo no tendão imaturo, confirmando os achados de estudos em tendões de equinos e ovinos descritos por Stanley *et al.*⁸⁴ e Russo *et al.*²⁵ respectivamente. Este é o primeiro estudo a realizar essa avaliação no tendão tibial posterior de fetos humanos.

Além da maior quantidade, as características celulares também mudaram à medida que o tendão se desenvolve. De fato, os espécimes do Grupo I apresentaram células com formatos heterogêneos e em maior quantidade quando comparados aos do Grupo II, que apresentaram células com formato mais fusiforme e em menor número. Avilion *et al.*⁹⁴, em 2003 descrevem achados semelhantes em espécimes de tendões de animais. O fato de não haver evidências de picnose ou fragmentação nuclear à microscopia nos faz supor que essa redução não esteja relacionada à apoptose e sim a diferenciação e redução da velocidade de multiplicação, assim como Hosaka *et al.*⁸⁶ e Chuen *et al.*⁸⁵ apresentam resultados semelhantes em flexores digitais de cavalos e tendões patelares humanos respectivamente.

Amostras de tecido de tendão fetal mais jovens apresentaram maior quantidade de células imunomarcadas para CD90, um dos marcadores de células-tronco mesenquimais humanas, em comparação com tendões mais maduros. Russo *et al.*²⁵ também demonstraram alta expressão de marcadores que caracterizam células mesenquimais em tendões fetais de ovelhas mais jovens quando comparados a tendões fetais mais maduros e adultos. A presença dessas células foi observada principalmente próximo aos vasos sanguíneos, no endotendão, e conforme demonstrado por Lui *et al.*⁶¹ em sua avaliação de tendões adultos, essa localização sugere que elas podem apresentar resposta a sinais reguladores locais ou sistêmicos. Caplan *et al.*⁶⁰ demonstram que moléculas bioativas secretadas por essas células foram capazes de promover neovascularização, migração, imunorregulação, proliferação celular, síntese e remodelamento da matriz extracelular no tecido. No entanto, os autores afirmam que ainda não está claro se as células-tronco do tendão funcionam para substituir os tendões danificados ou para estabelecer um microambiente para o reparo de lesões. Seja qual for o seu papel, em qualquer uma

das possibilidades, entender os mecanismos de ativação celular dessa linhagem podem auxiliar no estímulo à regeneração tecidual após um dano.

A caracterização das células-tronco mesenquimais teve como objetivo identificar em qual fase do desenvolvimento tecidual ela esteve presente em maior quantidade. A sua presença em maior quantidade nas fases iniciais sugere que a constituição da matriz fibrilar do tendão possa estar ligada a maior presença dessas células durante o desenvolvimento do tecido tendíneo no feto humano. No entanto, outros marcadores que caracterizassem essa linhagem celular seriam necessários para sustentar essa hipótese. Por outro lado, a indicação de maior quantidade de células que expressam CD90 pode ser considerado um forte indício da participação dessas células na maturação do tendão do feto humano.

No presente estudo, o tendão tibial posterior de fetos em diferentes idades gestacionais apresentou colágeno tipos I, III e V em diferentes quantidades e padrão de distribuição distinto. Tresoldi *et al.*²² afirmam que a fibrilogênese começa durante a embriogênese e continua após o nascimento com a montagem de moléculas de colágeno tipo I, que seguem o crescimento linear e lateral associado às interações do colágeno com proteínas, sejam elas outros colágenos ou proteoglicanos por exemplo. Inicialmente, as moléculas de colágeno se agrupam para formar intermediários de fibrilas imaturas e, após essa montagem molecular, os intermediários de fibrilas se agrupam de ponta a ponta para formar fibrilas mais longas, consistentes com fibrilas maduras mecanicamente funcionais. Esses dados corroboram achados no tendão tibial posterior de fetos humanos, em que a quantidade e o padrão de organização do colágeno tipo I aumentaram em fetos mais maduros em comparação aos mais jovens.

Os fetos mais jovens apresentam colágeno tipo III em maior quantidade em relação aos fetos mais maduros. Tozer e Duprez⁵¹ afirmam que a expressão do colágeno III diminui gradualmente durante o desenvolvimento e que sua alta expressão nos estágios iniciais sugere um papel na montagem inicial da fibrila. Além disso, sua expressão é elevada após lesão tecidual, sugerindo que esse colágeno pode desempenhar um papel no processo de cicatrização, talvez por essa relação na montagem da fibra e estímulo da fibrilogênese. Romanic *et al.*⁵² avaliam que o colágeno III, na forma de procolágeno III, pode regular o diâmetro das fibrilas de colágeno I, revestindo sua superfície, permitindo assim o crescimento longitudinal, mas não o crescimento lateral das fibrilas com eventual espessamento do tecido tendinoso.

Nesse estudo, os fetos mais jovens apresentaram maior quantidade de colágeno tipo V quando comparados aos fetos mais maduros. Isso corrobora os dados apresentados na literatura e sugere maior capacidade de regulação e organização de tecidos imaturos. Hansen *et al.*⁵³ demonstram que o colágeno tipo V desempenha o papel de ligante molecular entre as fibrilas de colágeno I ou entre fibrilas e macromoléculas, dependendo de sua respectiva distribuição em diferentes tecidos, estando assim associado à quantidade e qualidade da distribuição das fibras de colágeno I no tendão.

Connizzo *et al.*⁵⁴ demonstram que, após a deleção dos genes responsáveis pela produção do colágeno tipo V em camundongos, ocorre uma montagem de fibrilas de grande diâmetro e distribuição difusa, características semelhantes às fibrilas produzidas em tecidos conjuntivos com baixas concentrações desse colágeno. Isso sugere que os níveis de colágeno tipo V regulam o diâmetro das fibrilas e que sua redução pode ser suficiente para alterar a montagem das fibrilas de modo que fibrilas de diâmetro anormalmente grandes sejam depositadas na matriz.

Compreender mais profundamente as propriedades intrínsecas da organização tecidual dos fetos humanos pode ajudar em uma possível modulação da resposta do tecido tendíneo maduro à lesão. Sem dúvida, existem muito mais moléculas envolvidas nessa resposta do que podem ser examinadas em uma única investigação, o que é um ponto fraco do presente trabalho. Pensando em uma possível aplicação terapêutica desses resultados, alguns estudos sugerem a ideia de se isolar e utilizar as citocinas que participam da cicatrização tendínea, no entanto esse processo parece ser complexo e composto múltiplas interações entre as diferentes moléculas, tornando a missão de estabelecer um equilíbrio perfeito para a cicatrização do tendão quase impossível²⁴. Por outro lado, as células fetais apresentam um equilíbrio natural em relação à produção e liberação dessas citocinas, podendo ser elas mesmas os efetores de um reparo sem cicatriz, se utilizadas para uso terapêutico^{88,95}. O presente estudo começa a fornecer informações sobre os complexos mecanismos que controlam o processo de maturação e organização dos tendões humanos, e as informações deste projeto podem ser o ponto de partida para o desenvolvimento de terapias inovadoras para minimizar a formação de cicatrizes após lesões tendíneas.

7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados apresentados, pode-se concluir que durante o desenvolvimento embriológico do tendão tibial posterior em fetos humanos ocorre uma modificação tanto quantitativa como qualitativa da celularidade e dos colágenos que compõem a matriz extracelular:

Em relação aos colágenos há um aumento do tipo I durante o desenvolvimento bem como uma redução dos colágenos organizacionais tipo III e tipo V, com uma organização progressiva das fibrilas.

O número total de células reduz durante o desenvolvimento tendíneo, assim como a presença de células-tronco mesenquimais.

REFERÊNCIAS‡

‡ De acordo com Estilo Vancouver.

1. Bloome DM, Marymont JV, Varner KE. Variations on the insertion of the posterior tibialis tendon: a cadaveric study. *Foot Ankle Int.* 2003 Oct;24(10):780–3.
2. Deland JT, de Asla RJ, Sung IH, Ernberg LA, Potter HG. Posterior tibial tendon insufficiency: which ligaments are involved? *Foot Ankle Int.* 2005 Jun;26(6):427–35.
3. Myerson MS, Thordarson DB, Johnson JE, Hintermann B, Sangeorzan BJ, Deland JT, et al. Classification and Nomenclature: Progressive Collapsing Foot Deformity. *Foot Ankle Int.* 2020 Oct;41(10):1271–6.
4. Kohls-Gatzoulis J, Angel J, Singh D. Tibialis posterior dysfunction as a cause of flatfeet in elderly patients. *The Foot.* 2004 Dec 1;14(4):207–9.
5. Albano D, Martinelli N, Bianchi A, Romeo G, Bulfamante G, Galia M, et al. Posterior tibial tendon dysfunction: Clinical and magnetic resonance imaging findings having histology as reference standard. *Eur J Radiol.* 2018 Feb;99:55–61.
6. Pinney SJ, Lin SS. Current concept review: acquired adult flatfoot deformity. *Foot Ankle Int.* 2006 Jan;27(1):66–75.
7. Bernasconi A, Vacas E, Godoy-Santos AL, Lintz F. Progressive collapsing foot deformity: How should we translate it into Neo-Latin languages? *Foot Ankle Surg.* 2021 Dec;27(8):949–50.
8. Mosier SM, Lucas DR, Pomeroy G, Manoli A 2nd. Pathology of the posterior tibial tendon in posterior tibial tendon insufficiency. *Foot Ankle Int.* 1998 Aug;19(8):520–4.
9. Hintermann B, Deland JT, de Cesar Netto C, Ellis SJ, Johnson JE, Myerson MS, et al. Consensus on Indications for Isolated Subtalar Joint Fusion and Naviculocuneiform Fusions for Progressive Collapsing Foot Deformity. *Foot Ankle Int.* 2020 Oct;41(10):1295–8.
10. Johnson JE, Sangeorzan BJ, de Cesar Netto C, Deland JT, Ellis SJ, Hintermann B, et al. Consensus on Indications for Medial Cuneiform Opening Wedge (Cotton) Osteotomy in the Treatment of Progressive Collapsing Foot Deformity. *Foot Ankle Int.* 2020 Oct;41(10):1289–91.
11. C Schon L, de Cesar Netto C, Day J, Deland JT, Hintermann B, Johnson JE, et al. Consensus for the Indication of a Medializing Displacement Calcaneal Osteotomy in the Treatment of Progressive Collapsing Foot Deformity. *Foot Ankle Int.* 2020 Oct;41(10):1282–5.
12. Sangeorzan BJ, Hintermann B, de Cesar Netto C, Day J, Deland JT, Ellis SJ, et al. Progressive Collapsing Foot Deformity: Consensus on Goals for Operative Correction. *Foot Ankle Int.* 2020 Oct;41(10):1299–302.

13. Thordarson DB, Schon LC, de Cesar Netto C, Deland JT, Ellis SJ, Johnson JE, et al. Consensus for the Indication of Lateral Column Lengthening in the Treatment of Progressive Collapsing Foot Deformity. *Foot Ankle Int.* 2020 Oct;41(10):1286–8.
14. Satomi E, Teodoro WR, Parra ER, Fernandes TD, Velosa APP, Capelozzi VL, et al. Changes in histoanatomical distribution of types I, III and V collagen promote adaptative remodeling in posterior tibial tendon rupture. *Clinics.* 2008 Feb;63(1):9–14.
15. Lin TWTW, Cardenas L, Soslowsky LJJ. Biomechanics of tendon injury and repair. *J Biomech.* 2004 Jun;37(6):865–77.
16. Thomopoulos S, Parks WC, Rifkin DB, Derwin KA. Mechanisms of tendon injury and repair. *J Orthop Res.* 2015 Jun;33(6):832–9.
17. Dymont NA, Galloway JL. Regenerative Biology of Tendon: Mechanisms for Renewal and Repair. *Current Molecular Biology Reports.* 2015 Sep 1;1(3):124–31.
18. Voleti PB, Buckley MR, Soslowsky LJ. Tendon Healing: Repair and Regeneration. *Annu Rev Biomed Eng.* 2012 Aug 15;14(1):47–71.
19. Mosier SM, Lucas DR, Pomeroy G, Manoli A 2nd. Pathology of the posterior tibial tendon in posterior tibial tendon insufficiency. *Foot Ankle Int.* 1998 Aug;19(8):520–4.
20. Teodoro WR, Velosa AP, Witzel SS, Garippo AL, Farhat C, Parra ER, et al. Architectural remodelling in lungs of rabbits induced by type V collagen immunization: a preliminary morphologic model to study diffuse connective tissue diseases. *Pathology - Research and Practice.* 2004 Dec 15;200(10):681–91.
21. Gonçalves-Neto J, Witzel SS, Teodoro WR, Carvalho-Junior AE, Fernandes TD, Yoshinari HH. Changes in collagen matrix composition in human posterior tibial tendon dysfunction. *Joint Bone Spine.* 2002;69:189–94.
22. Tresoldi I, Oliva F, Benvenuto M, Fantini M, Masuelli L, Bei R, et al. Tendon's ultrastructure. *Muscles Ligaments Tendons J.* 2013 Jan;3(1):2–6.
23. Stalling SS, Nicoll SB. Fetal ACL fibroblasts exhibit enhanced cellular properties compared with adults. *Clin Orthop Relat Res.* 2008 Dec;466(12):3130–7.
24. Beredjikian PK, Favata M, Cartmell JS, Flanagan CL, Crombleholme TM, Soslowsky LJ. Regenerative versus reparative healing in tendon: a study of biomechanical and histological properties in fetal sheep. *Ann Biomed Eng.* 2003 Nov;31(10):1143–52.
25. Russo V, Mauro A, Martelli A, Di Giacinto O, Di Marcantonio L, Nardinocchi D, et al. Cellular and molecular maturation in fetal and adult ovine calcaneal tendons. *J Anat.* 2015 Feb;226(2):126–42.

26. Silva H, Conboy IM. Aging and stem cell renewal. In: StemBook. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute; 2008.
27. Favata M, Beredjiklian PK, Zgonis MH, Beason DP, Crombleholme TM, Jawad AF, et al. Regenerative properties of fetal sheep tendon are not adversely affected by transplantation into an adult environment. *J Orthop Res*. 2006 Nov;24(11):2124–32.
28. Lui PPY. Identity of tendon stem cells--how much do we know? *J Cell Mol Med*. 2013 Jan;17(1):55–64.
29. Waśniewska-Włodarczyk A, Paulsen F, Olewnik Ł, Polguy M. Morphological variability of the plantaris tendon in the human fetus. *Sci Rep*. 2021 Aug 19;11(1):16871.
30. Karauda P, Paulsen F, Polguy M, Diogo R, Olewnik Ł. Morphological variability of the fibularis tertius tendon in human fetuses. *Folia Morphol*. 2022;81(2):451–7.
31. Olewnik Ł, Zielinska N, Ruzik K, Podgórski M, Paulsen F, Diogo R, et al. Morphological variability of the fibularis longus tendon in human fetuses. *Ann Anat*. 2022 Jan;239:151838.
32. Dziejczak DW, Bogacka U, Komarnińska I, Ciszek B. Anatomy and morphometry of the distal gracilis muscle tendon in adults and fetuses. *Folia Morphol*. 2018;77(1):138–43.
33. de la Cuadra-Blanco C, Arráez-Aybar LA, Murillo-González JA, Herrera-Lara ME, Mérida-Velasco JA, Mérida-Velasco JR. Development of the Human Biceps Brachii Tendon and Coracoglenoid Ligament (7th-12th Week of Development). *Cells Tissues Organs*. 2017 Feb 10;203(6):365–73.
34. Holm-Pedersen P, Viidik A. Tensile properties and morphology of healing wounds in young and old rats. *Scand J Plast Reconstr Surg*. 1972;6(1):24–35.
35. Ippolito E, Natali PG, Postacchini F, Accinni L, De Martino C. Morphological, immunochemical, and biochemical study of rabbit achilles tendon at various ages. *J Bone Joint Surg Am*. 1980;62(4):583–98.
36. Whitby DJ, Ferguson MW. The extracellular matrix of lip wounds in fetal, neonatal and adult mice. *Development*. 1991 Jun;112(2):651–68.
37. Rodríguez-Vázquez JF, Jin ZW, Zhao P, Murakami G, Li XW, Jin Y. Development of digastric muscles in human fetuses: a review and findings in the flexor digitorum superficialis muscle. *Folia Morphol*. 2018;77(2):362–70.
38. Naito M, Suzuki R, Abe H, Rodríguez-Vázquez JF, Murakami G, Aizawa S. Fetal Development of the Human Obturator Internus Muscle With Special Reference to the Tendon and Pulley. *Anat Rec*. 2015 Jul;298(7):1282–93.

39. Hayashi S, Kim JH, Jin ZW, Murakami G, Rodríguez-Vázquez JF, Abe H. Development and growth of the calcaneal tendon sheath with special reference to its topographical relationship with the tendon of the plantaris muscle: a histological study of human fetuses. *Surg Radiol Anat.* 2023 Mar;45(3):247–53.
40. de Albornoz PM, Aicale R, Forriol F, Maffulli N. Cell Therapies in Tendon, Ligament, and Musculoskeletal System Repair. *Sports Med Arthrosc.* 2018 Jun;26(2):48–58.
41. Migliorini F, Tingart M, Maffulli N. Progress with stem cell therapies for tendon tissue regeneration. *Expert Opin Biol Ther.* 2020 Nov;20(11):1373–9.
42. Birk DE, Trelstad RL. Extracellular compartments in tendon morphogenesis: collagen fibril, bundle, and macroaggregate formation. *J Cell Biol.* 1986 Jul;103(1):231–40.
43. Atkinson TS, Ewers BJ, Haut RC. The tensile and stress relaxation responses of human patellar tendon varies with specimen cross-sectional area. *J Biomech.* 1999 Sep;32(9):907–14.
44. Einhorn T, O’Keefe R, Buckwalter J. Orthopaedic basic science: foundations of clinical practice. 2007 [cited 2021 Dec 25]; Available from: <https://www.semanticscholar.org/paper/61df32e8efda24971925adafbe33515055a6540b>
45. Asahara H, Inui M, Lotz MK. Tendons and Ligaments: Connecting Developmental Biology to Musculoskeletal Disease Pathogenesis. *J Bone Miner Res.* 2017 Sep;32(9):1773–82.
46. Kalamajski S, Oldberg A. The role of small leucine-rich proteoglycans in collagen fibrillogenesis. *Matrix Biol.* 2010 May;29(4):248–53.
47. Dourte LM, Pathmanathan L, Jawad AF, Iozzo RV, Mienaltowski MJ, Birk DE, et al. Influence of decorin on the mechanical, compositional, and structural properties of the mouse patellar tendon. *J Biomech Eng.* 2012 Mar;134(3):031005.
48. Connizzo BK, Yannascoli SM, Soslowsky LJ. Structure-function relationships of postnatal tendon development: a parallel to healing. *Matrix Biol.* 2013 Mar 11;32(2):106–16.
49. Kadler KE, Holmes DF, Trotter JA, Chapman JA. Collagen fibril formation. *Biochem J.* 1996 May 15;316 (Pt 1):1–11.
50. Zhang G, Young BB, Ezura Y, Favata M, Soslowsky LJ, Chakravarti S, et al. Development of tendon structure and function: regulation of collagen fibrillogenesis. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2005 Mar;5(1):5–21.
51. Tozer S, Duprez D. Tendon and ligament: development, repair and disease. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2005 Sep;75(3):226–36.

52. Romanic AM, Adachi E, Kadler KE, Hojima Y, Prockop DJ. Copolymerization of pNcollagen III and collagen I. pNcollagen III decreases the rate of incorporation of collagen I into fibrils, the amount of collagen I incorporated, and the diameter of the fibrils formed. *J Biol Chem*. 1991 Jul 5;266(19):12703–9.
53. Hansen KA, Weiss JA, Barton JK. Recruitment of tendon crimp with applied tensile strain. *J Biomech Eng*. 2002 Feb;124(1):72–7.
54. Connizzo BK, Han L, Birk DE, Soslowsky LJ. Collagen V-heterozygous and -null supraspinatus tendons exhibit altered dynamic mechanical behaviour at multiple hierarchical scales. *Interface Focus*. 2016 Feb 6;6(1):20150043.
55. O'Brien M. Structure and metabolism of tendons. *Scand J Med Sci Sports*. 1997 Apr;7(2):55–61.
56. Steinert AF, Kunz M, Prager P, Barthel T, Jakob F, Nöth U, et al. Mesenchymal stem cell characteristics of human anterior cruciate ligament outgrowth cells. *Tissue Eng Part A*. 2011 May;17(9-10):1375–88.
57. Dekoninck S, Blanpain C. Stem cell dynamics, migration and plasticity during wound healing. *Nat Cell Biol*. 2019 Jan;21(1):18–24.
58. Poliwoda S, Noor N, Downs E, Schaaf A, Cantwell A, Ganti L, et al. Stem cells: a comprehensive review of origins and emerging clinical roles in medical practice. *Orthop Rev*. 2022 Aug 25;14(3):37498.
59. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991 Sep;9(5):641–50.
60. Caplan AI. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J Pathol*. 2009 Jan;217(2):318–24.
61. Rui YF, Lui PPY, Wong YM, Tan Q, Chan KM. Altered fate of tendon-derived stem cells isolated from a failed tendon-healing animal model of tendinopathy. *Stem Cells Dev*. 2013 Apr 1;22(7):1076–85.
62. Houlihan DD, Mabuchi Y, Morikawa S, Niibe K, Araki D, Suzuki S, et al. Isolation of mouse mesenchymal stem cells on the basis of expression of Sca-1 and PDGFR- α . *Nat Protoc*. 2012 Dec;7(12):2103–11.
63. Zou D, Vigen M, Putnam AJ, Cao C, Tarlé SA, Guinn T, et al. Phenotypic, trophic, and regenerative properties of mesenchymal stem cells from different osseous tissues. *Cell Tissue Res*. 2022 Apr;388(1):75–88.
64. Cristante AF, Narazaki DK. Avanços no uso de células-tronco em ortopedia. *Rev Bras Ortop*. 2011;46(4):359–67.
65. Lapidus PW, Seidenstein H. Chronic non-specific tenosynovitis with effusion about the ankle; report of three cases. *J Bone Joint Surg Am*. 1950 Jan;32A(1):175–9.
66. Langenskiöld A. Chronic Non-Specific Tenosynovitis of the Tibialis Posterior Tendon. *Acta Orthop Scand*. 1967 Jan 1;38(1-4):301–5.

67. Robin W. Chronic non-specific tendovaginitis of tibialis posterior. *J Bone Joint Surg Br.* 1963 Aug;45:542-5.
68. Johnson KA. Tibialis posterior tendon rupture. *Clin Orthop Relat Res.* 1983 Jul;(177):140-7.
69. Salomão O, Fernandes TD, Carvalho Junior AE, Leivas TP, Tranchitella FB, Nardelli JCC, Filho JHA, Kokron AEV. Avaliação das propriedades mecânicas do tendão do músculo tibial posterior submetido a ensaio de tração axial. *Rev Bras Ortop.* 1994;29(7):483-6.
70. Johnson KA, Strom DE. Tibialis posterior tendon dysfunction. *Clin Orthop Relat Res.* 1989 Feb;(239):196-206.
71. Ansoorge HL, Adams S, Birk DE, Soslowsky LJ. Mechanical, Compositional, and Structural Properties of the Post-natal Mouse Achilles Tendon. *Ann Biomed Eng.* 2011 Jul 1;39(7):1904-13.
72. Mosier SM, Pomeroy G, Manoli II A. Pathoanatomy and Etiology of Posterior Tibial Tendon Dysfunction. *Clin Orthop Relat Res.* 1999;365:12-22.
73. Sarkar K, Uthoff HK. Ultrastructure of the common extensor tendon in tennis elbow. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol.* 1980;386(3):317-30.
74. Regan W, Wold LE, Coonrad R, Morrey BF. Microscopic histopathology of chronic refractory lateral epicondylitis. *Am J Sports Med.* 1992 Nov;20(6):746-9.
75. Fleischmajer R, Perlish JS, Burgeson RE, Shaikh-Bahai F, Timpl R. Type I and type III collagen interactions during fibrillogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 1990;580:161-75.
76. van der Rest M, Garrone R. Collagen family of proteins. *FASEB J.* 1991 Oct;5(13):2814-23.
77. Gautieri A, Vesentini S, Redaelli A, Buehler MJ. Hierarchical Structure and Nanomechanics of Collagen Microfibrils from the Atomistic Scale Up. *Nano Lett.* 2011 Feb 9;11(2):757-66.
78. Andarawis-Puri N, Flatow EL, Soslowsky LJ. Tendon basic science: Development, repair, regeneration, and healing. *J Orthop Res.* 2015 Jun;33(6):780-4.
79. Clegg PD, Strassburg S, Smith RK. Cell phenotypic variation in normal and damaged tendons. *Int J Exp Pathol.* 2007 Aug;88(4):227-35.
80. Zhang J, Wang JHC. Characterization of differential properties of rabbit tendon stem cells and tenocytes. *BMC Musculoskelet Disord.* 2010 Jan 18;11:10.
81. H. Peter Lorenz, M.D., David J. Whitby, M.D., Michael T. Longaker, M.D., and N. Scott Adzick. Fetal Wound Healing. The Ontogeny of Scar Formation in the Non-Human Primate. *Ann Surg.* 1993;217(4):391-6.

82. J. R. Armstrong and M. W. J. Ferguson. Ontogeny of the Skin and the Transition from Scar-Free to Scarring Phenotype during Wound Healing in the Pouch Young of a Marsupial, *Monodelphis domestica*. *Dev Biol*. 1995;169:242–50.
83. Chen W, Fu X, Ge S, Sun T, Zhou G, Jiang D, et al. Ontogeny of expression of transforming growth factor-beta and its receptors and their possible relationship with scarless healing in human fetal skin. *Wound Repair Regen*. 2005 Jan;13(1):68–75.
84. Stanley RL, Fleck RA, Becker DL, Goodship AE, Ralphs JR, Patterson-Kane JC. Gap junction protein expression and cellularity: comparison of immature and adult equine digital tendons. *J Anat*. 2007 Sep;211(3):325–34.
85. Chuen FS, Chuk CY, Ping WY, Nar WW, Kim HL, Ming CK. Immunohistochemical characterization of cells in adult human patellar tendons. *J Histochem Cytochem*. 2004 Sep;52(9):1151–7.
86. Hosaka Y, Kirisawa R, Ueda H, Yamaguchi M, Takehana K. Differences in tumor necrosis factor (TNF)alpha and TNF receptor-1-mediated intracellular signaling factors in normal, inflamed and scar-formed horse tendons. *J Vet Med Sci*. 2005 Oct;67(10):985–91.
87. Helito CP, do Prado Torres JA, Bonadio MB, Aragão JA, de Oliveira LN, Natalino RJ, Pécora JR, Camanho GL, Demange MK. Anterolateral Ligament of the Fetal Knee: An Anatomic and Histological Study. *Am J Sports Med*. 2017;45(1):91-96
88. Grognez A, Scaletta C, Farron A, Raffoul W, Applegate LA. Human Fetal Progenitor Tenocytes for Regenerative Medicine. *Cell Transplant*. 2016;25(3):463–79.
89. Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology*. Elsevier Brasil; 2008. 522 p.
90. Parra ER, Aguiar AC Jr, Teodoro WR, de Souza R, Yoshinari NH, Capelozzi VL. Collagen V and vascular injury promote lung architectural changes in systemic sclerosis. *Clin Respir J*. 2009 Jul;3(3):135–42.
91. Martin P, Teodoro WR, Velosa APP, de Moraes J, Carrasco S, Christmann RB, et al. Abnormal collagen V deposition in dermis correlates with skin thickening and disease activity in systemic sclerosis. *Autoimmun Rev*. 2012 Sep;11(11):827–35.
92. Gundersen HJ, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N, et al. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS*. 1988 Oct;96(10):857–81.
93. Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Møller A, Nielsen K, et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS*. 1988 May;96(5):379–94.

94. Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.* 2003 Jan 1;17(1):126–40.
95. Lorenz HP, Lin RY, Longaker MT, Whitby DJ, Adzick NS. The fetal fibroblast: the effector cell of scarless fetal skin repair. *Plast Reconstr Surg.* 1995 Nov;96(6):1251–9; discussion 1260–1.

ANEXOS

Anexo A - Aprovação Comissão Científica do IOT-HCFMUSP

COMISSÃO CIENTÍFICA

IDENTIFICAÇÃO

Protocolo IOT nº 1340

CEP/FMUSP

Pesquisador Responsável: Prof. Alexandre Leme Godoy dos Santos**Título:** Estudo da síntese e distribuição das proteínas da matriz extracelular em tendões e ligamentos do tornozelo e do retropé em fetos humanos.

APRECIÇÃO GERAL DA PROPOSTA

1º PARECER

- Projeto de pesquisa bem delineado e escrito
- Houve cálculo do tamanho da amostra
- Metodologia adequada
- Cronograma razoável
- TCLE adequado

Deve ser aprovado.

Relator
Comissão Científica
Data: 21/09/2018

=====

DECISÃO DA COMISSÃO CIENTÍFICA EM 21.09.2018: Projeto aprovado.

Após a coleta de assinaturas do DOT/FMUSP, os documentos serão enviados aos pesquisadores para serem anexados à Plataforma Brasil e enviados ao CEP para apreciação.

USP - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FMUSP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO DA SÍNTESE E DISTRIBUIÇÃO DAS PROTEÍNAS DA MATRIZ EXTRACELULAR EM TENDÕES E LIGAMENTOS DO TORNOZELO E DO RETROPÉ EM FETOS HUMANOS

Pesquisador: Alexandre Leme Godoy dos Santos

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 01905018.5.0000.0065

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.031.872

Apresentação do Projeto:

Metodologicamente bem descrito.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo primário deste estudo é avaliar a histoarquitetura e a síntese dos tipos de colágeno dos tendões e ligamentos do tornozelo e retopé em fetos humanos de diferentes faixas etárias gestacionais e comparar com o perfil morfológico e molecular de indivíduos adultos.

Objetivo secundário avaliar as características morfológicas e de síntese da MEC dos tendões e ligamentos do tornozelo e retopé em fetos humanos nos diferentes grupos de faixas etárias.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Risco mínimo, sem benefícios imediatos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa viável e sem restrição ética.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Presentes e adequados.

Recomendações:

Aprovação.

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

Bairro: PACAEMBU

CEP: 01.246-903

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3893-4401

E-mail: cep.fm@usp.br

Anexo B - Aprovação Comitê de Ética em Pesquisa

USP - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FMUSP



Continuação do Parecer: 3.031.872

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendência.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1243174.pdf	08/11/2018 08:43:45		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO.pdf	08/11/2018 08:43:27	Alexandre Leme Godoy dos Santos	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	08/11/2018 08:39:44	Alexandre Leme Godoy dos Santos	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO_DO_PROJETO.pdf	22/10/2018 11:13:23	Alexandre Leme Godoy dos Santos	Aceito
Outros	MANIFESTACAO_SVOC.pdf	22/10/2018 11:13:12	Alexandre Leme Godoy dos Santos	Aceito
Outros	DECLARACAO_LIM_17.pdf	22/10/2018 11:12:56	Alexandre Leme Godoy dos Santos	Aceito
Outros	CADASTRO_DA_PESQUISA.pdf	22/10/2018 11:12:22	Alexandre Leme Godoy dos Santos	Aceito
Folha de Rosto	FOLHA_ROSTO.pdf	22/10/2018 11:11:25	Alexandre Leme Godoy dos Santos	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 22 de Novembro de 2018

Assinado por:

Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira
(Coordenador(a))

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 38
 Bairro: PACAEMBU CEP: 01.246-903
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)3893-4401 E-mail: cep.fm@usp.br

Título do projeto de pesquisa _____

(TCLE versão 1/ colocar data)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPANTE DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: .M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :SEXO: M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA**ESTUDO DA SINTESE E DISTRIBUIÇÃO DAS PROTEÍNAS DA MATRIZ
EXTRACELULAR EM TENDÕES E LIGAMENTOS DO TORNOZELO E DO RETOPÉ EM
FETOS HUMANOS**

PESQUISADOR : Prof. Dr. Alexandre Leme de Godoy Santos

Departamento de Ortopedia e Traumatologia**Laboratório de Matriz Extracelular****Faculdade de Medicina****Universidade de São Paulo**

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO RISCO BAIXO RISCO MAIOR Rubrica do participante
Da pesquisa

Rubrica do pesquisador

Anexo C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título do projeto de pesquisa _____

(TCLE versão 1/ colocar data)

3.DURAÇÃO DA PESQUISA :4 anos

4 – Apresentação:

Convidamos o(a) senhor(a) a participar de uma pesquisa científica. Pesquisa é um conjunto de procedimentos que procura criar ou aumentar o conhecimento sobre um assunto. Estas descobertas embora frequentemente não tragam benefícios diretos ao participante da pesquisa, podem no futuro ser úteis para muitas pessoas.

Para decidir se aceita ou não participar desta pesquisa, o(a) senhor(a) precisa entender o suficiente sobre os riscos e benefícios, para que possa fazer um julgamento consciente. Inicialmente explicaremos as razões da pesquisa. A seguir, forneceremos um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), documento que contém informações sobre a pesquisa, para que leia e discuta com familiares e ou outras pessoas de sua confiança. Uma vez compreendido o objetivo da pesquisa e havendo seu interesse em participar, será solicitada a sua rubrica em todas as páginas do TCLE e sua assinatura na última página. Uma via assinada deste termo deverá ser retida pelo senhor(a) ou por seu representante legal e uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável.

5A) Justificativa, objetivos e procedimentos:

Muitos fatores envolvidos nas lesões degenerativas do tornozelo e retropé em adultos estão relacionados a características anatômicas dos tendões, ligamentos e ossos.

Alterações na composição do tecido tendíneo, normal e doente, estão bem documentados na literatura, e representam fator determinante nas lesões degenerativas. É bem estabelecido também que em diferentes regiões do tendão existem alterações de quantidade e qualidade na composição do colágeno

Poucos estudos avaliam as estruturas tendíneas e ligamentares do tornozelo e retropé, e a composição tecidual na faixa etária fetal, justificando a realização do presente estudo, que consiste na ressecção de pequenos fragmentos dos tendões para análise dos seus componentes.

5B) Desconfortos, riscos e benefícios:

Ao aceitar participar deste estudo, 1 pequena incisão de cerca de 2cm, na região medial de cada perna do feto, será coletado o tendão tibial posterior, que serão encaminhados para avaliação histológica, imunohistoquímica e molecular.

As disseções serão realizadas no serviço de Verificação de Óbitos da Capital da universidade de são Paulo.

Rubrica do participante
Da pesquisa

Rubrica do pesquisador

Título do projeto de pesquisa _____

(TCLE versão 1/ colocar data)

Não há benefício direto para o(a) senhor(a). Estudos científicos baseiam-se na análise de grande número de amostras, sendo impossível estimar o benefício individual de cada paciente incluído no estudo. Pode ser que os resultados deste estudo tragam um benefício para uma parcela de pacientes no futuro. Estes resultados podem levar muitos anos para serem alcançados, por isso qualquer benefício proveniente desse estudo, caso haja, será apenas em longo prazo.

Entretanto, os resultados do presente estudo podem contribuir de maneira significativa para o entendimento da fisiopatologia das doenças relacionadas aos tendões e ligamentos do tornozelo e retopé, auxiliando o desenvolvimento de terapias e prevenções relacionadas a estas patologias.

5C) Forma de acompanhamento e assistência

Em qualquer etapa do estudo, o(a) senhor(a) terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa. O investigador principal é **Prof. Alexandre Leme de Godoy Santos**, que pode ser encontrado no **R. Ovídio Pires de Campos 333, 3º andar, sala do grupo de pé e tornozelo do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do HCFM-USP**. Telefone (11) 2661-6000, horário de atendimento **09-16hs**. O investigador executante é **Rodrigo Sousa Macedo**, que pode ser encontrado na **R. Ovídio Pires de Campos 333, 3º andar, sala do grupo de pé e tornozelo do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do HCFM-USP**. Telefone (11) 2661-6000, horário de atendimento das **09-16hs** horas.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (**CEP-FMUSP**): Av. Dr. Arnaldo, 251 - Cerqueira César - São Paulo - SP -21º andar – sala 36- CEP: 01246-000, horário de atendimento: 8:00-17:00h; Tel: (11) 3893-4401/4407 E-mail: cep.fm@usp.br

5D) Liberdade de recusar-se e retirar-se do estudo

A escolha de entrar ou não nesse estudo é inteiramente sua. Caso o(a) senhor(a) se recuse a participar deste estudo, o(a) senhor(a) receberá o tratamento habitual, sem qualquer tipo de prejuízo ou represália. O(A) senhor(a) também tem o direito de retirar-se deste estudo a qualquer momento, sem qualquer ônus.

5E) Manutenção do sigilo e privacidade

Os dados coletados serão analisados em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente sob qualquer circunstância.

Solicitamos sua autorização para que os dados obtidos nesta pesquisa sejam utilizados em uma publicação científica, meio como os resultados de uma pesquisa são divulgados e compartilhados com a comunidade científica.

5F) O (A) senhor(a) receberá uma via deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Rubrica do participante
Da pesquisa

Rubrica do pesquisador

Título do projeto de pesquisa _____

(TCLE versão 1/ colocar data)

5G) Garantia de Ressarcimento

O(A) senhor(a) não terá qualquer custo, pois o custo desta pesquisa será de responsabilidade do orçamento da pesquisa. O (A) senhor(a) tem direito a ressarcimento em caso de despesas decorrentes da sua participação na pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo: **ESTUDO DA SINTESE E DISTRIBUIÇÃO DAS PROTEÍNAS DA MATRIZ EXTRACELULAR EM TENDÕES E LIGAMENTOS DO TORNOZELO E DO RETROPÉ EM FETOS HUMANOS.**

Eu discuti com o _____ sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar, quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal

Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Data ____ / ____ / ____

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semianalfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____ / ____ / ____

Rubrica do participante
Da pesquisa

Rubrica do pesquisador

Título do projeto de pesquisa _____

(TCLE versão 1/ colocar data)

Assinatura do responsável pelo estudo Data / /

Rubrica do participante
Da pesquisa

Rubrica do pesquisador

Anexo D - Manifestação do Serviço de Verificação de Óbitos da Capital**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
SERVIÇO DE VERIFICAÇÃO DE ÓBITOS DA CAPITAL**

**Manifestação prévia a respeito dos aspectos técnicos relacionados
à obtenção de material de estudo para pesquisa científica**

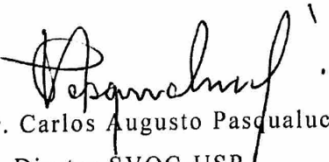
Título da Pesquisa: Estudo da síntese e distribuição das proteínas da matriz extracelular em tendões e ligamentos do tornozelo e do retropé em fetos humanos

Pesquisador Responsável: Alexandre Leme de Godoy Santos

Pesquisador Executante: Rodrigo Sousa Macedo

Em relação aos aspectos técnicos relacionados à obtenção de material de estudo para pesquisa científica mencionada acima, informamos não haver impedimento do ponto de vista técnico e nem risco de mutilação.

São Paulo, 8 de junho de 2018


Prof. Dr. Carlos Augusto Pasqualucci
Diretor SVOC-USP

APÊNDICES

Apêndice A - Artigo publicado

www.nature.com/scientificreports

scientific reports

 Check for updates

OPEN

Histoarchitecture of the fibrillary matrix of human fetal posterior tibial tendons

Rodrigo Sousa Macedo¹, Walcy Rosolia Teodoro², Vera Luiza Capellozzi³,
Dov Lagus Rosenberg^{1,2,3}, Rafael Barban Sposeto¹, Cesar de Cesar Netto⁴,
Jonathan T. Deland⁵, Nicola Maffulli^{6,7,8}, Scott J. Ellis⁵ & Alexandre Leme Godoy-Santos¹

Adult tendons are highly differentiated. In mature individuals, tendon healing after an injury occurs through fibrotic tissue formation. Understanding the intrinsic reparative properties of fetal tendons would help to understand the maturation tissue process and tendon tissue repair. The present study evaluated the evolution of histoarchitecture, cellularity and the distribution of collagens I, III and V in the posterior tibial tendon in human fetuses at different gestational ages. Morphological profiles were assessed in nine fresh spontaneously aborted fetuses (Group I: five fetuses aged between 22 and 28 weeks of gestation; Group II: four fetuses aged between 32 and 38 weeks of gestation), characterized by a combination of histology, fluorescence and immunohistochemistry. In Group I, the posterior tibial tendon showed statistically significant greater cellularity and presence of collagen III and V than in Group II tendon, which showed a predominance of collagenous I and a better organization of the extracellular matrix compared with Group I tendons. In addition, a statistically significant higher rate of CD90, a marker of mesenchymal cells, was found in Group I tendons. In fetuses with gestational age between 22 and 28 weeks, the posterior tibialis tendons showed a thin and disorganized fibrillar structure, with an increase in collagen III and V fibers and mesenchymal cells. In the posterior tibialis tendons of fetuses with gestational age between 32 and 38 weeks, the fibrillar structure was thicker with a statistically significant increase in type I collagen and decreased cellularity.

The posterior tibial tendon (PTT) is the main inverter of the ankle and foot and the primary dynamic stabilizer of the medial plantar arch, acting in conjunction with the capsulo-ligamentous passive stabilizers¹. Posterior tibial tendinopathy is very common, especially in women, in part due to hormonal changes related to the post-menopausal period, with a prevalence of 10% in the seventh decade of life, restricting activity and affecting the quality of life of this population¹⁻⁴. New factors have been implicated in the genesis of pathology, with accelerated development of new techniques, implants, and rehabilitation protocols; however, the posterior tibial tendon remains the primary dynamic arch stabilizer, and tissue healing remains a fundamental factor to achieve optimal clinical results⁵.

Adult tendons are highly differentiated structures that, after an injury, react through a reparative process that results in the formation of a fibrotic scar due to its low regeneration capacity^{6,7}. Tissue alterations are represented by degenerative tendinosis characterized by: neovascularization, mucin deposition and an increase in the quantity and activity of fibroblasts, reflected respectively by the increase in cellularity, proline and hydroxyproline in the

¹Lab. Prof. Manlio Mario Marco Napoli, Departamento de Ortopedia e Traumatologia, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, R. Dr. Ovídio Pires de Campos, 333-Cerqueira César, São Paulo, SP 05403-010, Brazil. ²Rheumatology Division of the Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, FMUSP, São Paulo, Brazil. ³Department of Pathology of the Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, FMUSP, São Paulo, Brazil. ⁴Foot and Ankle Services, Department of Orthopedics and Rehabilitation, University of Iowa, Carver College of Medicine, John Pappajohn Pavilion (JPP), Room 01066, Lower Level, 200 Hawkins Drive, Iowa City, IA 52242, USA. ⁵Department of Foot and Ankle Surgery, Hospital for Special Surgery, New York, NY, USA. ⁶Department of Medicine, Surgery and Dentistry, University of Salerno, Via S. Allende, 84081 Baronissi, SA, Italy. ⁷Barts and the London School of Medicine and Dentistry, Centre for Sports and Exercise Medicine, Mile End Hospital, Queen Mary University of London, 275 Bancroft Road, London E1 4DG, UK. ⁸School of Pharmacy and Bioengineering, Keele University School of Medicine, Stoke on Trent ST5 5BG, UK. [✉]email: dr.dovr@gmail.com

degenerated tendon. Another relevant alteration is the modification of the composition of the different types of collagens in the tendon tissue, with the reduction of type I collagen and a proportional increase of types III and V. These modifications lead to the breakdown of the linear formation of collagens fibers, reflecting a less elastic and resistant tissue^{8–12}.

In contrast, fetal tendon responses to injury are more efficient. It is well established that fetal tissue, especially in the early and middle stages of pregnancy, responds to injury differently from adult tissue^{13,14}. In general, fetal wound healing occurs at a faster rate and in the absence of scar formation. This observation was confirmed in animal models and different tissues, including the tendon¹⁵. Intrinsic fetal regenerative properties are shown by data on matrix composition and changes in tenocyte synthetic activity, which are directly correlated with tissue maturation and aging^{16–18}.

During fetal development, tendons undergo significant changes that transform a plastic tissue into a highly differentiated structure. Tendon maturation is characterized in some studies by its morphological and histo-architectural characteristics, which include cellularity and the organization and distribution of collagens, as well as evaluating the gene expression of factors that correlate with fetal maturity such as Scleraxis B and Tenomodulin. In general, during development, these genes suffer a reduction in expression, which would justify the lower tissue regenerative capacity after maturation^{19,20}. However, most studies on tendon organization and function analyze the tissue of mice, rats, rabbits, horses, and sheep, with a limited number of studies on human fetal tendon histomorphology^{19,21–23}.

We hypothesized that there is a difference in the composition and arrangement of the extracellular matrix of the posterior tibial tendon of human fetuses at earlier stages when compared to the lateral gestational ages. The present study evaluated the evolution of histoarchitecture, cellularity, mesenchymal stem cell markers, and the distribution of collagens I, III and V in the posterior tibial tendon in human fetuses of different gestational ages.

Methods

Our institution's scientific and research ethics committees approved all the procedures described in the present study (Scientific Committee of the Institute of Orthopedics and Traumatology, Faculty of Medicine, University of São Paulo under protocol number 1340 and consubstantial opinion of the Ethics and Research Committee under number 3.031.872). Signed parental informed consent was obtained to examine fetuses obtained from spontaneous abortions and stillbirths. All experiments were performed in accordance with relevant guidelines and regulations, including the Declaration of Helsinki. Gestational ages were determined by the head, buttock length, foot length and fetal weight, and the gestational age mentioned by the parents when signing the consent form (ICF)²⁴.

Inclusion criteria. Spontaneously aborted fetuses with a gestational age between 22 and 38 weeks.

Non-inclusion criteria. Fetuses less than 22 weeks old, given the difficulties in the dissection of the early specimens and the higher chance of malformations or anomalies evident on external inspection or after autopsy.

We obtained a total of 9 fetuses divided into two groups, Group 1: 5 fetuses—22–28 weeks of gestation (mean 24.80 weeks gestational age) and Group 2: 4 fetuses—32–38 weeks of gestation (mean 33.75 weeks of gestational age).

The PTT was collected from both sides of each fetus. These specimens underwent histoarchitecture and histomorphometric analysis of the extracellular matrix components, including collagens I, III and V.

Dissection and specimen preparation. We performed the dissections and resections of the tendons of human fetuses' fragments at the Death Verification Service of the Capital of the University of São Paulo. With the aid of a 15 mm curved scalpel blade, we made an incision of approximately 1 cm over the TTP in the posteromedial region of the ankle. The posterior tibial tendon was identified and was harvested from its origin to insertion (Fig. 1). For the purposes of the histological and morphometric analyses, human fetal tendon samples were immersed in buffered formalin 10% with a Sodium Phosphate buffer solution at pH = 7.0 for staining with hematoxylin–eosin (H&E) and Picrosirius. The solution consists of Sodium Chloride (Code S9888), Potassium Chloride (Code P3911), Potassium Phosphate Monobasic (Code P5655), and Dibasic Sodium Phosphate (Code P71645).

Optical microscopy. Tendon sections (3–4 µm) were used in the deparaffinization process in ethanol and hydrated in graded ethanol. Subsequently, they were stained with hematoxylin guidance (H&E) and instrument evaluations and evaluations at Bx51, Tokyo, Japan) for B51 structure and tissue cell age. Subsequently, from an analysis of tissue collagen in optical analysis, samples were stained by Picrosirius, which is a selective connective tissue staining that allows a qualitative analysis of the collagen fibers of connective tissue, prepared from Sirius red 0.2% here epicry acid solution (Direct Red 80, CI375, Milwaukee, WI).

Collagen types immunofluorescence. For immunostaining of collagen types I, III and V, 3–4 µm sections of tendon tissue samples were adhered to slides with aminosilane (Sigma Chemical Co.; St. Louis, Missouri, USA). They were immersed in xylene and rehydrated in decreasing concentrations of ethanol. The immunogenic sites were exposed to enzymatic treatment with porcine gastric mucosa pepsin (P7000; Sigma Chemical Co.; St. Louis, Missouri, USA) at 10 mg/ml concentration in 0.5 N acetic acid, pH 2.2 for 45 min, at 37 °C. After successive washes with PBS, the slides were incubated in 5% bovine albumin (BSA) and diluted in phosphate buffer pH 7.0 for 30 min. They were subsequently incubated overnight at 4 °C with polyclonal rabbit anti-human Collagen I (1:100, Rockland, Carlsbad, CA, USA), anti-human Collagen III (1:200, Rockland, Carlsbad, CA, USA), and

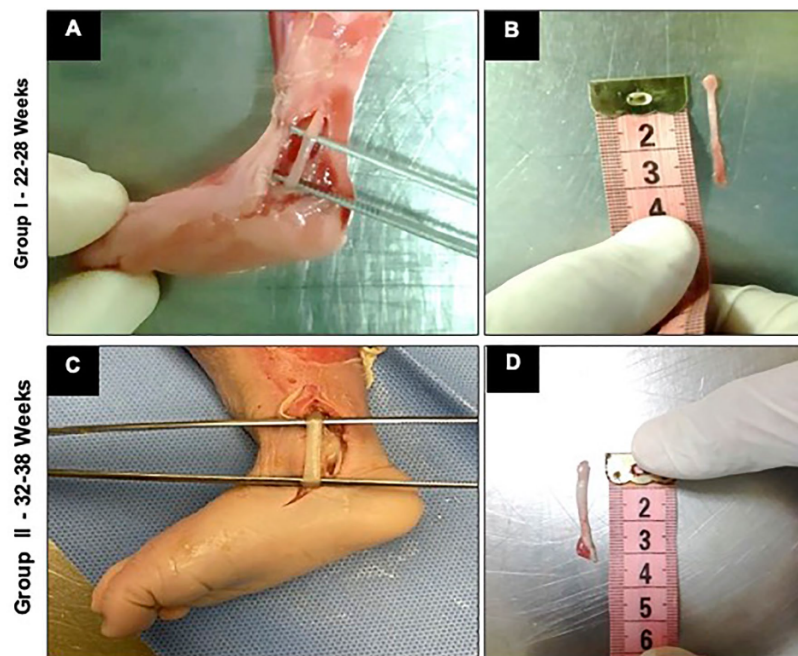


Figure 1. Dissection of tendon specimens. (A,B) Fetuses of Group I from 22 to 28 weeks; (C,D) Fetuses of Group II from 32 to 38 weeks. (A,C) Dissection of the fetus ankle of the tibialis posterior tendon from its origin to its insertion. (B,D) Measurement of the sample obtained from one of the lower limbs of a fetus.

anti-human Collagen V antibodies (1:2000, Rockland, Carlsbad, CA, USA) diluted in BSA (bovine albumin, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) and stained with goat antibody ALEXA FLUOR 488 anti-rabbit IgG (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) diluted 1:200 in a PBS solution containing 0.006% Evans blue. As a negative control, the primary antibody was replaced by PBS. After washing with PBS/0.05% Tween20, the slides were again incubated with 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hoechst 33258 bisbenzimidazole (DAPI) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) to evidence the cell nucleus. Finally, slides were mounted with a glycine buffer in PBS (v/v) and analyzed under a fluorescence microscope (Olympus BX51, Olympus Co, St Laurent, Quebec, Canada)^{12,25}.

Mesenchymal stem cell immunostaining. To analyze mesenchymal stem cells from the tendon tissue, 3–4 μm sections were adhered to slides with aminosilane (Sigma Chemical Co.; St. Louis, Missouri, USA). The slides were immersed in xylene and rehydrated in decreasing concentrations of ethanol. Subsequently, a 0.3% hydrogen peroxide solution was used four times for 5 min to inhibit the activity of endogenous peroxidase, and the antigenic recovery was immediately processed. The immunogenic sites were exposed to enzymatic treatment with porcine gastric mucosa pepsin (P7000; Sigma Chemical Co.; St. Louis, Missouri, USA) at a concentration of 0.4% in glycine buffer pH 2.2 for 30 min at 37 $^{\circ}\text{C}$, and then incubated with CD90 monoclonal primary antibody (Abcam Ab 92574) diluted 1:200 in 0.01% BSA, overnight at 4 $^{\circ}\text{C}$. According to the manufacturer's recommendations, the reaction was developed using a biotin–streptavidin–peroxidase (Novolink Polymer Detection Systems Kit, Leica Biosystems, UK). After that, 3,3'-diaminobenzidine (Sigma Chemical, St. Louis, MO) was used as the chromogen and counterstained with Harris hematoxylin (Merck, Darmstadt, HE Germany). The IgG isotype was used as a negative control. To access uniform and proportional tendon samples, ten fields were randomly analyzed in the tendon at $\times 1000$ magnification for CD90 expression, and the cells count was performed by a manual point count in each field system software Image Pro-Plus 6.0), composed of an Olympus camera (Olympus Co, St Laurent, Quebec, Canada) coupled to an Olympus microscope (Olympus BX51), from which the images were sent to an LG monitor utilizing a digitizing system (Oculus TCX, Coreco, Inc., St. Laurent, Quebec, Canada) The results are reported as the percentage of positive cells in the tendon per micrometer square²⁶.

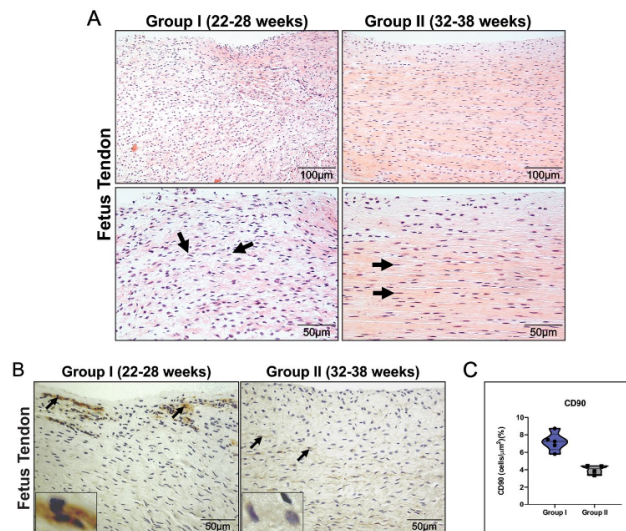


Figure 2. Cell distribution in human fetal tendons. (A) Cell distribution in human fetal tendons—Human fetal tendon samples from Group I (22–28 weeks; $n = 5$) and Group II (32–38 weeks; $n = 4$) show typical histoarchitecture appearance in H&E preparations. At lower magnification, a large number of cells immersed in the fibrillar matrix can be seen in Group I in relation to the tendons in Group II. At higher magnification, note the cells distributed among the collagen fibers in the tendons of Group I (arrows) compared to the tendons of Group II (arrows) (insert) arranged in a linear orientation along the collagen bundles. (B) Immunostaining of CD90 in Group I compared to human fetal tendons in Group II. Note a high expression of CD90 positive cells throughout the tendon matrix in human fetal tendons in Group I (arrows) (insert) and in (C) Graphic representation of CD90 measurement (mean + standard deviation), showing a significant increase in the number of positive cells in Group I compared to Group II (7.20 ± 1.06 vs. 4.01 ± 0.51 cell/ μm^2 ; $p < 0.015$). This graph shows the mean and the value found in the analysis of the dispersion of each specimen in the sample. *GraphPad Prism 6.0 software: Mann–Whitney U test; P-values < 0.05 were considered significant.*

Histomorphometry of tendons. Photomicrographs at magnification 400 \times were obtained from ten non-overlapping fields of view per section under a fluorescence microscope (Olympus BX51, Olympus Co, St Laurent, Quebec, Canada). The images were processed through Image Pro-Plus 6.0 software (NCH Software Inc., Greenwood Village CO, USA), and the immunofluorescence density of collagen I, III, and V fibers were measured. The threshold for identification of collagen fibers was given for all slides after the contrast was increased to the point where the fibers were clearly identified as green bands. Its density was expressed as the ratio between the measurement of the fibers by the total area studied 100 \times . The microscopic fields of the slides were quantified, and the results were shown as the average of these fields.

Statistical analysis. Data are presented as the mean \pm standard deviation of the mean. Statistical analysis was performed using *GraphPad Prism 6.0 software* (GraphPad Prism, Inc., San Diego, CA, USA), and P-values < 0.05 were considered significant. Statistical differences between groups were determined by the *Mann–Whitney U* test for an area of the fraction occupied by mesenchymal cells and immunofluorescence for collagen I, III and V of the tendons. *Post-hoc* tests, corrected for multiple comparisons with the Tukey–Kraemer fit, were used to locate significant differences when significant main effects or interaction effects were shown. *Spearman* correlation was performed between cells and collagen types.

Results

Cell distribution in human fetal tendons. Group I (22–28 weeks) had tendons with a large number of cells with an asymmetric distribution, mainly in the endotenon region, around the tendinous tissue and immersed in collagen bundles, following a pattern of thick scaffolding. In Group II (32–38 weeks), tendons with a lower degree of cellularity were found, with increased parallel or linear orientation of collagen bundles (Fig. 2A). Regarding the presence of mesenchymal cells, we found an intense expression of CD90 in human

tendons in Group I compared to immunostaining in Group II. A high expression of CD90-positive cells in the tendon tissue is characterized by intense cytoplasmic immunostaining in these cells (Fig. 2B). Furthermore, the histomorphometric results showed more CD90 in human fetal tendons in Group I compared to Group II (7.20 ± 1.06 vs. 4.01 ± 0.51 ; $P < 0.0159$), this marker was found mainly in the endotenon (Fig. 2C).

Collagen molecular architecture and cells amount depends on gestational fetus age. In Group I, a network of reddish-orange birefringent fibers in Picrosirius staining was identified, with a fragmented and broken pattern covering the entire surface of the tendon (Fig. 3A,B). In contrast, the collagen fibers in group II human fetal tendons showed a parallel or linear orientation of the tissue collagen bundle (Fig. 3C,D).

Human fetal tendons in Group I showed greater cellularity, with a disordered pattern in all tendon tissues (Fig. 3E,I,M). In Group II tendons, the number of cells decreased, and a linear and uniform pattern oriented in parallel, following the tissue-oriented fibrillar matrix, was evident (Fig. 3G,K,O).

Through histomorphometric analysis, there was a significant increase in cell content in human fetal tendons in Group I compared to tendons in Group II (23.35 ± 1.74 vs. 16.07 ± 0.77 ; $p < 0.0357$) (Fig. 3Q). The immunofluorescence analysis of collagen I showed green fluorescence for collagen type I, with diffuse fiber distribution in all areas of the tendon for Group I. On the other hand, tendons in Group II exhibited marked green fluorescence for collagen type I, with parallel or linear orientation of the collagen bundles (Fig. 3E,H). Quantitative results showed a significant increase in collagen I in Group II tendons compared to Group I tendons, respectively (51.24 ± 1.71 vs. 31.11 ± 1.74 ; $p < 0.0159$) (Fig. 3R). In addition, immunofluorescence analysis of collagen types III and V showed a finely reticulated network of collagen fibers in human fetal tendons in Group I, with diffuse fiber distribution in all tissue areas (Fig. 3J,N). In contrast, Group II tendon specimens showed prominent fluorescence for collagen types III and V arranged in a fine and regular fibrillar fashion with better organization of the extracellular matrix (Fig. 3L,P). There was a significantly greater amount of type III collagen in the tendons of Group I compared to group II, respectively (31.19 ± 2.10 vs. 17.02 ± 1.37 ; $p < 0.015$), as well as type V collagen (12.52 ± 0.76 vs. 4.39 ± 0.76 ; $p < 0.016$) (Fig. 3S,T).

Discussion

As in other connective tissues, the human posterior tibial tendon undergoes morphological and molecular changes during its development, which involve both its cells and the extracellular matrix. The process of in utero maturation of the posterior tibial tendon is accompanied by a progressive decrease in cellularity and modification of tissue structure. We observed a significantly greater number of tenocytes per field in the immature tendon, confirming the findings of studies in equine and sheep tendons^{16,19}. This is the first study to perform this evaluation in the posterior tibial tendon of human fetuses.

During the process of fetal development, there was a reduction in the cellularity of the posterior tibial tendon that accompanied tendon maturation. The endotenon was more robust in younger fetal tendons compared to more mature ones, and cell characteristics also changed as the tendon matured. In fact, the specimens from Group I presented heterogeneous cell shapes and in greater quantity when compared to those from Group II, which presented cells with a more fusiform shape and in smaller numbers. Avilion et al. and Russo et al. have described similar findings in animal tendon specimens^{27,28}. The fact that there is no evidence of pyknosis or nuclear fragmentation under microscopy makes us suppose that this reduction is unrelated to apoptosis. Hosaka et al. and Chuen et al. present similar results in horse digital flexor and human patellar tendons, respectively^{17,18}.

In our study, the posterior tibial tendon of fetuses at different gestational ages presented collagen types I, III and V in different amounts and a distinct distribution pattern. Tresoldi et al. state that fibrillogenesis begins during embryogenesis and continues after birth with the assembly of type I collagen molecules, which follow linear and lateral growth associated with collagen interactions with proteins such as other collagens and proteoglycans¹⁰. Initially, collagen molecules assemble to form immature fibril intermediates, and after this molecular assembly, fibril intermediates assemble end-to-end to form longer fibrils, consistent with mechanically functional mature fibrils. These data corroborate findings in the posterior tibial tendon of human fetuses, in which the amount and pattern of organization of type I collagen increased in more mature fetuses compared to younger ones.

Younger fetuses had collagen type III in greater amounts compared to more mature fetuses. Tozer and Duprez state that collagen III expression gradually decreases during development and that its high expression in the early stages suggests a role in the initial assembly of the fibril. Furthermore, its expression is elevated after tissue injury, suggesting that this collagen may play a role in the healing process, perhaps by stimulating fibrillogenesis²⁹.

Romanic et al. evaluated that collagen III, in the form of procollagen III, can regulate the diameter of collagen I fibrils, coating their surface, thus allowing longitudinal growth, but not lateral growth of fibrils with eventual thickening of the tissue tendon³⁰.

Hansen et al. demonstrate that type V collagen plays the role of a molecular ligand between collagen I fibrils or between fibrils and macromolecules depending on their respective distribution in different tissues³¹. Thus, it is associated with the quantity and quality of the distribution of collagen I fibers and, consequently, of the tendon. Connizzo et al. demonstrated that, after the deletion of the genes responsible for the production of type V collagen in mice, an assembly of fibrils of large diameter and wide distribution occurs, characteristics similar to the fibrils produced in connective tissues with low concentrations of this collagen. This suggests that type V collagen levels regulate fibril diameter and that its reduction may be sufficient to alter fibril assembly so that abnormally large diameter fibrils are deposited in the matrix³². In our study, younger fetuses had a higher amount of type V collagen when compared to more mature fetuses. This corroborates the data presented in the literature and suggests a greater ability to regulate and organize immature tissue.

Younger fetal tendon tissue samples showed a greater amount of cells immunostained for CD90, one of the markers of mesenchymal stem cells, compared to more mature tendons³³. The presence of these cells was

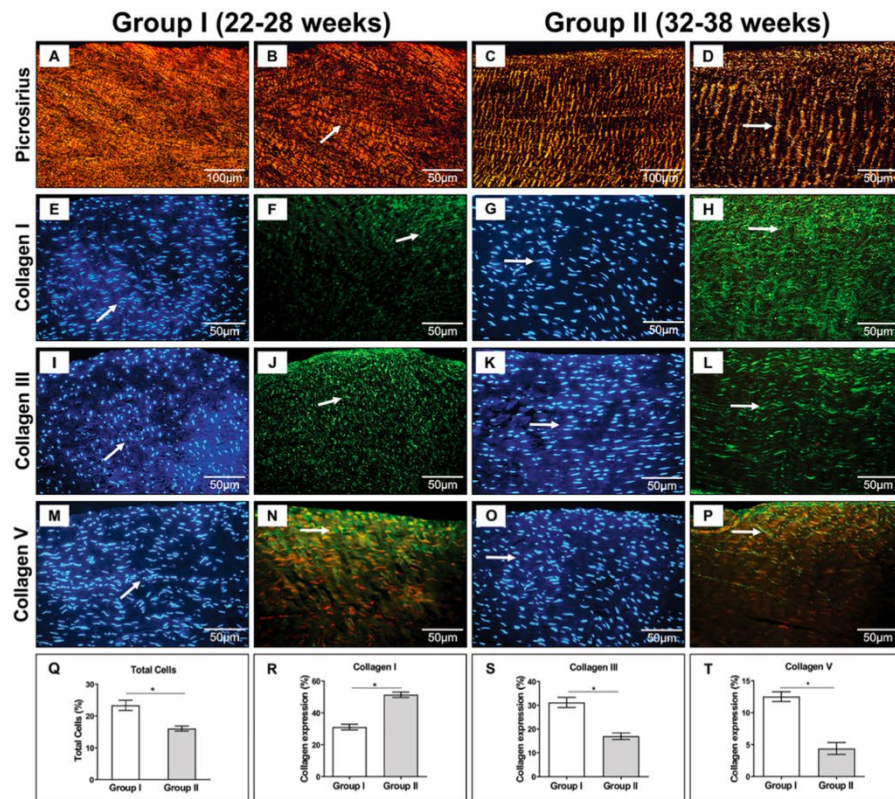


Figure 3. Collagen molecular architecture and cells distribution. (A,B) note reddish-orange birefringent collagen fibers analyzed by picrosirius under polarization in Group I (n = 5) human fetal tendons with a fragmented and disarranged pattern. In contrast, the collagen fibers stay in parallel or linear orientation in Group II (n = 4) tendons, (C,D) (arrows). (E,I,M) fluorescence microscopy by DAPI staining to identify the cell nucleus, with a large amount of cells with diffuse pattern in Group I tendons and in (G,K,O) demonstrate Group II tendon specimens with uniform and linear arrangement of the nuclei (arrows). (F,J,N) Immunostaining to collagen I, III and V visualized under fluorescence microscopy of Group I, demonstrating the reticulated pattern of collagen types. In contrast, (H,L,P) uniform green fluorescence and parallel orientation of collagen type I, III and V fibers in all areas of Group II tendons. (Q) A graphic representation of the total number of cells in Group I compared to Group II tendons (23.35 ± 1.74 vs. 16.07 ± 0.77; p < 0.04). A graphic representation of the amount (percentage of total tendon area, mean and standard deviation) of collagen I (51.40 ± 1.71 vs. 31.19 ± 2.10; p < 0.016) (R), collagen III (31.19 ± 2.10 vs. 17.02 ± 1.37; p < 0.015) (S) and collagen V (12.52 ± 0.76 vs. 4.39 ± 0.76; p < 0.016) (T) in the Group I in compared to Group II tendons. GraphPad Prism 6.0 software: Mann Whitney U test; P-values < 0.05 were considered significant.

observed mainly close to the blood vessels, as demonstrated by Lui et al. in their evaluation of adult tendons, suggesting that they may respond to local and systemic regulatory signals³⁴. Russo et al. also demonstrated a high expression of markers that characterize mesenchymal cells in fetal tendons of younger sheep when compared to more mature and adult fetal tendons¹⁹. Adult mesenchymal stem cells are able to differentiate into: bone, cartilage, muscle, medullary stroma, tendon, ligament, fat, and other connective tissues in a sequence of lineage transitions. Caplan et al. demonstrate that bioactive molecules secreted by these cells were able to promote neovascularization, migration, immunoregulation, cell proliferation, synthesis, and remodeling of the extracellular matrix in the tissue³⁵. However, he states that it is still unclear whether tendon stem cells work to replace damaged tendons or to establish a microenvironment for injury repair. Still, both can occur in vivo after tendon injury.

In the present study, the characterization of mesenchymal stem cells aimed to identify whether the constitution of the fibrillar matrix of the tendon could be linked to the increase of these cells during the development of the tendon tissue of the human fetus. However, other markers that characterize this cell lineage would be necessary to support this hypothesis. On the other hand, the indication of a greater amount of cells that express CD90 may be a strong indication of the participation of these cells in the maturation of the tendon of the human fetus.

Goldman et al. and Russo et al. have already demonstrated a greater association of the amount of TGF β with the production of collagen I and a greater association with mesenchymal stem cells in the endotenon^{19,36}. Our attempt at immunostaining TGF β in a human tendon by immunohistochemistry showed a nonspecific and difficult to interpret the result in tissue. We believe that the fact that the fetuses were removed from the death verification service may have had some influence on this tissue.

A deeper understanding of the intrinsic properties of the response of fetal tissue to injury may allow for the modulation of the response of mature tendon tissue to injury. There are undoubtedly many more molecules involved in this response than can be examined in a single investigation, which is a weakness of the present work. Nevertheless, our study begins to provide information on the complex mechanisms that control the process of maturation and organization of human tendons, and the information from this project can be the starting point for the development of innovative therapies to minimize the formation of scars after tendon injury in humans.

Data availability

All data generated or analysed during this study are included in this published article [and its [supplementary information files](#)].

Received: 4 November 2021; Accepted: 2 September 2022

Published online: 26 October 2022

References

- Bloome, D. M., Marymont, J. V. & Varner, K. E. Variations on the insertion of the posterior tibialis tendon: A cadaveric study. *Foot Ankle Int.* **24**(10), 780–783 (2003).
- Kohls-Gatzoulis, J., Woods, B., Angel, J. C. & Singh, D. The prevalence of symptomatic posterior tibialis tendon dysfunction in women over the age of 40 in England. *Foot Ankle Surg.* **15**(2), 75–81 (2009).
- Ross, M. H., Smith, M., Plinsinga, M. L. & Vicenzino, B. Self-reported social and activity restrictions accompany local impairments in posterior tibial tendon dysfunction: A systematic review. *J. Foot Ankle Res.* **30**(11), 49 (2018).
- Pontin, P. A. et al. ER α PvuII and XbaI polymorphisms in postmenopausal women with posterior tibial tendon dysfunction: A case control study. *J. Orthop. Surg. Res.* **13**(1), 316 (2018).
- Myerson, M. S. et al. Classification and nomenclature: Progressive collapsing foot deformity. *Foot Ankle Int.* **41**(10), 1271–1276 (2020).
- Lin, T. W. T. W., Cardenas, L. & Soslosky, L. J. L. J. Biomechanics of tendon injury and repair. *J. Biomech.* **37**(6), 865–877 (2004).
- Sharma, P. & Maffulli, N. Tendon injury and tendinopathy: Healing and repair. *J. Bone Joint Surg. Am.* **87**(1), 187–202 (2005).
- Mosier, S. M., Lucas, D. R., Pomeroy, G. & Manoli, A. 2nd. Pathology of the posterior tibial tendon in posterior tibial tendon insufficiency. *Foot Ankle Int.* **19**(8), 520–524 (1998).
- Satomi, E. et al. Changes in histoanatomical distribution of types I, III and V collagen promote adaptive remodeling in posterior tibial tendon rupture. *Clinics* **63**(1), 9–14 (2008).
- Tresoldi, I. et al. Tendon's ultrastructure. *Muscles Ligaments Tendons J.* **3**(1), 2–6 (2013).
- Gonçalves-Neto, J. et al. Changes in collagen matrix composition in human posterior tibial tendon dysfunction. *Joint Bone Spine* **69**, 189–194 (2002).
- Teodoro, W. R. et al. Architectural remodeling in lungs of rabbits induced by type V collagen immunization: A preliminary morphologic model to study diffuse connective tissue diseases. *Pathol. Res. Pract.* **200**(10), 681–691 (2004).
- Favata, M. et al. Regenerative properties of fetal sheep tendon are not adversely affected by transplantation into an adult environment. *J. Orthop. Res.* **24**(11), 2124–2132 (2006).
- Stalling, S. S. & Nicoll, S. B. Fetal ACL fibroblasts exhibit enhanced cellular properties compared with adults. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **466**(12), 3130–3137 (2008).
- Beredjikian, P. K. et al. Regenerative versus reparative healing in tendon: A study of biomechanical and histological properties in fetal sheep. *Ann. Biomed. Eng.* **31**(10), 1143–1152 (2003).
- Stanley, R. L. et al. Gap junction protein expression and cellularity: Comparison of immature and adult equine digital tendons. *J. Anat.* **211**(3), 325–334 (2007).
- Chuen, F. S. et al. Immunohistochemical characterization of cells in adult human patellar tendons. *J. Histochem. Cytochem.* **52**(9), 1151–1157 (2004).
- Hosaka, Y., Kirisawa, R., Ueda, H., Yamaguchi, M. & Takehana, K. Differences in tumor necrosis factor (TNF) α and TNF receptor-1-mediated intracellular signaling factors in normal, inflamed and scar-formed horse tendons. *J. Vet. Med. Sci.* **67**(10), 985–991 (2005).
- Russo, V. et al. Cellular and molecular maturation in fetal and adult ovine calcaneal tendons. *J. Anat.* **226**(2), 126–142 (2015).
- Shukunami, C. et al. Scleraxis is a transcriptional activator that regulates the expression of Tenomodulin, a marker of mature tenocytes and ligamentocytes. *Sci. Rep.* **8**(1), 3155 (2018).
- Holm-Pedersen, P. & Viidik, A. Tensile properties and morphology of healing wounds in young and old rats. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg.* **6**(1), 24–35 (1972).
- Ippolito, E., Natali, P. G., Postacchini, F., Accinni, L. & De Martino, C. Morphological, immunochemical, and biochemical study of rabbit achilles tendon at various ages. *J. Bone Joint Surg. Am.* **62**(4), 583–598 (1980).
- Whitby, D. J. & Ferguson, M. W. The extracellular matrix of lip wounds in fetal, neonatal and adult mice. *Development* **112**(2), 651–668 (1991).
- Moore, K. L., Persaud, T. V. N. & Torchia, M. G. *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology* (Elsevier Brasil, 2008).
- Parra, E. R. et al. Collagen V and vascular injury promote lung architectural changes in systemic sclerosis. *Clin. Respir. J.* **3**(3), 135–142 (2009).
- Gundersen, H. J. et al. The new stereological tools: Dissector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* **96**(10), 857–881 (1988).
- Avilion, A. A. et al. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.* **17**(1), 126–140 (2003).

www.nature.com/scientificreports/

28. Russo, V. *et al.* expression of telomerase reverse transcriptase subunit (TERT) and telomere sizing in pig ovarian follicles. *J. Histochem. Cytochem.* **54**(4), 443–455 (2006).
29. Tozer, S. & Duprez, D. Tendon and ligament: Development, repair and disease. *Birth Defects Res. C Embryo Today*. **75**(3), 226–236 (2005).
30. Romanic, A. M., Adachi, E., Kadler, K. E., Hojima, Y. & Prockop, D. J. Copolymerization of pNcollagen III and collagen I. pNcollagen III decreases the rate of incorporation of collagen I into fibrils, the amount of collagen I incorporated, and the diameter of the fibrils formed. *J. Biol. Chem.* **266**(19), 12703–12709 (1991).
31. Hansen, K. A., Weiss, J. A. & Barton, J. K. Recruitment of tendon crimp with applied tensile strain. *J. Biomech. Eng.* **124**(1), 72–77 (2002).
32. Connizzo, B. K., Han, L., Birk, D. E. & Soslowsky, L. J. Collagen V-heterozygous and -null supraspinatus tendons exhibit altered dynamic mechanical behavior at multiple hierarchical scales. *Interface Focus*. **6**(1), 20150043 (2016).
33. Zou, D. *et al.* Phenotypic, trophic, and regenerative properties of mesenchymal stem cells from different osseous tissues. *Cell Tissue Res.* **388**, 75–88 (2022).
34. Lui, P. P. Y. Identity of tendon stem cells—how much do we know?. *J. Cell Mol. Med.* **17**(1), 55–64 (2013).
35. Caplan, A. I. Why are MSCs therapeutic? New data: New insight. *J. Pathol.* **217**(2), 318–324 (2009).
36. Goodman, S. A., May, S. A., Heinegård, D. & Smith, R. K. W. Tenocyte response to cyclical strain and transforming growth factor beta depends upon age and site of origin. *Biorheology* **41**(5), 613–628 (2004).

Author contributions

All authors conceived the studies, and R.S.M., V.L.C. and D.L.R. collected the data. R.S.M., W.R.T., and D.L.R. analyzed the results. R.S.M., W.R.T., and D.L.R. wrote the manuscript, and all authors reviewed and edited the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-022-19695-3>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to D.L.R.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



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 Author(s) 2022

Apêndice B - Pôster: Congresso Brasileiro de Cirurgia do Tornozelo e Pé



ABTPé
Associação Brasileira de Medicina
e Cirurgia do Tornozelo e Pé

CERTIFICADO

A Associação Brasileira de Medicina e Cirurgia
do Tornozelo e Pé - ABTPé certifica que



20º Congresso Brasileiro de
**CIRURGIA DE
TORNOZELO E PÉ**
10 a 15 de agosto de 2022 - Campos do Jordão - SP

CERTIFICAMOS QUE

O trabalho **“HISTOARCHITECTURE OF THE FIBRILLARY MATRIX OF HUMAN FETAL POSTERIOR TIBIAL TENDONS”** dos autores Rodrigo Sousa Macedo, Walcy Rosolia Teodoro, Vera Lucia Capellozzi, Dov Lagos Rosemberg, Rafael Barban Sposetto, Cesar De Cesar Netto, Jonathan T. Deland, Nicola Maffulli, Scott J. Ellis, Alexandre Leme Godoy-Santos foi apresentado no **formato Pôster** durante o **20º Congresso Brasileiro de Cirurgia do Tornozelo e Pé** realizado entre os dias 10 e 13 de agosto em Campos do Jordão – SP.



LUIZ CARLOS RIBEIRO LARA
Presidente da ABTPé - Gestão 2022/2023
Presidente do 20º Congresso Brasileiro
de Cirurgia do Tornozelo e Pé



DRA. JORDANNA MARIA P. BERGAMASCO
Co-Presidente - 20º Congresso Brasileiro
de Cirurgia do Tornozelo e Pé



DR. RAFAEL BARBAN SPOSETTO
Co-Presidente - 20º Congresso Brasileiro
de Cirurgia do Tornozelo e Pé

Apêndice C - Apresentação Oral: Congresso Brasileiro de Ortopedia e Traumatologia



54º Congresso Anual
24-26 Nov 2022 FLORIANÓPOLIS

CERTIFICADO

Certificamos que

RODRIGO SOUSA MACEDO

participou dos Temas Livres, na categoria "**TEMA LIVRE ORAL**",
com o trabalho "**HISTOARCHITECTURE OF THE FIBRILLARY MATRIX OF HUMAN FETAL POSTERIOR TIBIAL TENDONS**",
na qualidade de **Apresentador(a)**, durante o **54º Congresso Anual SBOT**,
realizado pela Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia,
no período de 24 a 26 de novembro de 2022,
no Centro de Convenções de Florianópolis - CentroSul.

Florianópolis, 26 de novembro de 2022.


Jorge dos Santos Silva
Presidente da SBOT


Waldemar de Souza Junior
Presidente do Congresso


João Maurício Barretto
Presidente da Comissão Científica