
CÉSAR DE CÉSAR NETTO

**Estudo histológico e biomecânico da tendinopatia induzida por
injeções seriadas de colagenase: novo modelo experimental no
tendão do calcâneo de coelhos**

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

Programa de Ortopedia e Traumatologia

Orientador: Prof. Dr. Túlio Diniz
Fernandes

São Paulo

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Cesar Netto, Cesar de

Estudo histológico e biomecânico da tendinopatia induzida por injeções
seriadas de colagenase : novo modelo experimental no tendão do calcâneo de
coelhos/ Cesar de Cesar Netto. -- São Paulo, 2017.

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

Programa de Ortopedia e Traumatologia.

Orientador: Túlio Diniz Fernandes.

Descritores: 1.Tendinopatia 2.Tendão do calcâneo 3.Modelos animais
4.Tendinopatia induzida quimicamente 5.Colagenase bacteriana 6.Coelhos

USP/FM/DBD-105/17

Dedicatória

À minha amada esposa Sabrina, amor da minha vida, que sempre esteve ao meu lado, me apoiando nos momentos mais difíceis.

À minha filha Manuela, razão do meu viver.

À minha filha Juliana, que logo estará conosco e nos trará ainda mais alegria.

Aos meus amados pais Luiz Edmundo e Maria Amélia, pelo amor e carinho, e por proporcionarem todas as oportunidades da minha vida.

À minha querida irmã Marcela, eterna companheira, que me presenteou com meus amados sobrinhos Gianluca e Sofia.

Ao meu saudoso avô Osvaldo, melhor amigo.

A Deus, por me dar saúde e sempre me guiar pelos melhores caminhos.

Agradecimentos

Ao meu orientador e chefe, Prof. Dr. Túlio Diniz Fernandes, exemplo de caráter e médico, pelos ensinamentos e amizade.

Ao Prof. Dr. Olavo Pires de Camargo, exemplo de pesquisador, pela confiança e respaldo em momentos difíceis dentro da Instituição.

Aos Professores Tarcísio Eloy P. Barros Filho e Gilberto Luis Camanho, pela oportunidade.

Ao Prof. Dr. Lew Schon, por me acolher como filho, acreditar no meu potencial e me ensinar a ser uma melhor pessoa, médico e pesquisador.

Ao Prof. Dr. Marcos Hideyo Sakaki, modelo de Médico Preceptor, pelo apoio na minha formação ortopédica e acadêmica.

À Prof. Dra. Sílvia Lourenço, grande incentivadora de todas as fases do projeto, pela atenção, ensino, disponibilidade e paciência.

Ao Dr. Ricardo Hsieh, pela ajuda, ensinamentos e paciência.

Ao Prof. Dr. Marcílio Alves, por possibilitar a realização do estudo biomecânico na Escola Politécnica da Universidade de São Paulo.

Ao Prof. Dr. Alexandre Leme Godoy-Santos, pela parceria e ensinamentos.

Ao amigo Dr. Pedro Augusto Pontin, por estar sempre presente.

Ao Dr. Renato José Mendonça Natalino, pelo trabalho magnífico na análise histológica.

Ao Dr. Gustavo Bispo dos Santos, pelo apoio e cuidado com os animais.

Ao engenheiro César Augusto Martins Pereira, pela dedicação, apoio e brilhantismo na análise biomecânica.

À tecnóloga Maria do Carmo Nunes, pelo carinho, amizade e cuidado com os animais.

Aos amigos Dr. Francisco Diego Oliveira Lima e Dr. Lucas Furtado da Fonseca, pelo apoio incondicional.

Às fundamentais Tânia Maria Borges e Rosana Moreno Costa, pelo carinho e prestatividade.

Chi po non vo,
Chi vo non po,
Chi sa non fa,
Chi fa non sa,
Et così il mondo mal va
Ascoli Piceno (1529)

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Terminologia Anatômica em Português conforme a Terminologia Anatômica Internacional da Federative Committee on Anatomical Terminology - FCAT (Comissão Federativa de Terminologia Anatômica - CFTA) aprovada em 1998 e traduzida pela Comissão de Terminologia Anatômica da Sociedade Brasileira de Anatomia – CTA-SBA. 1ª ed. (Brasileira) São Paulo, Editora Manole Ltda 2001. 248p.

Utilizaram-se a terminologia e as definições estatísticas conforme o Guia para Expressão da Incerteza de Medição, Segunda Edição Brasileira do Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (BIPM, IEC, IFCC, ISSO, IUPAC, IUPAP, OIML, 1983). Edição Revisada (Agosto de 1998) – Rio de Janeiro: ABNT, INMETRO, SBM, 1998.

SUMÁRIO

	Lista de Figuras	
	Lista de Gráficos	
	Lista de Tabelas	
	Lista de Símbolos, Abreviaturas e Siglas	
	Resumo	
	Summary	
1	INTRODUÇÃO.....	2
2	OBJETIVO.....	6
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	8
3.1	Tendão do calcâneo.....	8
3.2	Tendinopatia do tendão do calcâneo.....	15
3.3	Modelos animais de tendinopatia.....	24
3.3.1	Modelos animais de tendinopatia induzida por sobrecarga mecânica.....	28
3.3.2	Modelos animais de tendinopatia induzida por sobrecarga química.....	32
4	MÉTODOS.....	49
4.1	Ética.....	49
4.2	Modelo animal de tendinopatia do tendão do calcâneo.....	49
4.2.1	Animais de experimentação.....	49
4.2.2	Critérios de inclusão e exclusão.....	50
4.2.3	Formação dos grupos experimentais.....	51

4.2.4	Protocolo de anestesia.....	56
4.2.5	Procedimento cirúrgico.....	56
4.2.6	Procedimento pós-cirúrgico.....	62
4.2.7	Manutenção dos animais.....	63
4.3	Eutanásia.....	63
4.4	Preparo das amostras teciduais.....	64
4.5	Exame anatomopatológico.....	67
4.6	Estudo biomecânico.....	70
4.7	Cálculo da amostra.....	81
4.8	Desfechos avaliados.....	82
4.9	Análise estatística.....	83
5	RESULTADOS.....	85
5.1	Análise histológica.....	87
5.2	Análise biomecânica.....	98
5.2.1	Análise dos dados para área de secção transversa.....	105
5.2.2	Análise dos dados para rigidez.....	109
5.2.3	Análise dos dados para módulo de elasticidade.....	111
5.2.4	Análise dos dados para força no limite da elasticidade.....	113
5.2.5	Análise dos dados para deformação no limite da elasticidade	115
5.2.6	Análise dos dados para porcentagem de deformação no limite da elasticidade.....	117
5.2.7	Análise dos dados para tensão no limite da elasticidade.....	119
5.2.8	Análise dos dados para energia no limite da elasticidade.....	121
5.2.9	Análise dos dados para força no limite da resistência máxima.....	123

5.2.10	Análise dos dados para deformação no limite da resistência máxima.....	125
5.2.11	Análise dos dados para porcentagem de deformação no limite da resistência máxima.....	127
5.2.12	Análise dos dados para tensão no limite da resistência máxima.....	129
5.2.13	Análise dos dados para energia no limite da resistência máxima.....	131
5.2.14	Análise dos dados para densidade de energia de deformação no limite da elasticidade.....	133
5.2.15	Análise dos dados para densidade de energia de deformação no limite da resistência máxima.....	135
6	DISCUSSÃO.....	138
7	CONCLUSÃO.....	151
8	ANEXOS.....	153
9	REFERÊNCIAS.....	158

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Deformação tendínea frente à aplicação de cargas de tração.....	21
Figura 2	Fluxograma do Modelo Experimental: distribuição dos grupos, características e temporalidade das injeções e eutanásias.....	55
Figura 3	Anatomia topográfica da região distal do membro pélvico do coelho em decúbito ventral após tricotomia, assepsia e antissepsia. Contornos do tendão do calcâneo (A) se inserindo na tuberosidade do calcâneo (B).....	58
Figura 4	Dissecção anatômica do membro pélvico do coelho. Anatomia topográfica do tendão do calcâneo (A) e do tendão do músculo plantar (B). Visão posterior (esquerda) e lateral (direita).....	59
Figura 5	Dissecção anatômica do membro pélvico do coelho. Anatomia topográfica do tendão do calcâneo (A) e do tendão do músculo plantar (B), com tendão do plantar rebatido. Visão posterior (esquerda) e lateral (direita).....	60
Figura 6	Procedimento de injeção intratendínea na região central do tendão do calcâneo, sob visualização direta.....	61
Figura 7	Seringa de 100 microlitros e agulha de calibre 27G utilizadas para a realização das injeções intratendíneas.....	62

- Figura 8 Dissecção do corpo de prova para o estudo biomecânico: músculo gastrocnêmio, músculo sóleo, tendão do calcâneo e osso calcâneo. As fibras musculares proximais dos músculos gastrocnêmio e sóleo foram ressecadas, preservando-se a região músculo-tendínea..... 66
- Figura 9 Dissecção do espécime para estudo anatomopatológico, isolando-se toda a extensão do tendão do calcâneo, desde sua junção musculo-tendínea (A) até sua inserção no osso calcâneo (B)..... 67
- Figura 10 Dispositivo de medição de área de tendão, evidenciando o relógio comparador (A), o tendão (B), a canaleta (C) e a peça prismática (D)..... 71
- Figura 11 Máquina de ensaios mecânicos Instron modelo 3369 (A) com as garras cilíndrica (B) e criogênica (C), termômetro infravermelho (D), leitor do sensor de temperatura PT-100 (E), torquímetro (F) e leitor do torquímetro (G)..... 72
- Figura 12 Corpo de prova (A) fixado à máquina de ensaios por meio da garra cilíndrica (B) e garra criogênica ©..... 74
- Figura 13 Medição de temperatura da garra criogênica pelo sensor termo resistivo PT-100 (A) e medição de temperatura do tendão pelo termômetro infravermelho (B)..... 76

- Figura 14 Fotografias de lâminas do tendão do calcâneo de coelho, Escore de Bonar, Morfologia de Tenócitos: tenócitos com formato preservado, alongados e fusiformes (Escore 0); tenócitos com núcleos mais ovoides e citoplasma pouco evidente (Escore 1); tenócitos com núcleos aumentados e arredondados (Escore 2); tenócitos com núcleos aumentados e circulares, citoplasma abundante, formação de halo e metaplasia condroide (Escore 3); (Aumento: 200 vezes; Coloração: Hematoxilina-Eosina)..... 87
- Figura 15 Fotografias de lâminas do tendão do calcâneo de coelho, Escore de Bonar, Arranjo das Fibras Colágenas: colágeno disposto em feixes bem delimitados e demarcados, com padrão de ondulação mantido, polarização densa, brilhante e homogênea (Escore 0); separação e individualização de feixes de fibra colágena, manutenção da arquitetura geral, diminuição da polarização (Escore 1); separação e perda da demarcação dos feixes de fibra colágena, perda do padrão de polarização (Escore 2); separação importante dos feixes de fibras colágenas, com perda completa da arquitetura geral (Escore 3); (Aumento: 100 vezes; Coloração: Picrossírius)..... 88

- Figura 16 Fotografias de lâminas do tendão do calcâneo de coelho, Escore de Bonar, Celularidade: células com morfologia distinta e distribuição descontínua (Escore 0); áreas de hipercelularidade (Escore 1); áreas de hipercelularidade mescladas com áreas de hipocelularidade (setas) (Escore 2); áreas de acelularidade (Escore 3); (Aumento: 200 vezes; Coloração: Hematoxilina-Eosina)..... 89
- Figura 17 Fotografias de lâminas do tendão do calcâneo de coelho, Escore de Bonar, Vascularização: não observada (Escore 0); máximo de um aglomerado de vascularização por 10 campos de grande aumento (Escore 1); dois a três aglomerados de vascularização por 10 campos de grande aumento (Escore 2); mais de três aglomerados de vascularização por 10 campos de grande aumento (Escore 3); (Aumento: 200 vezes; Coloração: Hematoxilina-Eosina)..... 90
- Figura 18 Fotografias de lâminas do tendão do calcâneo de coelho, Escore de Bonar, Substância Fundamental: ausência de mucina (Escore 0); mucina escassa, feixes de fibras colágenas identificáveis (Escore 1); mucina corável, áreas de perda de demarcação de fibras colágenas (Escore 2); mucina abundante com fibras colágenas, discreta coloração colágena (Escore 3); (Aumento: 100 vezes; Coloração: Azul de Alcian)..... 91

- Figura 19 Fotografia da lâmina do tendão do calcâneo de coelho do Grupo Controle no seguimento de 16 semanas. Morfologia celular pouco alterada, feixes colágenos bem delimitados, discreto aumento da celularidade, vascularização e substância fundamental não aumentadas (aumento: 40 vezes, coloração: hematoxilina-eosina)..... 93
- Figura 20 Fotografia da lâmina do tendão do calcâneo de coelho do Grupo B3 (injeção única, seguimento de 16 semanas). Hipercelularidade, morfologia celular alterada com maior arredondamento dos núcleos celulares, perda do padrão ondulado dos feixes colágenos, discreto aumento da celularidade, áreas de hipervascularização (setas) (aumento: 40 vezes, coloração: hematoxilina-eosina)..... 96
- Figura 21 Fotografias de lâminas do tendão do calcâneo de coelho do Grupo A3 (injeções seriadas, seguimento de 16 semanas). Áreas de hipercelularidade, hipocelularidade e acelularidade; morfologia celular alterada, arredondamento dos núcleos celulares, formação de lacunas ou halo, compatível com metaplasia condroide (Figura C-B, setas brancas), perda da arquitetura dos feixes colágenos, aglomerados vasculares (Figura C-A, setas pretas) e aumento difuso da substância fundamental (aumento: 40 vezes, coloração: hematoxilina-eosina)..... 97

Figura 22 Ensaio mecânico destrutivo: rotura do tendão do calcâneo no nível da sua inserção na tuberosidade do calcâneo..... 99

Figura 23 Avaliação clínica de coelho submetido a três injeções seriadas de colagenase, com espessamento difuso do TC. Visão posterior (A) e lateral (B)..... 108

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Representação do limite de elasticidade (LE) e de resistência máxima (LRM) em uma curva força versus deformação.....	78
Gráfico 2	Representação do limite de elasticidade (LE) e de resistência máxima (LRM) em uma curva tensão versus deformação relativa.....	79
Gráfico 3	Representação das energias no limite de elasticidade (LE) e de resistência máxima (LRM) em uma curva força versus deformação.....	80
Gráfico 4	Representação das densidades de energia de deformação no limite de elasticidade (DEDLE) e de resistência máxima (DEDLRM) em uma curva tensão versus deformação relativa.....	80
Gráfico 5	Escore de Bonar: médias para cada grupo (A) e subgrupo (B), e comparação das médias entre os grupos para cada tempo de seguimento, com 10 (C), 12 (D) e 16 semanas (E)	94
Gráfico 6	Área de Secção Transversa: médias para cada grupo (A) e subgrupo (B), e comparação das médias entre os grupos para cada tempo de seguimento, com 10 (C), 12 (D) e 16 semanas (E).....	107

Gráfico 7	Rigidez: médias para cada grupo (A) e subgrupo (B), e comparação das médias entre os grupos para cada tempo de seguimento, com 10 (C), 12 (D) e 16 semanas (E).....	110
Gráfico 8	Módulo de Elasticidade: médias para cada grupo (A) e subgrupo (B), e comparação das médias entre os grupos para cada tempo de seguimento, com 10 (C), 12 (D) e 16 semanas (E).....	112
Gráfico 9	Força no Limite da Elasticidade: médias para cada grupo (A) e subgrupo (B), e comparação das médias entre os grupos para cada tempo de seguimento, com 10 (C), 12 (D) e 16 semanas (E).....	114
Gráfico 10	Deformação no Limite da Elasticidade: médias para cada grupo (A) e subgrupo (B), e comparação das médias entre os grupos para cada tempo de seguimento, com 10 (C), 12 (D) e 16 semanas (E).....	116
Gráfico 11	Porcentagem de deformação no Limite da Elasticidade: médias para cada grupo (A) e subgrupo (B), e comparação das médias entre os grupos para cada tempo de seguimento, com 10 (C), 12 (D) e 16 semanas (E).....	118
Gráfico 12	Tensão no Limite da Elasticidade: médias para cada grupo (A) e subgrupo (B), e comparação das médias entre os grupos para cada tempo de seguimento, com 10 (C), 12 (D) e 16 semanas (E).....	120

Gráfico 13	Energia no Limite da Elasticidade: médias para cada grupo (A) e subgrupo (B), e comparação das médias entre os grupos para cada tempo de seguimento, com 10 (C), 12 (D) e 16 semanas (E).....	122
Gráfico 14	Força no Limite da Resistência Máxima: médias para cada grupo (A) e subgrupo (B), e comparação das médias entre os grupos para cada tempo de seguimento, com 10 (C), 12 (D) e 16 semanas (E).....	124
Gráfico 15	Deformação no Limite da Resistência Máxima: médias para cada grupo (A) e subgrupo (B), e comparação das médias entre os grupos para cada tempo de seguimento, com 10 (C), 12 (D) e 16 semanas (E).....	126
Gráfico 16	Porcentagem de Deformação no Limite da Resistência Máxima: médias para cada grupo (A) e subgrupo (B), e comparação das médias entre os grupos para cada tempo de seguimento, com 10 (C), 12 (D) e 16 semanas (E).....	128
Gráfico 17	Tensão no Limite da Resistência Máxima: médias para cada grupo (A) e subgrupo (B), e comparação das médias entre os grupos para cada tempo de seguimento, com 10 (C), 12 (D) e 16 semanas (E).....	130
Gráfico 18	Energia no Limite da Resistência Máxima: médias para cada grupo (A) e subgrupo (B), e comparação das médias entre os grupos para cada tempo de seguimento, com 10 (C), 12 (D) e 16 semanas (E).....	132

Gráfico 19	Densidade de Energia de Deformação no Limite da Elasticidade: médias para cada grupo (A) e subgrupo (B), e comparação das médias entre os grupos para cada tempo de seguimento, com 10 (C), 12 (D) e 16 semanas (E).....	134
Gráfico 20	Densidade de Energia de Deformação no Limite da Resistência Máxima: médias para cada grupo (A) e subgrupo (B), e comparação das médias entre os grupos para cada tempo de seguimento, com 10 (C), 12 (D) e 16 semanas (E).....	136

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Randomização dos coelhos em estudo.....	52
Tabela 2	Escore de tendinopatia de Bonar: características avaliadas e graduação das alterações teciduais tendíneas.....	69
Tabela 3	Detalhamento da perda de animais por grupo e subgrupo....	86
Tabela 4	Escore de Bonar: distribuição do número de animais avaliados, médias, desvios padrões, valores mínimo e máximo, e valor de p na comparação dentro dos grupos.....	92
Tabela 5	Escore de Bonar: Valor de p na comparação entre os grupos, para subgrupos de mesmo tempo de seguimento....	92
Tabela 6	Desfechos Biomecânicos: média, desvio padrão (DP) e valor de p na comparação entre os subgrupos na 16a semana de seguimento.....	100
Tabela 7	Desfechos Biomecânicos: média, desvio padrão (DP) e valor de p na comparação entre os subgrupos na 12a semana de seguimento.....	102
Tabela 8	Desfechos Biomecânicos: média, desvio padrão (DP) e valor de p na comparação entre os subgrupos na 10a semana de seguimento.....	103
Tabela 9	Desfechos Biomecânicos: valor de p para comparação dentro dos grupos de estudo, entre os diferentes tempos de seguimento.....	104

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Percentual
°	Graus
°C	Graus Celsius
ε	Deformação relativa
ε_{LE}	Energia no limite da elasticidade
ε_{LRM}	Energia no limite da resistência máxima
ARN	Ácido ribonucleico
DED	Densidade de Energia de Deformação
DEDLE	Deformação no limite de elasticidade
DLE	Limite da elasticidade
DLRM	Deformação no limite de resistência máxima
E	Energia
E%	Variação percentual da energia absorvida
E2	Energia absorvida no segundo ciclo
E50	Energia absorvida no quinquagésimo ciclo
F	Força
FLE	Limite da elasticidade
FLE	Força no limite da elasticidade
FLH	Flexor longo do hálux
FLRM	Força no limite de resistência máxima
GL	Gay Lussac
HX711	Placa condicionadora para extensômetros elétricos

IL-10	Interleucina-10
kN	Kilo Newton
LCD	Liquid Crystal Display
LE	Limite de elasticidade
LIM-41	Laboratório de Investigação Médica do Sistema Músculo Esquelético
LRM	Limite de resistência máxima
MEC	Matriz extracelular
mJ	Mili Joule
MJ.m ⁻³	Mega Joule por metro cúbico
Mm	Milímetros
mm.mm ⁻¹ ₁	Milímetro por milímetro
mm ²	Milímetro ao quadrado
MPa	Mega Pascal
N	Newton
N.m	Newton metro
N.mm ⁻¹	Newton por milímetro
N.mm ⁻²	Newton por milímetro ao quadrado
NaCl	Cloreto de Sódio
OC	Segmento de reta
PGE1	Prostaglandina E1
PGs	Prostaglandinas
PRP	Plasma rico em plaquetas

PT	Positive Temperature
RMN	Ressonância magnética nuclear
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
T	Tensão
TC	Tendão do calcâneo
TLRM	Tensão no limite da resistência máxima
TNF α	Tumoral alfa
TP	Tendinopatia
TTC	Tendinopatia do tendão do calcâneo
US	Ultrassonografia
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

RESUMO

Cesar Netto C. *Estudo histológico e biomecânico da tendinopatia induzida por injeções seriadas de colagenase: novo modelo experimental no tendão do calcâneo de coelhos [Tese]*. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

INTRODUÇÃO: Este estudo tem como objetivo comparar os achados biomecânicos e anatomopatológicos de um modelo animal inédito de tendinopatia do tendão do calcâneo, induzido por injeções seriadas de baixa dose da enzima colagenase bacteriana, com o modelo mais comumente utilizado na literatura, induzido por injeção única de maior dose da enzima, e com os controles. A hipótese é que a utilização de injeções seriadas resultaria em alterações tendíneas mais progressivas e duradouras, similar à doença nos humanos. **MÉTODOS:** Quarenta e cinco (N=45) coelhos foram randomizados em três diferentes grupos de estudo (A, B e Controles). Animais do Grupo A (n=18) foram submetidos a três injeções seriadas de baixa dose de colagenase (0,1mg), em ambos os tendões do calcâneo, separadas por intervalo de duas semanas. Animais do Grupo B (n=18) foram injetados com dose única de maior dose (0,3mg). Já no Grupo Controle, animais (n=9) foram injetados bilateralmente com três doses seriadas de solução fisiológica 0,9%. Após a última injeção, foi realizada eutanásia do mesmo número de animais dos Grupos A e B (n=6), com 10 semanas (Subgrupos A1 e B1), 12 semanas (Subgrupos A2 e B2) e 16 semanas (Subgrupos A3 e B3). Todos os animais do Grupo controle foram eutanasiados após 16 semanas. Alterações anatomopatológicas, pelo escore de Bonar, e biomecânicas foram comparadas entre os grupos e dentro de cada grupo, para os diferentes momentos de eutanásia. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. **RESULTADOS:** Após 16 semanas, o escore anatomopatológico de Bonar foi significativamente maior para ambos os Grupos A ($11,8 \pm 2,28$) e B ($5,6 \pm 2,51$), quando comparados aos controles ($2 \pm 0,76$). Os valores para o grupo A também diferiram do Grupo B ($p < 0,001$). Para os desfechos biomecânicos, os grupos diferiram quanto à área de secção transversa do tendão ($p = 0,003$), módulo de elasticidade ($p = 0,024$), e tensões no limite da elasticidade ($p = 0,020$) e na resistência máxima ($p = 0,022$), com piores resultados encontrados nos animais do Grupo A. Na semana 12, também houve diferença entre os Grupos A e B para o escore anatomopatológico de Bonar ($p = 0,028$) e para a tensão no limite da elasticidade ($p = 0,013$), novamente com piores resultados no Grupo A. Já na 10ª semana, foram os coelhos do Grupo B que demonstraram alterações mais pronunciadas quando comparados

aos do Grupo A, com diferença significativa no Escore de Bonar ($p=0,033$), área de secção transversa do tendão ($p=0,038$), rigidez ($p=0,048$), módulo de elasticidade ($p=0,024$), força, tensão, energia e densidade de energia no limite da elasticidade ($p=0,008$, $p=0,020$, $p=0,047$ e $p=0,0015$, respectivamente) além de força e tensão no limite da resistência máxima ($p=0,004$ e $p=0,008$, respectivamente). A comparação dos desfechos dentro de cada grupo, entre os diferentes subgrupos, apresentou diferenças significativas no escore de Bonar em ambos os grupos A ($p=0,012$) e B ($p<0,001$). Parâmetros biomecânicos não diferiram entre os subgrupos do Grupo A. Já os subgrupos do grupo B apresentaram diferenças na área de secção transversa do tendão ($p=0,011$), módulo de elasticidade ($p=0,024$), tensão no limite da elasticidade ($p=0,023$) e da resistência máxima ($p=0,031$), assim como na a densidade de energia no limite da elasticidade ($p=0,017$), com resultados mais pronunciados no subgrupo B1. **CONCLUSÃO:** O modelo animal de tendinopatia do tendão calcâneo induzida por injeções seriadas de colagenase apresentou alterações anatomopatológicas e biomecânicas mais avançadas na 16ª semana, de caráter progressivo e duradouro, similar à doença dos humanos. Tal modelo experimental pode representar uma melhor opção na indução da tendinopatia do tendão do calcâneo, possibilitando a realização de estudos promissores no futuro.

Descritores: Tendinopatia; Tendão do calcâneo; Modelos animais; Tendinopatia induzida quimicamente; Colagenase bacteriana; Coelhos.

SUMMARY

Cesar Netto C. *Histological and biomechanical study of tendinopathy induced by serial injections of collagenase: a new experimental model in the Achilles tendon of rabbits* [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2017.

INTRODUCTION: This study aims to compare the biomechanical and histological findings of a new animal model of Achilles tendinopathy induced by serial low-dose injections of bacterial collagenase with the most commonly used high-dose single injection and to controls. The hypothesis of the study is that consecutive low-dose injections of collagenase would result in more progressive and long-lasting tendinopathic findings, reproducing better the disease in humans. **METHODS:** Forty-five (N=45) rabbits were randomly divided into three groups (A, B and Control). Animals in Group A (n=18) underwent three serial low-dose (0,1mg) injections of bacterial type I collagenase in both Achilles tendons, separated by a two-week interval. Animals in Group B (n=18) underwent bilateral single high dose injection (0,3mg) of the same enzyme. In the Control Group, animals (n=9) were injected bilaterally with three consecutive doses of saline solution, separated by a two-week interval. Following the last injection, the same number of rabbits from Groups A and B (n=6) were euthanized after 10 weeks (Subgroups A1 and B1), 12 weeks (Subgroups A2 and B2), and 16 weeks (Subgroups A3 and B3). Animals in the Control Group were all euthanized after 16 weeks. Histological findings, using the Bonar tendinopathy score, and biomechanical properties of the Achilles tendons were compared between the groups and inside each the group, in the different time-points of euthanasia. Findings at 16 weeks were considered primary outcomes. P-values <0,05 were considered significant. **RESULTS:** After 16 weeks, the Bonar score was significantly increased for both Groups A (11,8±2,28) and B (5,6±2,51), when compared to controls (2±0,76). Group A has also differed from Group B (p<0,001). Regarding biomechanical findings, groups differed in cross-sectional area of the Achilles tendon (p=0,003), Young’s modulus (p=0,024), Yield stress (p=0,020) and ultimate tensile strength (p=0,022), with the worst results in animals from Group A. At 12 weeks, comparison between Groups A and B have shown significant differences for Bonar score (p=0,028) and Yield stress (p=0,013), again with worse results in Group A. Conversely, at 10 weeks, rabbits in Group B showed worse results when compared to Group A, with significant differences in the Bonar score (p=0,033), cross sectional area of the tendon (p=0,038), stiffness (p=0,048), Young’s modulus (p=0,024), Yield tension (0,008), Yield stress (p=0,020), energy Yield (p=0,047), ultimate tension (p=0,004), ultimate stress (p=0,008) and yield strain energy density (p=0,015). The comparison of outcomes inside each group, in the different time-points of follow-up, demonstrated significant differences in the Bonar score for Group A (p=0,012) and Group B (p<0,001). Regarding biomechanical properties, Group A showed no differences between the subgroups for any of the parameters evaluated. Subgroups in Group B differed for cross-sectional area of the tendon (p=0,011), Young’s modulus

($p=0,024$), Yield stress ($p=0,023$), ultimate stress ($p=0,031$) and yield strain energy density ($p=0,017$), with worst results in the earliest follow-up (Subgroup B1). **CONCLUSIONS:** The animal model of Achilles tendinopathy induced by consecutive injections of collagenase showed worse histological and biomechanical properties after 16 weeks, demonstrating more progressive and long lasting tendinopathic findings, reproducing better the disease in humans. This novel experimental model can represent a better option to induce Achilles tendinopathy, allowing promising future research on the subject.

Descriptors: Tendinopathy; Achilles tendon; Models, animal; Tendinopathy chemically induced; Bacterial collagenases; Rabbits.

1. Introdução

1 INTRODUÇÃO

A fisiopatologia das tendinopatias é controversa e ainda não totalmente elucidada na literatura (**Riley, 2004**). De maneira geral, ocorrem destruição da microarquitetura tendínea, desorganização e destruição das fibras colágenas, degeneração tecidual mixoide, metaplasia celular condroide, deposição de calcificações intratendíneas, proliferação de capilares e arteríolas, com resultante alteração nas propriedades mecânicas do tendão envolvido (**Maffulli et al., 2003; Hashimoto et al., 2003; Sharma e Maffulli, 2005; Longo et al., 2008; Arya e Kulig, 2010**).

A tendinopatia do tendão do calcâneo é uma das lesões por sobrecarga mais frequentes do pé e tornozelo (**Sobhani et al., 2013**) e representa causa importante de dor prolongada e invalidez na população ativa (**Kvist, 1994; Józsa e Kannus, 1997; Alfredson e Lorentzon, 2000**). Essa doença é comumente diagnosticada em indivíduos praticantes de atividades físicas esportivas e afeta 9% de corredores recreacionais e até 5% dos atletas profissionais (**Lysholm e Wiklander, 1987**). Ocorre também em 5,6% dos não esportistas (**Waldecker et al., 2012**), e sua apresentação crônica é mais comum em idades mais avançadas (**Kvist, 1991**).

A utilização de modelos experimentais em animais oferece vantagens importantes no estudo da fisiopatologia das tendinopatias. Diferentemente do tecido humano, que de maneira geral só pode ser obtido por biópsias ou tratamento cirúrgico nos estágios mais avançados da tendinopatia, os modelos animais permitem o estudo da doença em todas as suas fases de evolução,

além de possibilitar a indução de lesões teciduais controladas e reprodutíveis **(Dirks e Warden, 2011)**.

As técnicas mais utilizadas para desenvolvimento da tendinopatia nos modelos animais são aplicação de sobrecarga mecânica e substâncias químicas, como por exemplo, a colagenase, prostaglandinas, e citocinas **(Hast et al., 2014)**.

A utilização da sobrecarga mecânica na indução da tendinopatia se embasa no fato da doença nos humanos ocorrer tipicamente em indivíduos ativos e atletas **(Kujala et al., 2005)**. A indução mecânica é dependente do nível de atividade e da sobrecarga utilizada **(Heinemeier et al., 1985; Silva et al., 2011)**, e leva a alterações teciduais similares ao das tendinopatias crônicas **(Glazebrook et al., 2008)**. No entanto, esses modelos exigem maior dispêndio de tempo, recursos e esforços para a indução das alterações tendíneas que podem ser normalizadas uma vez se interrompa a sobrecarga mecânica **(Jelinsky et al., 2008)**, achado incompatível com a doença nos humanos.

Os modelos animais de indução química da tendinopatia, com destaque para a utilização de injeções tendíneas da enzima colagenase, levam a alterações agudas do tendão, o que não replica de maneira acurada as alterações progressivas da tendinopatia em humanos. No entanto, representam modelos mais objetivos, reprodutíveis e de menor dispêndio de tempo e recursos. Tais modelos comprovadamente induzem à destruição e desarranjo dos feixes de fibras colágenas do tendão, assim como alterações celulares, moleculares e biomecânicas, semelhantes às características mais importantes da tendinopatia humana **(Lake et al., 2008; Lui et al., 2011; Dirks e Warden, 2011; Hast et al., 2014)**.

Apesar da enzima colagenase demonstrar resultados promissores na indução química da tendinopatia (**Lui et al., 2010a; Marcos et al., 2012; Yoo et al., 2012; Casalechi et al., 2013; Tsai et al., 2013; Machova et al., 2014; Orfei et al., 2016**), até o momento não foram padronizados protocolos definidos com relação à dosagem, concentração, volume e frequência ideais para otimização da indução de achados histológicos e biomecânicos compatíveis e duradouros, semelhantes à doença crônica nos humanos.

Mais especificamente, a colagenase bacteriana do tipo I é a mais utilizada na literatura, e demonstra sucesso na indução de tendinopatia em diversos modelos animais. A enzima é geralmente injetada em dose única de 0,3 a 0,5 miligramas (**Davidson et al., 1997; Dahlgren et al., 2002; Godbout et al., 2006; Fu et al., 2009; Lui et al., 2009; Lui et al., 2010a,b; Rui et al., 2013; Shah et al., 2013; Solchaga et al., 2014**). Mais recentemente, **Orfei et al. (2016)** foram os primeiros a compararem achados histológicos na aplicação de doses únicas de 0,1mg e 0,3mg da mesma enzima.

Até o presente momento, não existem estudos que avaliem o papel de múltiplas e consecutivas injeções da enzima colagenase nos modelos animais de tendinopatia induzida. A aplicação seriada de menores doses da enzima, quando comparadas a injeções únicas e de maior dose, poderia induzir alterações tendíneas mais progressivas e duradouras, e assim reproduzir de maneira mais acurada as alterações da tendinopatia em humanos.

2. *Objetivo*

2 OBJETIVO

Comparar os resultados, em diferentes momentos de seguimento (10, 12 e 16 semanas), da avaliação biomecânica e histológica de um novo modelo animal de tendinopatia do tendão do calcâneo, induzido por três injeções seriadas de baixa dose da colagenase, com o modelo mais utilizado na literatura e com os animais controles.

3. Revisão da Literatura

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Tendão do calcâneo

O tendão do calcâneo (TC) é o maior e mais forte tendão do corpo humano. A carga de tração que passa através dele pode chegar a até 12 vezes o peso corpóreo durante a prática de atividades esportivas que envolvam corrida (**Komi et al., 1984, 1987, 1992**).

O tendão é também denominado de tendão de Aquiles. O registro escrito mais antigo do termo tendão de Aquiles é datado de 1693, na publicação do anatomista belga Philip Verheyen (**Verheyen 1693; Suy, 2007**). O epônimo Aquiles é oriundo da mitologia grega. Aquiles, um grande guerreiro tessálico, foi morto durante a guerra de Troia ao ser atingido no calcanhar, por uma flecha envenenada disparada por Paris, e guiada pelo deus Apolo. A deusa Tétis, ninfa do mar, mãe de Aquiles, havia mergulhado seu filho quando ainda bebê nas águas do rio Estige, com o objetivo de o tornar invulnerável. No entanto, como ela o segurou pelo calcanhar, a água do rio não tocou essa parte do seu corpo que se manteve como seu único ponto de fragilidade (**Lee e Jacobs, 2002**).

A substância do tendão do calcâneo é composta por colágeno, aproximadamente 95% colágeno tipo-I, e elastina, que representam respectivamente 70% e 1% a 2% da massa seca do tendão (**Kannus, 2000**), embebidos em uma matriz composta de proteoglicanos e água (**el Hawary et**

al., 1997). As proteínas e carboidratos que compõem essas substâncias são produzidas por tenoblastos e tenócitos, células alongadas que se posicionam em fileiras entre as fibras colágenas (**Paavola et al., 2002**). Durante o repouso, as fibras do TC apresentam configuração ondulada, e em nível celular, respondem ao alongamento do tendão com estiramento das fibras colágenas (**Magnusson et al., 2002**).

Macroscopicamente, o tendão do calcâneo representa uma aponeurose conjunta do músculo tríceps sural, composto pelos músculos sóleo, mais profundo, e gastrocnêmio, mais superficial e responsável pelo contorno da panturrilha. O conjunto, juntamente com o músculo plantar, está contido no compartimento posterior superficial da perna, separado do compartimento posterior profundo pelo folheto profundo da fáscia crural. A inervação dos músculos se dá pelo nervo tibial, mais especificamente pela primeira e segunda raízes sacrais (**Nunley, 2009**).

O músculo gastrocnêmio cruza três diferentes articulações: joelho, talocrural e talocalcânea. Ele está em alongamento máximo quando o joelho está em extensão, a talocrural em dorsiflexão e a talocalcânea em inversão (**DiGiovanni et al., 2002**). Composto principalmente de fibras musculares de contração rápida, o músculo gastrocnêmio atua na flexão do joelho, flexão plantar da articulação talocrural e inversão da articulação talocalcânea. As cabeças medial e lateral do gastrocnêmio se originam da superfície posterior da região distal do fêmur, proximal aos côndilos femorais, por meio de tendões fortes e planos que se estendem em uma aponeurose curta na superfície posterior dos ventres musculares. Ambas as cabeças também se ligam à superfície posterior da cápsula articular do joelho, mais precisamente no

ligamento poplíteo oblíquo. A cabeça medial é maior, origina-se em posição ligeiramente mais proximal e se estende até região mais distal na panturrilha, quando comparada à cabeça lateral **(Nunley, 2009)**. Em 10% a 30% da população existe um osso sesamoide denominado fabela no tendão proximal da cabeça lateral do gastrocnêmio, que com frequência articula diretamente com o côndilo lateral do fêmur **(Duncan et al., 2003)**. As fibras musculares de ambas as cabeças correm obliquamente e se inserem em uma rafe na linha média, que em posição mais distal se alarga em uma aponeurose na superfície anterior do músculo. Essa aponeurose se estreita progressivamente até se unir com o tendão do músculo sóleo e formar o tendão do calcâneo **(Nunley, 2009)**.

O músculo sóleo é um músculo penado, considerado um músculo postural, e composto principalmente por fibras musculares de contração lenta. Atua na manutenção da postura ereta no repouso e impede que o corpo desabe em direção anterior durante a marcha **(Kvist, 1994)**. Origina-se da superfície posterior da cabeça e região proximal da fíbula, terço médio da superfície posterior e medial da tíbia, assim como do arco fibroso que conecta suas origens tibial e fibular. O músculo sóleo é mais largo que o gastrocnêmio e é composto por uma aponeurose anterior e outra posterior, estando as fibras musculares entre essas estruturas. A arquitetura muscular não é homogênea e possui fibras de comprimentos variáveis, entre 16 e 45 milímetros, e que se estendem até região mais distal do que as fibras do músculo gastrocnêmio, onde se inserem na aponeurose posterior **(Agur et al., 2003)**. As duas aponeuroses do músculo sóleo correm paralelamente até se juntarem na região distal da perna, e então se unirem com o tendão do gastrocnêmio para formar o tendão do calcâneo.

O músculo plantar tem sua origem na porção distal do prolongamento lateral da linha áspera do fêmur e no ligamento poplíteo oblíquo. Possui pequeno ventre muscular de comprimento entre sete e 10 centímetros (**Nunley, 2009**). O tendão do músculo plantar é delgado e cruza a panturrilha de forma oblíqua, entre os músculos sóleo e gastrocnêmio, e em posição distal sua trajetória é paralela e medial ao TC. O tendão se insere, mais comumente, na região posterior e medial da tuberosidade do calcâneo (**Cummins et al., 1946**). O músculo está ausente em aproximadamente 10% da população (**Maffulli et al., 2007**).

O tendão do calcâneo tem origem na porção média distal da perna, em uma confluência dos tendões dos músculos gastrocnêmio e sóleo (junção gastrocnêmio-sóleo). A distância entre a extensão mais distal das fibras musculares do gastrocnêmio e a junção varia de dois a oito centímetros (**Carl et al., 2005**). O comprimento do tendão conjunto é de aproximadamente 10 a 15 centímetros (**Cummins et al., 1946**). A espessura do TC varia com a idade, de 4,6 milímetros (desvio padrão de 0,8mm) para crianças menores de 10 anos, até 6,9 milímetros (desvio padrão de 1mm) em adultos acima dos 30 anos (**Koivunen-Niemela e Parkkola, 1995**). O músculo sóleo contribui com mais fibras para o TC do que o músculo gastrocnêmio (**Cummins et al., 1946; Kvist, 1994**). O tendão é largo e plano na junção gastrocnêmio-sóleo, progressivamente fusiforme em sua trajetória distal até região quatro centímetros proximal a sua inserção, na qual assume novamente formato mais plano (**Cummins et al., 1946**).

Em sua trajetória distal o TC apresenta rotação interna em espiral de suas fibras, variável e de aproximadamente 90°, de maneira que as fibras do

músculo sóleo, que inicialmente se encontravam em posição posterior, assumem na inserção posição medial, e as fibras do músculo gastrocnêmio, inicialmente anteriores, se inserem lateralmente na tuberosidade do calcâneo. A intensidade da rotação no TC é máxima em posição de dois a cinco centímetros proximal a sua inserção, o que resulta em concentração de estresse, vascularização diminuída e susceptibilidade à degeneração tendínea dessa região (**Lagergren e Lindholm, 1959; Carr e Norris, 1989; Langberg et al., 1998; Wijesekera et al., 2011**). A intensidade da rotação do TC é influenciada pelo posicionamento da fusão das fibras de ambos os músculos, de maneira que quanto mais distal a junção, maior a rotação das fibras (**Sarrafian, 1993; Wijesekera et al., 2011**). Tal conformação garante ao TC propriedades elásticas que permitem liberação de energia armazenada durante fases específicas do ciclo da marcha, com velocidade de encurtamento aumentada e maior força muscular instantânea (**Alexander e Bennet-Clark, 1977; Maffulli, 1999**).

O TC se insere na superfície posterior do terço médio da tuberosidade do calcâneo, com início aproximadamente de um centímetro distal a sua borda mais superior (**Chao et al., 1997**). A área média de inserção é de aproximadamente 19,8 milímetros em comprimento e respectivamente 24 e 31 milímetros de largura em suas porções proximal e distal, com a distância da inserção da porção medial sendo tipicamente mais longa que a lateral (**Kolodziej et al., 1999**). Na porção final da inserção, as fibras tendíneas se misturam com o perióstio do calcâneo, sendo que em neonatos existe continuidade dessas fibras com a fáscia plantar, que diminui progressivamente

com a idade e pode inexistir na idade adulta (**Snow et al., 1995; Kachlik et al., 2008b**).

Posicionada entre as superfícies posterior do osso calcâneo e anterior da inserção do TC está a bolsa tendínea calcânea (**Kachlik et al., 2008a**). Em formato de cunha, apresenta área de secção transversa em forma de ferradura, com expansões nas margens mediais e laterais do TC. Composta basicamente de projeções sinoviais, permite livre movimentação na interface entre osso e tendão, durante flexão plantar e dorsiflexão da articulação talocrural (**Canoso et al., 1988**). Suas paredes anterior e posterior, em contato com o a superfície anterior do TC e posterior e superior do osso calcâneo, consistem de fibrocartilagem, o que habilita o tendão a resistir a forças de compressão, contra a tuberosidade do calcâneo, durante a dorsiflexão da articulação talocrural (**Rufai et al., 1995**). Os componentes fibrocartilaginosos da bolsa tendínea calcânea, do perióstio da porção posterior e superior da tuberosidade calcânea, e da êntese do TC atuam como polias que otimizam o braço de alavanca e as propriedades mecânicas do tendão (**Milz et al., 2002; Shaw et al., 2008; Kachlik et al., 2008a**).

O espaço entre o TC, a borda posterior da tibia, mais precisamente superfície posterior do tendão do músculo flexor longo do hálux (FLH), e a superfície superior da tuberosidade do calcâneo é denominado triângulo de Kager (**Kager, 1939; Wiegerinck et al., 2012**). Esse espaço é ocupado pelo coxim gorduroso de Kager (**Ly e Bui-Mansfield et al., 2004**). O coxim possui três regiões distintas: superficial, associada com o TC; profunda, associada com o tendão do FLH; e uma porção distal em forma de cunha, associada à bolsa tendínea calcânea, pela qual o coxim se move em direção à bolsa

durante a flexão plantar da articulação talocrural (**Theobald et al., 2006**). O coxim gorduroso de Kager diminui o atrito entre o TC e o osso, protege o suprimento sanguíneo do TC e impede que o tendão se dobre ou que ocorra pressão negativa na bolsa tendínea calcânea durante o movimento de flexão plantar, além de possuir funções proprioceptivas, contendo diversas terminações nervosas (**Bjur et al., 2005; Theobald et al., 2006**).

O tendão do calcâneo não possui uma bainha tendínea sinovial verdadeira. O tendão é envolto em toda sua extensão por um paratendão, fina membrana de tecido areolar frouxo que permite movimentação livre do tendão e diminui significativamente o atrito com as estruturas vizinhas (**Momose et al., 2002**). Profundo ao paratendão, em toda a extensão do TC se encontra o epitendão, fina e lisa camada de tecido conjuntivo, que em sua superfície externa está em contato direto com o paratendão. A superfície interna do epitendão está em continuidade com o endotendão, que reveste e mantém os feixes e fibras colágenas compactados e provê acesso de fibras nervosas e vasos sanguíneos e linfáticos (**Paavola et al., 2002**).

A vascularização do TC se dá por três fontes principais: sistemas vasculares intrínsecos da junção músculo-tendínea e da êntese do TC, e de um sistema vascular extrínseco no paratendão (**Paavola et al., 2002**). Na junção músculo-tendínea, vasos sanguíneos provenientes do perimísio dos ventres musculares do gastrocnêmio e sóleo penetram o endotendão para suprir o terço proximal do TC (**Ahmed et al.; Langberg et al., 1998**). A maior extensão do tendão é suprida por ramos da artéria tibial posterior no paratendão, localizados na superfície anterior do TC. Esses vasos sanguíneos chegam por meio de vínculos tendíneos, que adentram a substância do tendão ao longo do

endotendão e possuem trajetória paralela ao seu eixo longitudinal. A porção proximal do TC recebe suprimento vascular adicional de um ramo recorrente da artéria tibial posterior, assim como seu terço distal, que é suprido por ramos das artérias tibial posterior, fibular e plantar lateral (**Sanz-Hospital et al., 1997**).

O suprimento sanguíneo do TC não é homogêneo e se apresenta diminuído em seu terço médio, principalmente em área de dois a seis centímetros proximal à inserção do tendão (**Carr e Norris, 1989; Astrom et al., 1994; Sanz-Hospital et al., 1997; Astrom et al.; Stein et al., 2000; Silvestri et al., 2003**). Essa área de vascularização diminuída coincide com a localização mais frequente das roturas do TC, e a ausência de suprimento sanguíneo adequado pode influenciar de maneira direta, diminuindo a resistência tendínea às forças de tração (**Lagergren e Lindholm, 1959; Schmidt-Rohlfing et al., 1992**), ou indireta, propiciando o desenvolvimento de alterações degenerativas no tendão (**Langberg et al., 1998; Zantop et al., 2003**).

A inervação do tendão calcâneo se dá por ramos nervosos provenientes dos músculos que o formam e por pequenos fascículos de nervos cutâneos, principalmente do nervo sural (**Stilwell, 1957**).

3.2 Tendinopatia do tendão do calcâneo

Historicamente, o termo tendinite foi utilizado para descrever achados clínicos das lesões tendíneas (**Salomão et al., 1993; Torstenen et al., 1994**;

Uthoff e Sano, 1997). Nas tendinites, o tendão estaria acometido por um processo patológico inflamatório. No entanto, estudos histológicos demonstram achados condizentes com lesões degenerativas, com mínima presença de células inflamatórias (**Alfredson et al., 2000; 2001**).

O termo tendinose, originalmente adotado por **Puddu et al.** em 1976, também foi utilizado para descrever as patologias tendíneas e implica a presença de alterações degenerativas do tendão, a ausência de achados inflamatórios, tanto histológicos quanto clínicos (**Puddu et al., 1976**). No entanto, a presença do processo degenerativo nem sempre está diretamente relacionada com a ocorrência da sintomatologia (**Järvinen et al.; Waterson et al.; Movin et al., 1997; Khan et al., 1999; Peers e Lysens, 2005; Sharma e Maffulli, 2006**).

O termo tendinopatia (TP) foi originalmente descrito em 1986 por **Perugia et al.** e posteriormente popularizado por **Maffuli et al. (1998b)**. Preconiza sua utilização para designar a síndrome clínica caracterizada por dor persistente e disfunção tendínea, e que compreende todas as possíveis alterações teciduais do tendão acometido. Reservam-se então os termos tendinite, tendinose, paratendinite e tenossinovite especificamente para diagnósticos histológicos (**Maffuli et al., 1998b**).

Os tendões mais frequentemente acometidos pela TP são o do calcâneo, patelar, tendões do manguito rotador, principalmente o do supraespal, cabeça longa do bíceps braquial, extensores e flexores do punho, e tibial posterior (**Abate et al., 2009**).

A tendinopatia do tendão do calcâneo (TTC) está frequentemente associada à sobrecarga mecânica e prática de atividades físicas esportivas,

mas também ocorre em pacientes sedentários, de meia idade e com sobrepeso (**Maffulli et al., 1998b**), o que resulta em impacto financeiro e social significativo, com limitação da capacidade laborativa (**Kvist, 1994; Józsa e Kannus, 1997; Aström, 1998; Alfredson e Lorentzon, 2000**). A incidência da doença vem crescendo nas últimas três décadas e está relacionada com a maior frequência na participação da população em atividades físicas esportivas recreativas, competitivas e profissionais (**Longo et al., 2009**). A incidência cumulativa estimada durante a vida é de 7% a 9% em corredores de alta performance, com incidência 10 vezes maior quando comparados aos controles da mesma idade (**Ames et al., 2008**). Também é frequente em esportistas praticantes de tênis, atletismo, voleibol e futebol (**James et al., 1978; Rovere et al., 1983; Winge et al., 1989; Teitz et al., 1997; Maffulli et al., 1998a**).

Clinicamente as TP são caracterizadas por achados de anamnese e exame físico (**Scott et al., 2013**), que incluem a presença de sintomatologia dolorosa persistente, intensificada durante os esforços e pela prática de atividade física (**Rio et al., 2014**), dor focal na palpação e ocasionalmente espessamento do tendão acometido (**Hutchison et al., 2013**). Tais achados clínicos estariam associados a alterações nos exames de imagem de ressonância magnética nuclear (RMN) e ultrassonografia (US) (**Warden et al., 2007; Hoksrud et al., 2008; Burge et al.; Hodgson et al., 2012; Iannotti et al., 2013**).

No entanto, alterações teciduais avançadas permanecem assintomáticas por longo período de tempo (**Cook et al., 2004**), conforme proposto por **Fredberg et al.** em 2008, na teoria do iceberg. Essa teoria explica a

dissociação clínico-histológica da doença, cuja presença da sintomatologia dolorosa representa apenas a ponta do iceberg, a doença ocorre tardiamente, apenas após o desenvolvimento de alterações histológicas tendíneas avançadas (**Fredberg et al., 2008**). **Kannus e Józsa (1991)** reportam que mais da metade das roturas tendíneas espontâneas ocorrem na ausência de sintomas prévios, e que alterações histológicas degenerativas são encontradas na maioria dos tendões rotos avaliados.

A TTC pode ser classificada de acordo com a localização anatômica da lesão e, de maneira geral, são divididas em: insercionais, que correspondem a aproximadamente 20% a 25% dos casos, e não insercionais, presentes em 50% a 75% dos casos (**Kvist 1994; Järvinen et al., 2001; Wijesekera et al., 2011**).

As TTC insercionais podem estar relacionadas à presença de uma exostose óssea, localizada na região posterior e superior da tuberosidade calcânea, denominada deformidade de Haglund (**Haglund, 1928**). A definição radiográfica desta exostose foi descrita por **Pavlov et al. (1982)**. Ela está presente em aproximadamente 60% dos pacientes, porém, nem todos os pacientes que possuem a exostose desenvolvem a tendinopatia (**Myerson e McGarvey, 1999**).

As TTC podem também ser classificadas de acordo com o critério temporal de duração dos sintomas. De acordo com Clancy et al., as tendinopatias são agudas, quando a sintomatologia está presente por período de tempo menor do que duas semanas, subagudas, quando entre duas e seis semanas, ou crônicas, quando presentes por mais do que seis semanas (**Clancy et al., 1976; el Hawary et al., 1997**).

A fisiopatologia da TTC, assim como das tendinopatias em geral, é controversa e ainda não totalmente elucidada na literatura **(Riley, 2004)**. Sua ocorrência está relacionada a diversos fatores de risco, intrínsecos e extrínsecos **(Alfredson, 2005; Mahieu et al., 2006; Renström e Woo, 2008)**.

Dentre os fatores de risco intrínsecos estão: idade e envelhecimento, com diminuição progressiva do suprimento vascular tendíneo, hipóxia, déficit nutricional e metabólico, com resultante acúmulo de toxinas e radicais livres **(Strocchi et al., 1991; Archambault et al., 1995; Åström, 1998; Riley et al.; Langberg et al., 2001; Kubo et al., 2003; Kettunen et al., 2006; Ristolainen et al.; Thorpe et al., 2014)**; sobrepeso e obesidade **(Holmes e Lin, 2006; Frey e Zamora, 2007)**; distúrbios endócrinos e metabólicos como a dislipidemia **(Ozgurtas et al., 2003)**, resistência periférica à insulina **(Gaida et al., 2009)**, e diabetes **(Mokdad et al., 2003; Holmes e Lin, 2006; Guney et al., 2015)**; doenças reumatológicas **(Peiró et al., 1975; Pritchard e Berney, 1989; Prasad et al., 2003; Lu et al., 2012)**; doença renal crônica **(Hofmann et al., 1990)**; predisposição genética **(Harvie et al., 2004; Mokone et al., 2005; Mokone et al., 2006; Godoy-Santos et al., 2011; 2013)**; gênero feminino para as tendinopatias em geral **(Magnusson et al., 2008)** e masculino para a TTC **(Åström et al., 1995)**; tipagem sanguínea tipo O **(Józsa et al., 1989; 1990; Kujala et al., 1992)**; alterações posicionais e estruturais do tornozelo e pé, tais como pé plano, pé cavo, valgo e varo do retropé **(Clement et al., 1984; Kaufman et al., 1999; Williams et al.; Nigg, 2001)**; limitação do arco de movimento, dorsiflexão aumentada e força de flexão plantar diminuída da articulação talocrural **(Kvist, 1991; Mahieu et al., 2006)**; e contratura do músculo gastrocnêmio **(Kaufman et al., 1999)**.

Dentre os fatores de risco extrínsecos estão inclusos: sobrecarga mecânica representada pela prática de atividades físicas esportivas (**Maffulli et al., 2004; Kujala et al., 2005; Scott e Ashe, 2006**); hipertermia tendínea induzida por exercício físico (**Birch et al., 1997**); terapia de reposição hormonal e uso de anticoncepcionais hormonais orais (**Holmes e Lin, 2006**), injeções tendíneas ou terapia sistêmica com corticosteroides (**Gottlieb e Riskin, 1980; McWhorter et al.; Newnham et al., 1991; Mahler et al., 1992; Shrier et al., 1996; Fredberg, 1997**); e a utilização de antibióticos da classe das fluoroquinolonas (**Malaguti et al., 2001; Chhajed et al., 2002**).

Embasadas no conhecimento desses múltiplos fatores de risco, historicamente, algumas teorias fisiopatológicas foram propostas na literatura. Na teoria vascular, os tendões, tecidos metabolicamente ativos, necessitam de suprimento vascular adequado. Alguns tendões, mais especificamente o tendão do calcâneo (**Lagergren e Lindholm, 1959**), tibial posterior (**Petersen et al., 2002; Prado et al., 2006**) e supraespinal (**Lohr e Uhthoff, 1990**), possuem áreas com suprimento vascular diminuído, que, influenciada por outros fatores como envelhecimento, doença vascular periférica ou trauma prévio, propiciam o início do processo patológico (**Kjaer et al.; Pufe et al., 2003**). No entanto, estudos demonstram que amostras histológicas de TP apresentam vascularização e celularidade aumentadas (**Movin et al., 1997b; Åström e Rausing 1995**), assim como fluxo sanguíneo elevado na região acometida, o que pode contradizer a teoria vascular ou representar processo cicatricial secundário à lesão hipóxica inicial (**Åström e Westlin, 1994a, Åström 2000**).

A teoria fisiopatológica mecânica da TP defende que a TP seria causada por microtraumas de repetição, levando à doença por sobrecarga, ou uso excessivo (Stanish et al., 1985; Herring e Nilson, 1987; Archambault et al., 1995; Kannus; Selvanetti et al., 1997; Kjaer, 2001). Essa teoria está baseada nas propriedades biomecânicas dos tendões quanto a sua deformação frente à aplicação de forças de tração, descritas em 1978 por Butler et al. Os autores descrevem que cargas de menor intensidade, dentro do limite fisiológico, cursam com alongamento inferior a 4% do comprimento longitudinal do tendão. Alongamentos superiores a 4% causam lesão de um ou mais dos feixes de fibras colágenas e os maiores que 8% a 12% resultam em rotura completa do tendão (Figura 1).

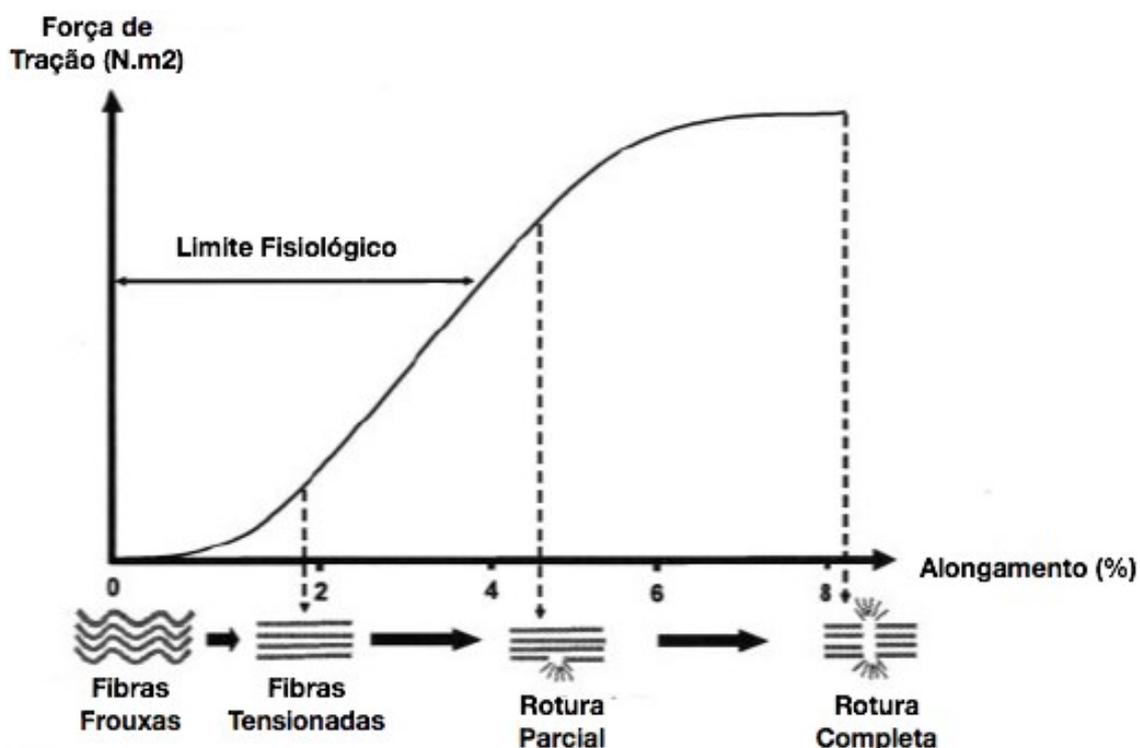


Figura 1. Deformação tendínea frente à aplicação de cargas de tração

As sobrecargas de repetição causam pequenos e consecutivos alongamentos, abaixo do limiar lesional, mas que a longo prazo levam à fadiga tecidual, desbalanço entre lesão e reparo, e conseqüente desenvolvimento de microlesões tendíneas e perpetuação da TP (**Frost, 1990; Arnoczky et al., 2007**). No entanto, sabe-se que a aplicação de cargas mecânicas de tração no tendão induz tanto atividades teciduais catabólicas quanto anabólicas (**Benjamin, 2002**), e que a retirada total da carga de tração, com repouso prolongado, também está relacionada ao desenvolvimento de TP (**Ohno et al., 1993; Kubo et al., 2004**). Desta forma, a quantidade, a intensidade, a frequência e o volume exatos de carga aplicada necessários para a indução da patologia são desconhecidos.

O modelo da tendinopatia em contínuo descrito por **Cook e Purdam (2009)**, objetiva associar a influência da sobrecarga mecânica com os diversos estados histológicos tendíneos descritos na literatura (**Cook e Purdam, 2009; Cook et al., 2016**). Os autores propõem três estágios subsequentes de tendinopatia, que representam uma patologia em continuidade: estágio 1, ou tendinopatia reativa; estágio 2, ou disfunção tendínea; estágio 3, ou tendinopatia degenerativa. No modelo, a adição ou retirada de carga representam o estímulo principal para progressão ou resolução da TP, principalmente nos dois estágios iniciais (**Cook et al., 2001**). Frequência, volume e duração da carga mecânica aplicada representam variáveis importantes.

No estágio da tendinopatia reativa ocorre um processo proliferativo e não inflamatório dos tenócitos e da matriz extracelular (MEC). A sobrecarga mecânica aguda resulta em resposta adaptativa imediata e temporária do

tendão, com espessamento homogêneo e aumento de sua área de secção transversa com o objetivo de diminuição do estresse (**Scott et al., 2007**). Tal alteração ocorre em desacordo com o enrijecimento tendíneo esperado frente a uma carga de tração (**Magnusson et al., 2008**). Ocorrem ainda metaplasia condroide, com núcleos celulares arredondados e basofílicos, e aumento do número de organelas citoplasmáticas e da produção proteica, principalmente dos proteoglicanos de alto peso molecular, como o agregano e o versicano (**Scott et al., 2007; McCreesh e Lewis, 2013**). Essa produção resulta em alteração estrutural da MEC, conseqüente da hidratação associada à expressão aumentada desses proteoglicanos. Essa resposta inicial ocorre de maneira muito mais rápida quando comparada à produção de proteoglicanos de baixo peso molecular, como a decorina e o biglicano, que são os mais frequentes no tendão saudável. A produção destas glicoproteínas é mais complexa e pode demorar até 20 dias (**Samiric et al., 2004**). Não ocorrem alterações neurovasculares ou da integridade e do arranjo dos feixes de fibras colágenas (**Cook et al., 2001**).

O estágio da disfunção tendínea representa a tentativa de cicatrização do tendão. Progridem as alterações encontradas no estágio inicial, porém com destruição focal de extensão variável da matriz extracelular. Ocorrem hiperproliferação celular de linhagem condrocítica e hiperprodução proteica, principalmente de proteoglicanos e colágeno (**Cook e Purdam, 2009; Cook et al., 2016**). O aumento da produção de proteoglicanos e a conseqüente expansão da substância fundamental amorfa da MEC leva à separação dos feixes e das fibras colágenas (**Burssens et al., 2013**). A vascularização e a inervação tendínea podem estar aumentadas neste estágio da TP (**Danielson**

et al., 2006), em consequência de regulação positiva na produção do fator de crescimento vascular endotelial (**Pufe et al., 2001; Nakama e King, 2006**) e invasão tendínea por pequenos ramos nervosos (**Alfredson et al., 2003; Schubert et al., 2005; Lian et al., 2006**). Nessa fase da doença, as alterações teciduais são passíveis de reversão por meio de controle da sobrecarga mecânica ou de exercícios que estimulem o remodelamento da MEC (**Ohberg et al., 2004**).

O estágio da tendinopatia degenerativa demonstra achados típicos de uma tendinopatia crônica. Progridem as alterações celulares e da MEC (**Kraushaar et al., 1999**), com regiões hipocelulares e acelulares, de morte celular por apoptose ou exaustão de tenócitos (**Lian e Scott, 2007**). Áreas com destruição completa da matriz extracelular e da arquitetura colágena, preenchidas por vasos sanguíneos e produtos da degradação da MEC também são encontradas. Tais achados são heterogêneos e multifocais, com ilhas de patologia degenerativa permeando áreas com características histológicas de fases mais precoces da TP ou mesmo de tendão. Nesse estágio da doença, a capacidade de reversão das alterações patológicas é muito limitada (**Cook e Purdam, 2009; Cook et al., 2016**).

3.3 Modelos animais de tendinopatia

Estudos sobre a fisiopatologia da TP são de difícil realização nos seres humanos, uma vez que necessitam de coleta de amostras teciduais em fases

iniciais da doença. Os espécimes tradicionalmente coletados para avaliação são provenientes de biópsias e tratamentos cirúrgicos de pacientes sintomáticos e com doença de longo período de evolução (**Dirks e Warden, 2011**).

Para um melhor entendimento das causas e fatores de risco da TP, o desenvolvimento e a utilização de modelos científicos experimentais se fazem necessários e podem ser realizados in vitro, ex vivo ou in vivo (**Dirks e Warden, 2011**). A utilização dos modelos experimentais permite a realização de estudos em fases precoces da doença, a realização de intervenções específicas e a avaliação de diferentes variáveis envolvidas com o desenvolvimento da patologia, em níveis molecular, microscópico e macroscópico.

A utilização dos modelos in vitro envolve a realização de estudos em nível celular, de tenócitos e fibroblastos submetidos ao crescimento e à multiplicação em ambiente artificial. Na avaliação das TP esses modelos permitem a investigação, de maneira rápida e eficaz, de diferentes processos celulares como a síntese de ADN, mitose, expressão gênica e diferenciação celular, envolvidos na resposta a estímulos específicos como a sobrecarga mecânica (**Almekinders et al., 1993; Wang et al., 2003; Li et al., 2004**).

Os modelos ex vivo permitem estudos em nível tecidual e a avaliação da interação entre os componentes celulares e da MEC tendínea frente a estímulos teciduais como a sobrecarga mecânica. Esses modelos não possuem a complexidade de um modelo in vivo, uma vez que não possibilitam o estudo do processo cicatricial por completo devido à ausência de

vascularização e de moléculas de sinalização sistêmica (**Arnoczky et al., 2002; Devkota et al., 2005; Devkota et al., 2007**).

Enquanto os modelos in vitro e ex vivo são benéficos para o estudo de respostas celulares e teciduais específicas, a utilização de modelos in vivo em animais são essenciais no entendimento mais completo da TP (**Dirks e Warden; Lui et al., 2011**). Esses modelos possibilitam a revisão das vias patológicas associadas com o início e progressão da doença, potencialmente conduzindo ao desenvolvimento de novas estratégias preventivas e terapêuticas. Os animais laboratoriais utilizados também apresentam maior homogeneidade e permitem maior controle de fatores associados e confundidores (**Lui et al., 2011**).

Um modelo animal válido deve replicar de forma consistente as características clínicas, histopatológicas e funcionais da doença estudada. O modelo animal ideal para o estudo de uma patologia humana deve reproduzir as seguintes características: tecido animal semelhante ao de interesse nos humanos; simulação precisa das condições que induzem a patologia; achados histológicos similares; representar modelo passível de replicação (**Carpenter et al., 1999; 2004**).

Diversos modelos animais de TP são descritos na literatura. Essa diversidade de métodos muitas vezes se faz necessária pelo fato de que cada um dos modelos, frequentemente, representa aspectos diferentes e específicos da doença (**Lake et al., 2008**). Múltiplas espécies animais foram utilizadas, uma vez que não existem animais com características tendíneas anatômicas exatamente iguais aos humanos. Desta forma, a escolha do animal a ser

utilizado é frequentemente uma decisão do pesquisador, por razões específicas relacionadas à metodologia do estudo (**Warden, 2007**).

Os modelos animais de TP são divididos em: de ocorrência natural e induzidas. Os modelos de ocorrência natural estão associados a animais de competição, como cães e cavalos, submetidos a sobrecarga mecânica em treinamentos e corridas. No entanto, não são utilizados com frequência devido às dificuldades relacionadas ao maior porte desses animais e aos maiores custos envolvidos com sua utilização (**Dowling et al., 2002; Fransson et al., 2005**).

Os modelos animais de TP induzida podem ser divididos em duas categorias: tendinopatia induzida por sobrecarga mecânica, que representa o fator extrínseco mais comumente associado ao diagnóstico da doença, e a tendinopatia induzida por substâncias químicas, substâncias estas relacionadas à fisiopatologia da doença e encontradas em concentrações aumentadas nas amostras teciduais patológicas da TP humana (**Devkota e Weinhold, 2010; Dirks e Warden; Lui et al., 2011**).

Os animais mais utilizados nesses modelos são os ratos e os coelhos. Essas espécies apresentam menor custo e são facilmente manejados no ambiente laboratorial, quando comparados a animais de maior porte. Os coelhos comparados aos ratos apresentam a vantagem de possuírem tendões de maiores dimensões, que proporcionam a aquisição de amostras teciduais de melhor qualidade. No entanto, são mais frágeis e mais propensos a complicações pós-operatórias e morte, principalmente por diarreia e infecção urinária, e necessitam de maiores cuidados quando utilizados (**Lui et al., 2011**).

3.3.1 Modelos animais de tendinopatia induzida por sobrecarga mecânica

São descritos quatro modelos para indução mecânica da TP: corrida forçada em esteira; estimulação elétrica da musculatura; estiramento tendíneo direto e o modelo do desuso (**Dirk e Warden, 2011**). Os modelos de indução mecânica são mais laboriosos e necessitam de maior tempo de estimulação tendínea para que o processo patológico se inicie e assim resulte em achados teciduais condizentes com o diagnóstico da TP. Tais achados são induzidos de maneira crônica e progressiva e reproduzem de maneira mais semelhante a TP de sobrecarga nos humanos, o que representa uma vantagem desses modelos (**Lui et al., 2011**). No entanto, as alterações histológicas nos animais, induzidas pela sobrecarga mecânica, cicatrizam uma vez que os estímulos deletérios sejam interrompidos (**Jelinsky et al., 2008**), o que não representa a TP crônica dos humanos (**Longo et al., 2009**).

Nos modelos de estimulação elétrica, são utilizados eletrodos de superfície que estimulam a contração muscular repetida e a sobrecarga tendínea. **Backman et al.**, em 1990, utilizam a técnica no músculo tríceps sural de coelhos e demonstram achados histológicos condizentes com TP crônica, similares à patologia humana. Tais achados foram reproduzidos com sucesso em alguns estudos (**Nakama et al., 2005; 2006**), porém alterações histológicas tendíneas correspondentes à TP crônica dos humanos não foram evidenciadas em alguns protocolos de estimulação elétrica, tanto em ratos (**Messner et al., 1999**) como em coelhos (**Archambault et al., 2001**). A utilização desses

modelos apresenta vantagens quanto à possibilidade de controle exato da carga induzida no tendão, com achados mecânicos e histológicos aparentemente proporcionais à intensidade dos estímulos (**Nakama et al., 2005; 2007**). Suas desvantagens são: a necessidade da realização de procedimento anestésico para a aplicação dos estímulos; achados histológicos descritos variados nas diferentes áreas do tendão, sendo mais proeminentes na sua periferia (**Nakama et al., 2005; Asundi et al., 2008**); alterações teciduais similares nos tendões contralaterais e não estimulados, por provável mecanismo de atuação neuronal central, o que impossibilita a utilização deste membro como controle interno (**Andersson et al., 2011**).

O modelo de estiramento tendíneo direto, ou modelo da fadiga tecidual, é descrito por **Sun et al.** em 2008. Nele, o tendão em estudo é submetido a cargas repetidas de tração cíclica, aplicadas diretamente no tendão por meio de aparato externo apropriado, e necessita de procedimento anestésico e cirúrgico para sua instalação (**Sun et al., 2008; Fung et al., 2010**). Possui como principal vantagem a possibilidade do controle da carga aplicada e a agilidade de sua aplicação, uma vez que a maioria dos protocolos submete o tendão a apenas uma sessão de estiramento. Suas desvantagens incluem a necessidade do procedimento anestésico, da exposição cirúrgica do tendão para instalação do aparelho e o fato de a tendinopatia ser induzida com apenas uma sessão de estiramento, com alterações teciduais de instalação aguda. Além disso, assim como nos modelos de estimulação elétrica, os membros contralaterais não poderiam ser utilizados como controle, pois, podem apresentar alterações teciduais secundárias, mesmo sem terem sido submetidos à sobrecarga (**Dirks e Warden; Lui et al., 2011**). Os achados

histológicos descritos com a utilização dessa técnica são similares aos da TP crônica dos humanos, com desorganização, afinamento, descontinuidade e afastamento das fibras colágenas, aumento da expressão de ARN mensageiro dos colágenos I, II e V, e também de metaloproteases e interleucinas, na ausência de células inflamatórias (**Sun et al., 2008; Fung et al., 2010**). No entanto, tais achados são temporários, com cicatrização progressiva após a cessação do estímulo biomecânico (**Dirks e Warden; Lui et al., 2011**).

O modelo do desuso simula a ocorrência da tendinopatia na população sedentária (**Kvist, 1994; Rolf e Movin, 1997**). Descrito por **Nakagawa et al.** em 1989, induzem alterações teciduais de TP nos tendões do calcâneo de ratos mantidos por cinco semanas suspensos pelo rabo, sem aplicação de carga nos membros pélvicos. Ocorrem diminuição no conteúdo colágeno do tendão calcâneo desses animais, assim como aumento relativo nas fibras colágenas mais finas, colágeno tipo III, quando comparadas às mais grossas, colágeno tipo I.

O modelo da corrida forçada em esteira é o mais utilizado dentre os de indução mecânica. Para o desenvolvimento da TP o animal é estimulado a correr sobre uma esteira rolante, simulando a sobrecarga física que supostamente ocorreria nos humanos (**Dirks e Warden; Lui et al., 2011**). Esse modelo é utilizado na literatura ortopédica para indução de patologia em ratos, mais especificamente no tendão do músculo supraespinal (**Soslowsky et al., 2000; Perry et al., 2005**), e no tendão do calcâneo (**Huang et al., 2004; Glazebrook et al., 2008**). Alterações histológicas e biomecânicas evidenciadas são consistentes com os achados da TTC em humanos (**Ng et al., 2011; Jafari et al., 2015**), principalmente nos protocolos de corrida com esteira em proclive

(**Glazebrook et al., 2008; Silva et al., 2011**). Nessa posição, as fibras do complexo gastrocnêmio-sóleo e do tendão do calcâneo permanecem alongadas, submetidas a contrações excêntricas de maior carga de tração, que levam a maior risco no desenvolvimento de sua TP (**Fridén, 1984; Stauber et al., 1990; Lindstedt et al., 2001**). No entanto, alguns estudos demonstram achados histológicos e biomecânicos controversos com o modelo de sobrecarga em esteira em proclive, sem efeito na indução da TTC (**Dirks et al., 2013a,b**) ou mesmo com efeito protetor e curativo nos tendões sobrecarregados (**Fyfe e Stanish, 1992; Heinemeier et al., 2012**).

As vantagens na utilização dos modelos por sobrecarga em esteira estão relacionadas à indução de lesões por sobrecarga mecânica de repetição mais fisiológica, associadas à atividade física, com patologia tendínea progressiva, o que mimetiza a doença dos humanos (**Glazebrook et al., 2008; Dirks e Warden; Lui et al., 2011**). No entanto, a manutenção prolongada do estímulo mecânico leva à redistribuição compensatória na descarga de peso do animal, o que progressivamente diminui a eficácia da sobrecarga na indução do dano tecidual ao tendão (**Devkota et al., 2007**). Além disso, as alterações histopatológicas induzidas pela sobrecarga mecânica são mantidas apenas durante o período de aplicação do estresse (**Glazebrook et al., 2008**). Esses achados podem estar relacionados com a habilidade inata dos ratos no ato de correr. Animais dessa espécie são considerados corredores habituais e percorrem até 8 quilômetros por dia, quando em seu habitat natural, e podem se adaptar a protocolos de exercício físico (**Russell et al., 1987; Wisløff et al., 2001; Warden, 2007**). Outra desvantagem da técnica dos modelos de corrida

forçada é demanda de grande quantidade de tempo e esforço, tanto dos pesquisadores como dos animais (**Dirks e Warden; Lui et al., 2011**).

3.3.2 Modelos animais de tendinopatia induzida por sobrecarga química

Nos modelos induzidos por agentes químicos, as substâncias mais utilizadas são a colagenase, citocinas, prostaglandinas e antibióticos da classe das fluoroquinolonas. A maioria desses modelos envolve a injeção intratendínea direta da substância no tendão, com exceção feita às fluoroquinolonas, que podem ser de administração sistêmica. Tais modelos possuem a vantagem da rapidez e efetividade da aplicação do agente químico e na indução das alterações teciduais condizentes com TP, no entanto, os achados são induzidos agudamente, o que não reproduz a evolução progressiva da TP nos humanos (**Dirks e Warden; Lui et al., 2011**).

A utilização das citocinas baseia-se na possibilidade da existência de uma reação inflamatória inicial transitória durante o desenvolvimento da TP nos humanos, seguida pela degeneração tendínea. As citocinas são glicoproteínas produzidas durante as fases de ativação e efetora da imunidade, e regulam a resposta inflamatória. O modelo de TP induzido por injeções de citocinas foi descrito por **Stone et al.** em 1999. Realizam injeções de citocinas no tendão patelar de coelhos e demonstram achados reversíveis de reação hiper celular

inicial, diminuição da resistência do tendão às cargas de tração, porém sem alterações da MEC e degradação colágena condizentes com TP.

O modelo induzido pela injeção de prostaglandinas (PGs) reproduz a expressão aumentada dessas substâncias pró-inflamatórias nos tendões, mais especificamente da prostaglandina tipo E2 (PGE2), durante a prática de atividades físicas (**Langberg et al., 1999; Zhang e Wang, 2010**), em amostras teciduais de tendões doentes (**Fu et al., 2002b**) e em estudos in vitro com sobrecarga mecânica de fibroblastos (**Almekinders et al., 1993; Wang et al., 2003**). **Sullo et al. em 2001** realizam injeções seriadas de prostaglandina E1 (PGE1) no tendão do calcâneo de ratos e demonstram achados histológicos inflamatórios iniciais com subsequente evolução para tendinopatia degenerativa, associada à degradação e desorganização colágena. No entanto, não existe comprovação de que a expressão aumentada de PGE1 esteja relacionada ao desenvolvimento das tendinopatias nos humanos. **Khan et al. (2005)** promovem injeções seriadas de PGE2 no tendão patelar de coelhos e observam alterações colágenas degenerativas e dose-dependentes, porém sem reação inflamatória inicial. **Ferry et al. (2012)**, em estudo similar, não encontram diferenças histológicas ou biomecânicas nos tendões patelares de ratos injetados com PGE2, quando comparados aos controles, e sugerem efeito protetor da substância nos tendões injetados.

A utilização das fluoroquinolonas nos modelos animais de tendinopatia foi iniciada após constatação clínica de que a administração desses antibióticos está associada ao desenvolvimento de TP e roturas tendíneas nos seres humanos (**McEwan et al., 1988; Ribard et al.; Lee e Collins, 1992**), principalmente no tendão do calcâneo (**van der Linden et al., 2001**), com

achados histológicos similares às TP induzidas por sobrecarga mecânica **(Movin et al., 1997a)**. Nos animais, a medicação pode ser utilizada através de administração sistêmica ou local. Os achados patológicos são dose-dependentes e estão mais relacionados a alguns subtipos específicos de fluoroquinolonas **(Kato et al., 1995; Kashida e Kato, 1997)**.

O modelo animal de TP induzida por substância química que mais se utiliza na literatura é o da enzima colagenase bacteriana. Justifica-se sua utilização pelo fato da tendinopatia nos humanos demonstrar expressão aumentada das metaloproteases da MEC, classe enzimática à qual pertencem as colagenases, e lesão tendínea com destruição colágena catalisada por essas enzimas **(Fu et al., 2002a; Yang et al., 2005)**. Baseia-se também na comprovação de concentrações aumentadas da enzima colagenase em estudos animais com tendinopatia induzida por sobrecarga mecânica **(Devkota et al., 2010)**. Sua utilização na literatura demonstra achados tendíneos macroscópicos, histológicos, biomecânicos e de exames de imagem condizentes com o diagnóstico de TP que incluem: hipervascularização, hiper celularidade, desorganização da MEC e das fibras colágenas, metaplasia celular condroide, cicatrização falha, edema tendíneo e aumento de sua área de secção transversa, hipoecogenicidade no exame ultrassonográfico, distúrbio funcional da matriz extracelular com hiperexpressão de proteoglicanas, aumento da proporção de colágeno tipo III quando comparado ao colágeno tipo I e sinais tardios de formação óssea e calcificações **(Lui et al., 2009; 2010a,b)**. Injeções intratendíneas de colagenase são utilizadas na indução de TP em diferentes espécies animais e tendões, como os flexores superficial e profundo dos dedos, tendão do calcâneo, patelar e supraespinal **(Soslowsky et al.,**

1996; Stone et al., 1999; Hsu et al., 2004; Dahlgren et al., 2006a; Lui et al., 2009).

Em 1983, **Silver et al.** propõem de forma pioneira a utilização da enzima colagenase para indução de TP em cavalos.

Williams et al. em 1984, também em cavalos, comparam os achados histológicos e morfológicos de alterações teciduais induzidas por injeção de colagenase e lesão traumática. Descrevem processo regenerativo similar e preconizam a utilização da enzima na indução das alterações.

Em 1992, **Foland et al.** utilizam injeção única de 4000 unidades de colagenase do tipo I no tendão flexor superficial dos dedos de oito cavalos, com achados histológicos de TP e aumento da expressão de colágeno tipo III em relação ao colágeno tipo I após 12 semanas de seguimento.

Em 1996, **Soslowsky et al.** em estudo com 36 ratos desenvolvem modelo animal de tendinopatia do supraespinal. Utilizam dose única de 80 microlitros da enzima colagenase bacteriana do tipo VII em dois grupos de 12 ratos, um deles submetidos isoladamente à injeção da enzima, simulando estímulo intrínseco, e o outro induzido pela aplicação da enzima e de um estímulo extrínseco compressivo que simula o impacto coracoacromial do ombro dos humanos. Realizam eutanásia com quatro, oito e 12 semanas. No grupo tratado isoladamente com a injeção de colagenase, evidenciam alterações histológicas importantes com quatro e oito semanas, com hiper celularidade não inflamatória, com células mais arredondadas e metabolicamente ativas, além de desorganização e destruição colágena e aumento da vascularização tendínea. As alterações descritas demonstravam

melhora parcial após 12 semanas no grupo submetido a injeção de colagenase isolada, porém sem resolução completa.

Em 1997, **Davidson et al.** avaliam o efeito terapêutico do ultrassom no TC de 20 ratos, 10 deles com TP induzida por injeção única de 0,3mg de colagenase bacteriana do tipo I. Encontram aumento do número de tenócitos, além de destruição e desorganização das fibras colágenas nos tendões submetidos à injeção de colagenase e não tratados com o protocolo de ultrassom.

Em 1999, **Stone et al.** comparam a utilização de citocinas e colagenase na indução de TP do tendão patelar de 40 coelhos. Destes, 20 recebem injeção única de 0,25mg de colagenase bacteriana do tipo I em um dos tendões e solução fisiológica 0,9% de NaCl no tendão contralateral. Avaliam resultados histológicos e biomecânicos com quatro e 16 semanas de seguimento. Reportam aumento difuso da celularidade e da vascularização tendínea com quatro semanas e alterações teciduais mixoides, hiper celularidade persistente, fibrose focal e desarranjo das fibras colágenas após 16 semanas de seguimento. Na análise biomecânica encontram, em ambos os tempos de seguimento, aumento significativo da área transversa dos tendões injetados, quando comparados aos controles, e uma tendência não significativa de diminuição da rigidez e da força no limite da resistência máxima do tendão, porém, sem alteração na porcentagem de deformação.

No ano de 2001, **Marsolais et al.** avaliam a atuação precoce de macrófagos e neutrófilos na TTC de 32 ratos, induzida por dose única de 0,3mg de colagenase bacteriana do tipo I. Descrevem proliferação celular e desorganização da MEC dos tendões injetados após um, três, sete e 14 dias

do procedimento, com diminuição da contagem celular após 28 dias, porém com manutenção da desorganização colágena. Encontram rápido aumento do número de neutrófilos no 1º e 3º dias de seguimento, seguido de progressivo aumento do número de macrófagos fagocíticos provenientes da circulação. Observam que a contagem de neutrófilos normaliza após sete dias e a de macrófagos fagocíticos no 14º dia. Os macrófagos não-fagocíticos, residentes do tecido tendíneo e atuantes na proliferação celular e reparo tecidual, estão diminuídos inicialmente, com aparente aumento no 28º dia de seguimento.

Em 2002, **Dahlgren et al.** realizam estudo terapêutico em oito cavalos com TP bilateral do tendão flexor superficial induzida por injeção única de 2640 unidades de colagenase bacteriana do tipo I. Os membros controles, que não receberam terapêutica, são então submetidos a 10 injeções seriadas de solução fisiológica, realizadas a cada dois dias e iniciadas após três dias da injeção da enzima colagenase. Tendões controles demonstram diminuição da rigidez e resistência da força no limite da resistência máxima do tendão. Apenas duas amostras falharam na região da TP induzida, com falhas se concentrando na junção músculo-tendínea ou na inserção óssea do tendão. Observam ainda expressão aumentada de ambos colágenos tipos I e III e de proteoglicanos. Os achados histológicos incluem hiperplasticidade, morfologia celular arredondada e neovascularização, entremeadas por tecido tendíneo de aspecto microscópico normal.

No ano de 2004, **Chen et al.** estudam o efeito da terapia com ondas de choque no tendão do calcâneo de 123 ratos com TP induzida por injeção única de 0,3mg de colagenase bacteriana do tipo I. Demonstram alterações teciduais degenerativas circundadas por tecido fibroso em 24 ratos não

submetidos à terapia por ondas de choque, com diminuição da rigidez e da força no limite da resistência máxima do tendão.

Dahlgren et al., em 2006b, induzem TP bilateral do tendão flexor superficial com injeção única de 2097 unidades de colagenase bacteriana do tipo I em 14 cavalos. Realizam eutanásia com uma, duas, quatro, oito e 24 semanas. Descrevem achados histológicos com tecido hipocelular amorfo após uma a duas semanas de seguimento, com maior organização do tecido cicatricial preenchido por colágeno e aumento gradual da celularidade, inicialmente de formato mais arredondado e condroide, mas progressivamente mais fusiformes e semelhantes ao tenócito normal com 8 e 24 semanas. Após 24 semanas, as amostras se mantinham hipercelulares e com densidade colágena diminuída quando comparadas aos controles, demonstram ainda expressão aumentada de ARN mensageiro para produção de ambos colágenos tipos I e III.

Também em 2006, **Godbout et al.** executam estudo controlado com 180 ratos em que avaliam o papel do estímulo mecânico na cicatrização da TTC. Após indução da TP com dose única de 0,3mg de colagenase bacteriana, realizam protocolo de exercício físico voluntário em esteira, precoce ou tardio, e avaliam influência em resultados histológicos e biomecânicos. Realizam eutanásias após três, sete e 28 dias da injeção da colagenase. Descobrem que ratos submetidos à atividade física precoce, apesar de apresentar maior deposição colágena inicial, possuem reação inflamatória prolongada, com maior liberação de mediadores inflamatórios e recrutamento de macrófagos e neutrófilos, com perpetuação do ciclo vicioso de estímulo e destruição tecidual, o que resulta em tendões mecanicamente mais fracos após 28 dias de

seguimento. Já a realização de atividade física tardia, após sete dias da injeção da colagenase, não apresenta efeito negativo na cicatrização tendínea. Tendões com doença induzida pela colagenase e que não foram exercitados, quando comparados a controles não submetidos à injeção da enzima, apresentam maior edema e conteúdo total de água após três e sete dias, maior concentração de neutrófilos no terceiro dia e proliferação celular no sétimo dia, além de menor rigidez e força no limite da resistência máxima do tendão após sete e 28 dias.

Em 2009, **Lui et al.**, em estudo com tendões patelares de 38 ratos, contrastam os efeitos de injeção única de 0,3mg de colagenase bacteriana do tipo I e solução fisiológica 0,9% de NaCl. Realizam eutanásia dos animais injetados com a enzima após duas, quatro, oito, 16 e 32 semanas de seguimento e dos injetados com solução fisiológica após 16 semanas. Encontram hiper celularidade, desorganização da MEC e hipervascularização após 2 e 4 semanas, com células arredondadas de semelhança condrocítica após 4 semanas. Alterações retrocedem com 8 semanas de seguimento demonstrando tentativa de reparo tecidual, no entanto, deterioram novamente após 12 semanas, com metaplasia condroide e calcificações, que se intensificam após 16 semanas e estão mantidas na semana 32. Já nos tendões injetados com solução fisiológica, tenócitos permanecem em número normal e bem alinhados entre os coesos e paralelos feixes de fibras colágenas. O grupo injetado com colagenase demonstra ainda, quando comparados aos injetados com solução fisiológica, alteração significativa da birrefringência colágena em todos os tempos de seguimento.

Fu et al., também em 2009, em estudo com 58 ratos, induzem TP no tendão patelar com 0,3mg de colagenase tipo I e observam degeneração importante da MEC e hiper celularidade associada à resposta inflamatória inicial após duas semanas de seguimento. A celularidade diminui progressivamente nas semanas quatro e oito, demonstrando tentativa de reparo da lesão, mas volta a se intensificar após 12 semanas, com degeneração da MEC e ausência de células inflamatórias, e após 16 semanas, com progressão da celularidade, hipervascularização, destruição da MEC, com presença de calcificações. Tendões injetados com solução fisiológica 0,9% de NaCl não apresentam alterações histológicas em nenhum dos seguimentos avaliados.

No ano de 2010b, **Lui et al.** injetam o tendão patelar de 36 ratos com 0,3mg de colagenase bacteriana do tipo I e utilizam o tendão contralateral como controle, injetado com solução fisiológica. Observam, através de análise imuno-histoquímica e de quantificação do ARN mensageiro, que animais injetados com colagenase, quando comparados aos controles, demonstram expressão aumentada de ambos colágenos tipos I e III após duas semanas de seguimento, com diminuição progressiva da expressão com quatro e 12 semanas, porém com manutenção da expressão relativa do colágeno tipo III em comparação ao colágeno tipo I após 12 semanas. Demonstram também expressão aumentada e progressiva de proteoglicanos como o biglicano, agrecano e fibromodulina, o que não se observa para a decorina, que se manteve constantemente aumentada durante os diferentes tempos de seguimento. Alterações são difusas inicialmente e localizadas com 12 semanas de seguimento, com metaplasia condroide e calcificações intratendíneas. Concluem que a expressão aumentada dos proteoglicanos e a expressão de

colágeno tipo III em relação ao tipo I estão associados com a desorganização da MEC, metaplasia condroide e ossificação presentes na TP.

Também em 2010a, **Lui et al.** utilizam 36 ratos e induzem TP unilateral no tendão patelar de metade deles utilizando dose 0,3mg de colagenase bacteriana do tipo I, e comparam os resultados com animais que foram injetados com solução fisiológica 0,9% de NaCl e com os membros contralaterais não injetados. Realizam eutanásia com duas, quatro, oito, 12 e 16 semanas no grupo injetado com colagenase e apenas com 16 semanas no grupo submetido à injeção de solução fisiológica. Encontram no grupo injetado com a enzima celularidade aumentada e desorganização da MEC com duas e quatro semanas, com vascularização também aumentada na semana dois e ligeiramente reduzida na semana quatro. Descrevem a presença de células condroides apenas se iniciando na semana quatro. A densidade celular e a vascularização diminuem na semana oito, demonstram tentativa de reparo tecidual, porém células de linhagem condrocítica permanecem presentes. Alterações degenerativas se intensificam na 12^a semana, com aumento da celularidade e da neovascularização e há presença de calcificações intratendíneas em todas as amostras analisadas. Na semana 16, a metaplasia condroide progride e a hiper celularidade se mantém, com áreas de calcificação aumentadas e ligeira regressão da neovascularização. Tais achados não são encontrados nos tendões injetados com solução fisiológica ou nos controles não injetados.

Em 2011, **Chen et al.** avaliam o efeito da terapia com tenócitos autólogos no tratamento da TTC de 44 coelhos, induzida por injeção única de 0,3mg de colagenase bacteriana do tipo I. Eutanásias são realizadas após oito

e 12 semanas da injeção da enzima colagenase. Nos animais controles, tratados com injeção de meio de cultura celular ao invés da terapia autóloga de tenócitos, encontram elevados escores histológicos de tendinopatia, que progridem da 8^a para a 12^a semana, demonstrando alteração celular com metaplasia condroide, neovascularização e destruição da MEC persistente e progressiva. Descrevem também a expressão aumentada de colágeno tipo III e diminuição da rigidez e da força no limite da resistência máxima do tendão, quando comparados a controles não submetidos a injeção de colagenase.

No ano de 2012, **Marcos et al.** utilizam o modelo animal em ratos de TTC induzida por injeção única de colagenase bacteriana do tipo I, para avaliar a ação da terapia com laser e de anti-inflamatórios não hormonais na cicatrização da TP. Descrevem aumento de mediadores inflamatórios nos tendões com TP induzida e não tratados, incluindo as prostaglandinas E2 e ARN mensageiro da enzima ciclo-oxigenase 2 (COX-2), fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e metaloproteases da MEC nos tendões com TP induzida por colagenase quando comparados a controles. Demonstram ainda nesses tendões menor força no limite da resistência máxima.

Também em 2012, **Yoo et al.** avaliam a ação da terapia por ondas de choque extracorpórea na TTC de 45 ratos, induzida por injeção única de colagenase bacteriana do tipo I, na dose de 1,2mg.kg⁻¹. Eutanásias são realizadas em todas as fases da cicatrização tendínea, inflamatória (um, dois, três e cinco dias de seguimento), proliferativa (sete, 12 e 19 dias) e de remodelamento (26 e 33 dias). Tendões com TP induzida, quando comparados a controles, demonstram reação inflamatória e deterioração de sua nanoestrutura e de suas propriedades mecânicas. Com 12 dias apresentam

vascularização e celularidade aumentadas, desorganização das fibras colágenas, além de piora da nanoestrutura e de propriedades mecânicas do tendão. No 26º dia de seguimento, tendões injetados por colagenase ainda possuem achados de inflamação crônica.

Em 2013, **Rui et al.** realizam injeção de 0,3mg de colagenase bacteriana do tipo I no tendão patelar de 12 ratos, utilizando o membro contralateral como controles injetados com solução fisiológica. Após eutanásia com 2 semanas de seguimento, demonstram que células-tronco derivadas do tendão provenientes de tendões injetados com colagenase possuem menor potencial proliferativo e maior senescência quando comparadas às células provenientes de controles. Encontram também maior potencial condrogênico e osteogênico nas células injetadas com a enzima, com menor atividade tenogênica. Concluem que a alteração do destino das células tendíneas multipotentes para linhagens não tenocíticas podem explicar a ocorrência de metaplasia condroide e a formação de ossificação heterotópica do tendão com TP induzida por colagenase, diminuindo a capacidade de reparo do tendão.

Também em 2013, **Shah et al.** estudam diferentes doses terapêuticas de fator de crescimento derivado de plaquetas no controle da TTC de 60 ratos, induzida por dose única de 0,5mg de colagenase bacteriana do tipo I. Eutanásias são realizadas após sete, 14 e 28 dias após a injeção e diferentes animais são utilizados para análise histológica e biomecânica. Nos animais injetados apenas com solução carregadora, porém sem fatores de crescimento derivados de plaquetas, observam resposta inflamatória temporária após sete dias e alteração da vascularização tendínea, densidade e arranjo dos feixes de fibras colágenas, além de aumento da área de secção transversa e valores

diminuídos de rigidez, força e tensão no limite da resistência máxima e de módulo de elasticidade dos tendões injetados com colagenase, quando comparados a tendões contralaterais não infiltrados.

Ainda em 2013, **Casalechi et al.** utilizam 30 ratos com TTC, induzida por injeção única de 0,1mg de colagenase bacteriana do tipo I, para estudar o potencial anti-inflamatório da terapia com laser. Reportam menor expressão de fatores anti-inflamatórios nos tendões não submetidos ao tratamento com laser, mais especificamente da interleucina-10 (IL-10) e do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), assim como maior expressão de metaloproteases da MEC. Concluem que a utilização da terapia com laser poderia otimizar o potencial de cicatrização dos tendões com TP induzida.

Também em 2013, **Tsai et al.** realizam estudo controlado em 40 ratos com TTC induzida por injeção única de 0,3mg de colagenase bacteriana do tipo I. Avaliam os efeitos da aplicação de radiofrequência na marcha e no controle da dor. Descrevem alterações no padrão da marcha e aumento da expressão de marcadores de dor, como por exemplo, o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, nos animais com TP induzida pela colagenase e não submetidos ao tratamento com radiofrequência.

No ano de 2014, **Solchaga et al.** utilizam injeção única de 0,5mg de colagenase bacteriana do tipo I para indução de TTC unilateral em 198 ratos. Comparam resultados de 5 diferentes intervenções para o tratamento da TP induzida: duas diferentes dosagens de fator de crescimento derivado de plaquetas, plasma rico em plaquetas (PRP), acetato de triancinolona e solução fisiológica de NaCl a 0,9%. Eutanásias são realizadas após sete, 14 e 28 dias após a injeção da enzima e diferentes animais são utilizados para análise

histológica e biomecânica. O membro contralateral dos animais injetados com solução fisiológica são utilizados como controles sem intervenção. Achados histológicos dos tendões injetados com colagenase, antes de intervenções terapêuticas e após injeção de solução fisiológica, demonstram hiper celularidade, desorganização da MEC e ausência de infiltrado inflamatório, com regressão parcial dos achados após 28 dias. Na análise biomecânica, quando comparados aos controles não submetidos à injeção de colagenase, apresentam valores diminuídos de rigidez, força e tensão no limite da resistência máxima do tendão.

Também em 2014, **Machova Urdzikova et al.** avaliam a atuação de células mesenquimais multipotentes humanas na TTC de 81 ratos, induzida por injeção única de 0,3mg colagenase bacteriana do tipo I. Comparam achados histológicos e biomecânicos dos animais submetidos à terapia com células mesenquimais humanas com controles submetidos a tratamento com solução fisiológica de NaCl 0,9%, três dias após a indução da TP. Utilizam animais diferentes para os estudos histológicos e biomecânicos e promovem eutanásias com duas, quatro e seis semanas. Encontram nos tendões com TP induzida e não tratados com células multipotentes menor produção colágena, ambos tipos I e III, piores escores histológicos, associados com maior neovascularização, celularidade e desorganização da MEC, além de tendência a menor rigidez e força e no limite da resistência máxima do tendão.

Ainda em 2014, **Chen et al.** estudam a ação de células tronco derivadas do tendão em associação ao plasma rico em plaquetas no controle da TTC. Utilizam modelo de TP induzida por 250 unidades da enzima colagenase bacteriana do tipo I. Reportam menor expressão de ARN mensageiro e de

proteínas relacionadas aos tenócitos nos animais submetidos à injeção de colagenase. Concluem que a utilização de células tronco derivadas do tendão em associação ao plasma rico em plaquetas poderia minimizar os achados e acelerar a cicatrização tendínea.

Em 2015, **Kamineni et al.** realizam estudo controlado em 14 coelhos com TTC induzida por injeção única unilateral de 1,5mg de colagenase bacteriana do tipo I. Objetivam avaliar a degradação colágena nos tendões doentes. A eutanásia de dois animais é executada após três semanas da injeção da enzima para confirmar o desenvolvimento da TP e membros pélvicos contralaterais são utilizados como controles. Outros 12 animais são divididos em dois grupos, um controle e outro tratado com ultrassom percutâneo, com eutanásia após 6 semanas. Encontram escores histológicos da patologia aumentados em todos os grupos, quando comparados aos controles, com aumento da celularidade e vascularização, além de desorganização colágena. Descrevem também expressão aumentada de colágenos tipos I e III, além de diminuição da expressão de colágeno tipo X nos animais com TP induzida não submetidos ao tratamento com ultrassom.

Em 2016, **Orfei et al.** são primeiros a comparar o efeito de duas diferentes doses de colagenase bacteriana do tipo I na indução de TP no tendão do calcâneo de 40 ratos. Dividem os animais em dois grupos de 20 animais, um com injeção única de menor dose de colagenase (0,1mg) e outro com injeção única de maior dose (0,3mg) da enzima. Utilizam o membro contralateral como controles injetados com solução fisiológica de 0,9% de NaCl ou sem nenhuma intervenção. Realizam eutanásias com três, sete, 15, 30 e 45 dias após o procedimento. Na análise histológica encontram tendões

completamente normais para o grupo controle sem nenhuma intervenção, com feixes de fibras colágenas alinhados e compactos, tenócitos fusiformes, esparsos e paralelos às fibras colágenas. Para os tendões infiltrados com solução fisiológica, demonstram destruição parcial e perda da organização colágena na topografia da injeção, alterações estas completamente revertidas com 7 dias de seguimento e mantidas até o 45^o dia. Em ambos os grupos injetados com colagenase, encontram degeneração tendínea significativa e progressiva para todos os tempos de seguimento avaliados. Tais alterações são mais graves nos animais submetidos à maior dose de colagenase, com pico após 15 dias. Animais injetados com menor dose da enzima apresentam alterações mais leves, que são máximas após 3 dias. Após 45 dias, as alterações tendíneas que incluem desorganização colágena, hipervascularização, hipercelularidade, formato celular arredondado e infiltração gordurosa diminuem significativamente em ambos os grupos experimentais. No entanto, são ainda significativas no grupo submetido a maior dose da enzima, que difere dos controles injetados com solução fisiológica.

4. *Métodos*

4 MÉTODOS

4.1 Ética

O protocolo de pesquisa para este estudo foi aprovado pela Comissão Científica do Instituto de Ortopedia e Traumatologia, protocolo nº 908, e pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEP-FMUSP), protocolo de pesquisa nº 148/12 (**Anexo 1**).

4.2 Modelo animal de tendinopatia do tendão do calcâneo

4.2.1 Animais de experimentação

Foram avaliados 45 coelhos fêmeas da linhagem Nova Zelândia (*New Zeland*), com peso variando de 3000 a 4000g, com 17 a 21 semanas de vida, oriundos do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

O cálculo da amostra foi detalhado na seção de análise estatística do estudo.

Todos os coelhos foram avaliados quanto às condições gerais e acondicionados em gaiolas individuais (50 x 50 cm). Foram mantidos em ambiente climatizado (20° – 24° C), sob condições de higiene, alimentação e hidratação adequadas, com ciclo de 12h claro/12h escuro, no Laboratório de Investigação Médica do Sistema Músculo-Esquelético (LIM-41) do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

4.2.2 Critérios de inclusão e exclusão

Foram adotados os seguintes critérios de inclusão e exclusão:

Critérios de inclusão:

- Coelhos da raça Nova Zelândia (New Zeland);
- Fêmeas adultas jovens (17 a 21 semanas de vida, inclusive);
- Peso entre 3000 a 4000 gramas, inclusive;
- Condição geral, pelagem e estado clínico normais.

Critérios de exclusão:

- Óbito durante procedimento anestésico;
- Perda de tecido cutâneo na área de intervenção;
- Autofagia ou mutilação;
- Infecção profunda após intervenção;
- Infecção urinária (caracterizada por hematúria macroscópica);

- Perda de peso superior a 20% durante o período de seguimento

4.2.3 Formação dos grupos experimentais

Os 45 coelhos foram separados em três diferentes grupos (A, B e C) de tal forma que dois grupos continham 18 animais cada (Grupos A e B) e um grupo continha nove animais (Grupo C). Por definição, os coelhos do grupo A foram denominados de um a 18, os do grupo B de 19 a 36 e os do grupo C de 37 a 45. A alocação de cada coelho no seu respectivo grupo se deu por ordem de aquisição junto ao Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, de acordo com sequência numérica randômica predefinida e criada na plataforma eletrônica randomization.com (**Tabela 1**). Todos os coelhos foram submetidos a injeções intratendíneas bilaterais do tendão do calcâneo:

- Grupo Injeções Seriadas de Colagenase (Grupo A) - 18 animais submetidos a três injeções seriadas de enzima colagenase bacteriana do tipo A1 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, Estados Unidos da América), em doses baixas de 0,1 miligramas de colagenase (10 microlitros de solução contendo 10 miligramas de colagenase para cada 1 mililitro de solução fisiológica 0,9%), separadas por intervalos de 14 dias.

- Grupo Injeção Única de Colagenase (Grupo B) - 18 animais submetidos à injeção única da mesma enzima colagenase, em dose tradicionalmente utilizada na literatura de 0,3 miligramas de colagenase (30 microlitros de solução contendo 10 miligramas de colagenase para cada 1 mililitro de solução fisiológica 0,9%).
- Grupo Controle (Grupo C) – nove animais submetidos a três injeções seriadas de 10 microlitros de solução fisiológica a 0,9% de NaCl, separadas por intervalos de 14 dias.

Os grupos A e B foram então subdivididos de acordo com o momento da realização da eutanásia dos animais, com 10 semanas (Grupos A1 e B1), 12 semanas (Grupos A2 e B2) e 16 semanas (Grupos A3 e B3). O grupo controle não foi subdividido e todos animais foram submetidos à eutanásia na semana 16 (**Stone et al., 1999; Lui et al., 2009**). O fluxograma do modelo experimental, com a distribuição dos grupos, características e temporalidade das injeções e das eutanásias está representado na **Figura 2**.

Tabela 1 – Randomização dos coelhos em estudo

Ordem de Aquisição	Número do Coelho	Grupo
1º	1	A1
2º	19	B1
3º	43	C
4º	45	C
5º	6	A1
6º	12	A2

continua

		continuação
Ordem de Aquisição	Número do Coelho	Grupo
7 ^o	32	B3
8 ^o	29	B2
9 ^o	3	A1
10 ^o	42	C
11 ^o	34	B3
12 ^o	28	B2
13 ^o	25	B2
14 ^o	16	A3
15 ^o	11	A2
16 ^o	41	C
17 ^o	38	C
18 ^o	2	A1
19 ^o	37	C
20 ^o	30	B2
21 ^o	35	B3
22 ^o	15	A3
23 ^o	40	C
24 ^o	10	A2
25 ^o	13	A3
26 ^o	26	B2
27 ^o	20	B1
28 ^o	23	B1
29 ^o	18	A3
30 ^o	33	B3
31 ^o	14	A3
32 ^o	17	A3
33 ^o	5	A1
34 ^o	39	C
35 ^o	8	A2
36 ^o	31	B3
37 ^o	22	B1

continua

Ordem de Aquisição	Número do Coelho	Grupo
38 ^o	44	C
39 ^o	27	B2
40 ^o	24	B1
41 ^o	7	A2
42 ^o	9	A2
43 ^o	36	B3
44 ^o	21	B1
45 ^o	4	A1

conclusão

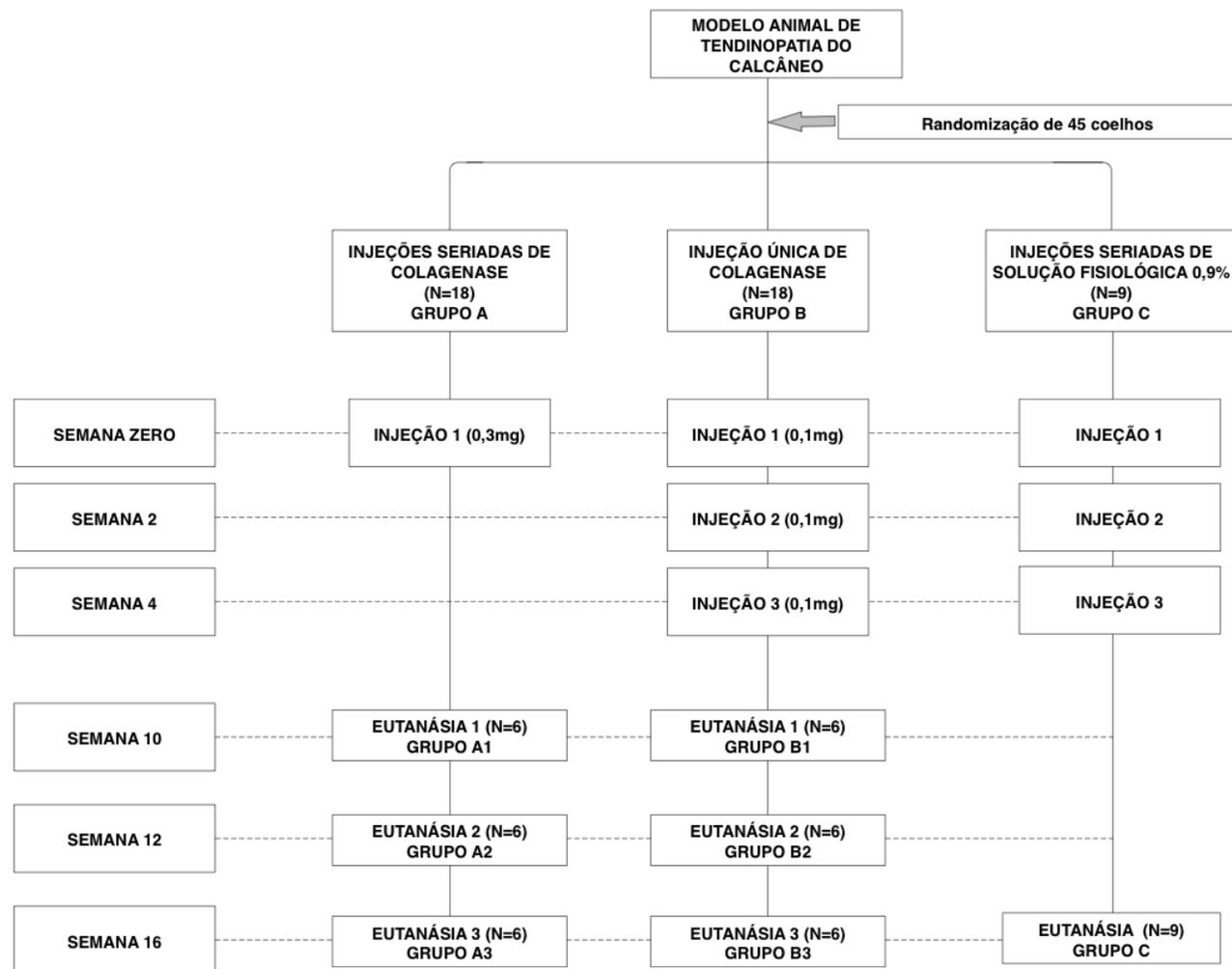


Figura 2. Fluxograma do Modelo Experimental: distribuição dos grupos, características e temporalidade das injeções e eutanásias

4.2.4 Protocolo de anestesia

Os coelhos foram anestesiados com administração intramuscular de solução contendo quetamina (40 mg.kg^{-1}) e midazolam (2 mg.kg^{-1}), o que permitiu a realização de tricotomia da região calcânea bilateralmente, assim como a venopunctura da veia safena com cateter calibre 22G para realização de fluidoterapia com $10\text{mL.kg}^{-1}.\text{h}$ de solução fisiológica a 0,9%. Em seguida, foi administrado propofol na dose de 5mg.kg^{-1} , por via intravenosa, permitindo a intubação orotraqueal e administração contínua de isoflurano, diluído em oxigênio a 100%, por meio de circuito anestésico Mapleson. Cinco minutos antes do início do procedimento cirúrgico os animais receberam 5 mg.kg^{-1} de cloridrato de tramadol por via intramuscular.

Animais receberam antibiótico para prevenção de infecção na ferida cirúrgica e nas vias urinárias. Foi administrado 4 mg.kg^{-1} de gentamicina por via subcutânea imediatamente antes do procedimento cirúrgico e uma vez ao dia durante os cinco dias subsequentes.

4.2.5 Procedimento cirúrgico

Após anestesia, o coelho foi submetido à tricotomia, antissepsia e assepsia da região caudal de ambos os membros pélvicos (**Figura 3**). Com animal posicionado em decúbito ventral, foi realizada uma incisão longitudinal

de 1 centímetro, paralela e lateral ao tendão do calcâneo, com limite distal a 1 centímetro de sua inserção. Após dissecação por planos, tendão do calcâneo e tendão plantar foram isolados (**Davidson et al., 1997; Marsolais et al., 2001**). Quando necessária, a hemostasia foi realizada com um coagulador bipolar. O tendão do plantar nos coelhos representa estrutura bem desenvolvida e de importante função na locomoção e se localiza em posição superficial e dorsal em relação ao tendão do calcâneo (**Nisbet, 1960**) (**Figuras 4 e 5**). Com tendão do plantar rebatido, foi realizada injeção intratendínea na região central do tendão do calcâneo, sob visualização direta, em região 1,5 centímetros proximal a sua inserção na tuberosidade do calcâneo (**Figura 6**), com agulha de calibre 27G acopladas em seringa de 100 microlitros (**Figura 7**). Após o procedimento, foi realizado fechamento da ferida operatória com fio mononylon 5.0 em plano único seguido de curativo estéril.

O procedimento cirúrgico descrito foi então realizado no membro pélvico contralateral.

Nos animais submetidos a três injeções seriadas, os procedimentos subsequentes foram realizados pela mesma via cirúrgica utilizada inicialmente.

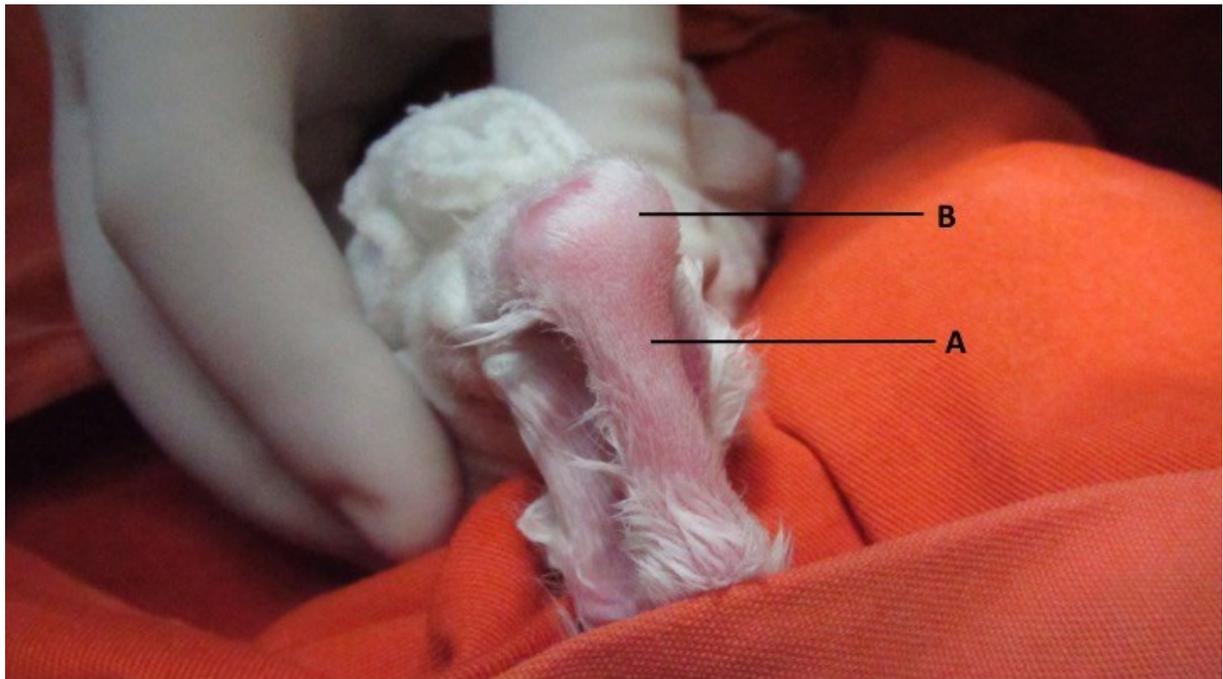


Figura 3. Anatomia topográfica da região distal do membro pélvico do coelho em decúbito ventral após tricotomia, assepsia e antissepsia. Contornos do tendão do calcâneo (A) se inserindo na tuberosidade do calcâneo (B)

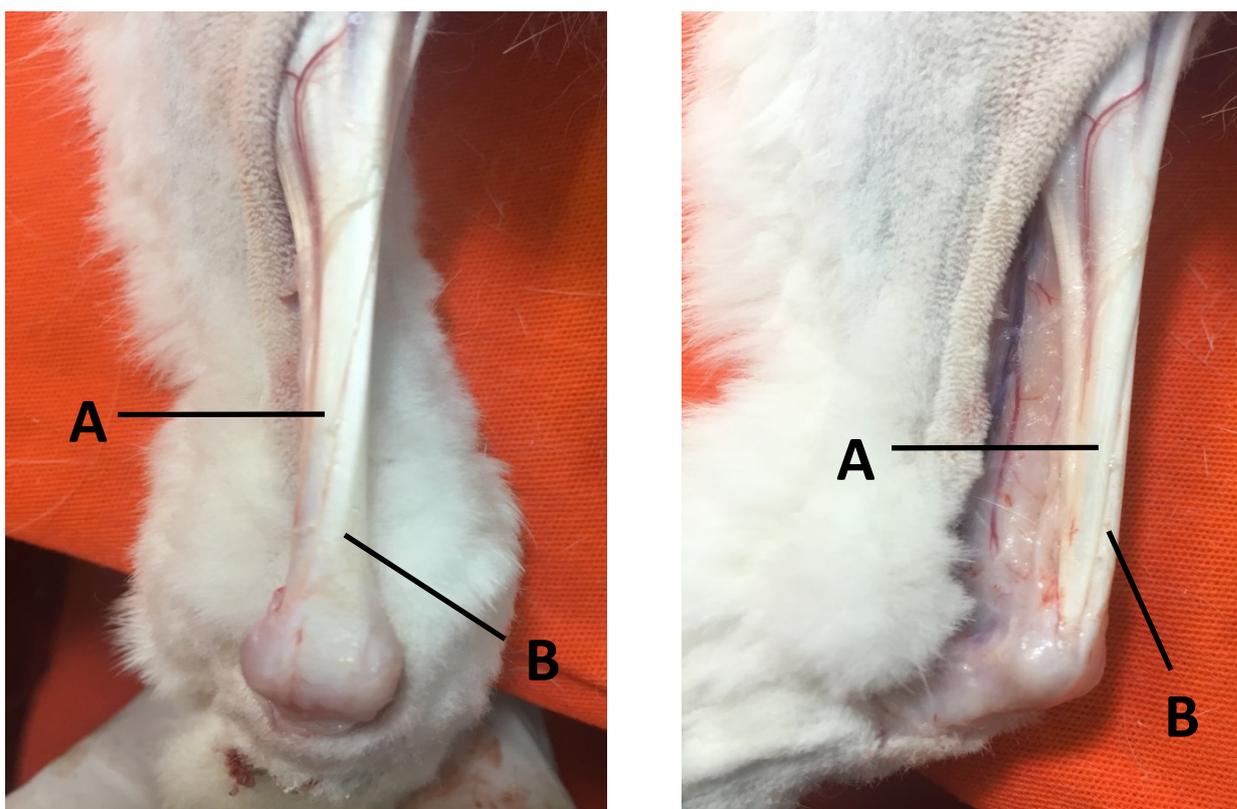


Figura 4. Dissecção anatômica do membro pélvico do coelho. Anatomia topográfica do tendão do calcâneo (A) e do tendão do músculo plantar (B). Visão posterior (esquerda) e lateral (direita)

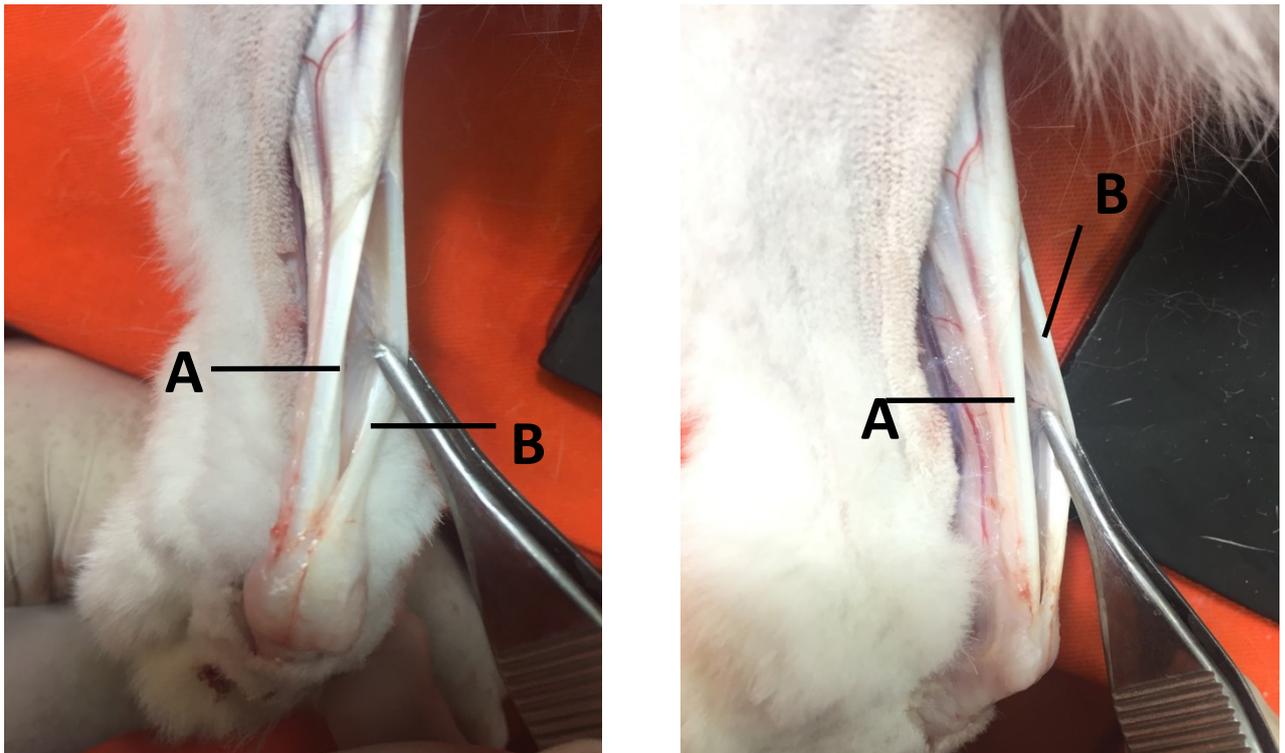


Figura 5. Dissecção anatômica do membro pélvico do coelho. Anatomia topográfica do tendão do calcâneo (A) e do tendão do músculo plantar (B), com tendão do plantar rebatido. Visão posterior (esquerda) e lateral (direita)

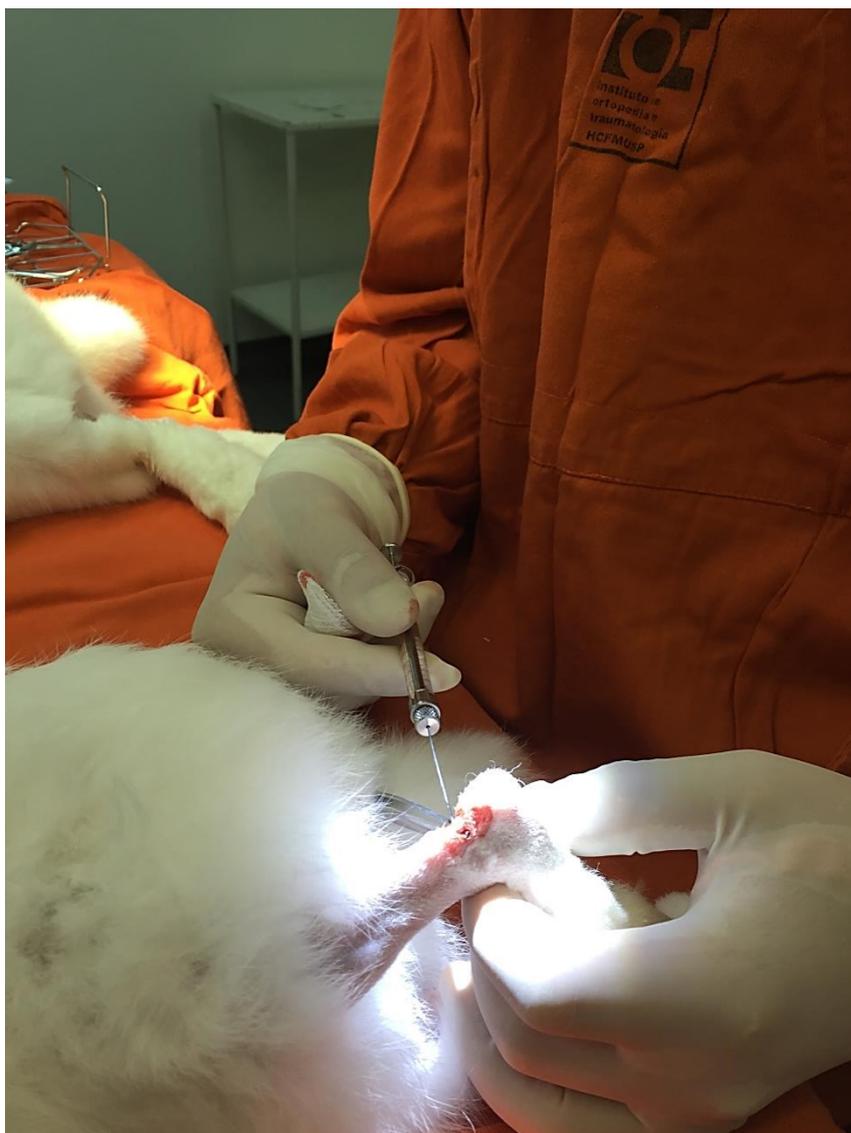


Figura 6. Procedimento de injeção intratendínea na região central do tendão do calcâneo, sob visualização direta



Figura 7. Seringa de 100 microlitros e agulha de calibre 27G utilizadas para a realização das injeções intratendíneas

4.2.6 Procedimento pós-cirúrgico

Os coelhos foram transferidos e mantidos por 30 minutos em câmaras com temperatura controlada entre 25°C a 28°C para controle da temperatura no pós-operatório imediato, até recuperação completa do procedimento anestésico.

Os animais receberam analgesia com cloridrato de tramadol por via subcutânea na dose de 3 mg.kg⁻¹ a cada oito horas nas primeiras 72 horas de pós-operatório.

4.2.7 Manutenção dos animais

Os animais retornaram às mesmas gaiolas de origem (50 x 50cm) e foram mantidos nas mesmas condições ambientais (manejo, *ad libitum*, e limpeza da gaiola) até o próximo procedimento cirúrgico, ou até serem submetidos à eutanásia.

Durante o período de observação foram realizadas avaliações veterinárias diárias com enfoque nas condições gerais dos animais e nas feridas operatórias. Coelhos foram também avaliados quanto a mutilações, infecções urinárias ou outras alterações (critérios de exclusão e complicações). O peso corpóreo de cada animal foi aferido semanalmente.

4.3 Eutanásia

Ao final do período de experimentação, todos os coelhos foram submetidos à eutanásia conforme legislação em vigor e seguindo os preceitos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA (1999). As eutanásias foram realizadas em três diferentes tempos de seguimento para os grupos submetidos à injeção de colagenase: dez, doze e dezesseis semanas. As eutanásias dos animais do grupo controle foram todas realizadas com 16 semanas de seguimento.

Os animais foram submetidos à administração intramuscular da associação de quetamina (40 mg.kg^{-1}) e midazolam (2 mg.kg^{-1}), seguido de venopunctura da veia safena com cateter calibre 22G e administração intravenosa de propofol (5 mg.kg^{-1}). Após confirmação do plano anestésico, os animais foram submetidos à administração intravenosa de dose adicional de propofol (10 mg.kg^{-1}), seguida de 10 mililitros de cloreto de potássio 19,1%.

Após aquisição das amostras teciduais desejadas, os animais foram embalados em sacos plásticos brancos devidamente identificados e o descarte foi realizado pelo centro de material biológico da Universidade de São Paulo.

4.4 Preparo das amostras teciduais

Por definição, os membros pélvicos esquerdos foram utilizados para o estudo anatomopatológico e os membros pélvicos direitos foram utilizados para o estudo biomecânico.

Imediatamente após a eutanásia do coelho, o membro pélvico direito do animal foi dissecado isolando-se o conjunto: músculo gastrocnêmio, músculo sóleo, tendão do calcâneo e osso calcâneo. As fibras musculares proximais dos músculos gastrocnêmio e sóleo foram ressecadas, preservando-se a região músculo-tendínea (**Figura 8**). O músculo plantar e seu tendão também foram ressecados. A continuidade e integridade entre o tendão do calcâneo e sua inserção na tuberosidade do calcâneo foram analisadas. O comprimento do tendão, somado à região músculo-tendínea, foi padronizado em 55 mm de

comprimento. Esse conjunto foi definido como corpo de prova nos ensaios biomecânicos. Uma vez concluída a dissecação, os espécimes foram embalados em compressas de gaze umedecidas com solução de fisiológica a 0,9% e armazenados em temperatura de -18° C, até que fossem submetidos aos testes biomecânicos.

Também imediatamente após a eutanásia do animal, o membro pélvico esquerdo foi dissecado isolando-se toda a extensão do tendão do calcâneo, desde sua junção músculo-tendínea até sua inserção no osso calcâneo (**Figura 9**). O espécime dissecado foi inicialmente aplicado em um papel cartão com a identificação topográfica. O local onde havia achados macroscópicos mais importantes de tendinopatia do tendão do calcâneo foi identificado como área “T”; a proximal à lesão como área “P” e, caudal à lesão, como área “C”. O espécime foi então fixado com formaldeído a 10%, processado e desidratado em bateria de álcoois e, a seguir, sofreu processo de diafanização em xilol, para posteriormente ser incluído em parafina. Uma vez contido no bloco de parafina, foram realizados cortes histológicos longitudinais de cinco micras com navalhas descartáveis em um micrótomo (Leica HM 355S). Cortes foram fixados em lâminas de vidro para posterior coloração e exame anatomopatológico.



Figura 8. Dissecção do corpo de prova para o estudo biomecânico: músculo gastrocnêmio, músculo sóleo, tendão do calcâneo e osso calcâneo. As fibras musculares proximais dos músculos gastrocnêmio e sóleo foram ressecadas, preservando-se a região músculo-tendínea

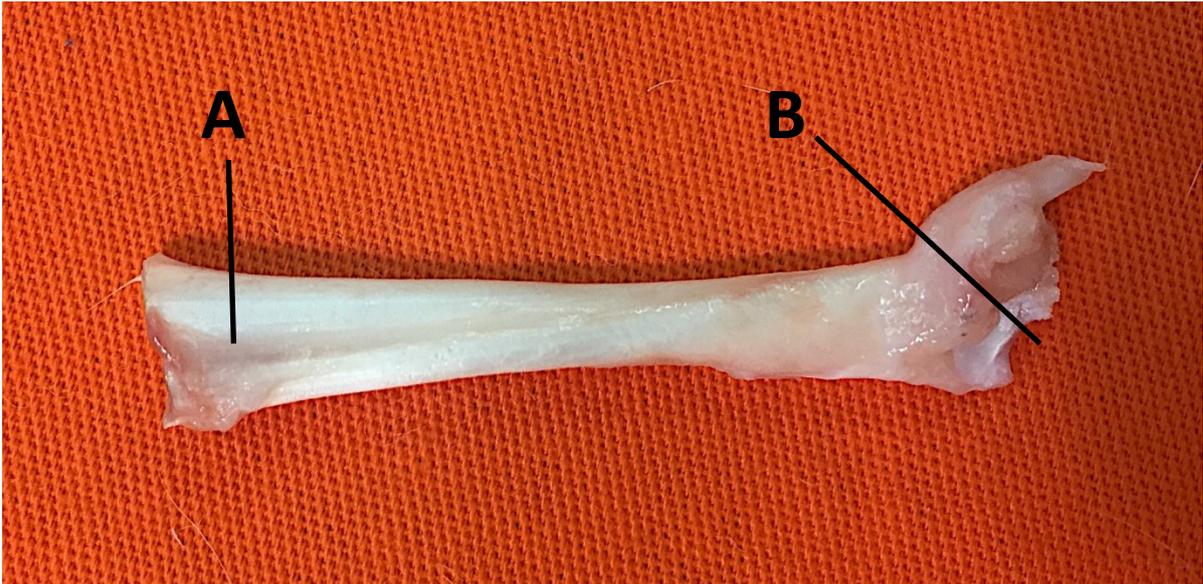


Figura 9. Dissecção do espécime para estudo anatomopatológico, isolando-se toda a extensão do tendão do calcâneo, desde sua junção musculo-tendínea (A) até sua inserção no osso calcâneo (B)

4.5 Exame anatomopatológico

Lâminas contendo cortes dos espécimes foram coradas pelas técnicas de hematoxilina-eosina (H&E), azul de Alcian, safranina e picrossírius.

A avaliação histológica foi feita de forma cega pelo patologista em microscópio óptico (Zeiss Axioskop 2 Plus). Alterações teciduais do tendão do calcâneo foram avaliadas por critérios histológicos de tendinopatia de acordo com o escore de Bonar (**Khan et al., 1996; Khan et al., 1999; Cook et al., 2004**), seguindo as recomendações de Fearon (**Fearon et al., 2014**).

Após a análise inicial de toda a extensão da lâmina com aumento de 100x, a região com maior alteração da morfologia celular foi identificada e

então avaliada de acordo com as seguintes características: arranjo das fibras colágenas (1 campo microscópico, luz polarizada, aumento 100x, coloração picrossírius), morfologia celular (4 campos microscópicos, aumento de 200x, colorações H&E e safranina), celularidade (1 campo microscópico, aumento 100x, coloração H&E), vascularização (8 campos microscópicos, aumento 400x, coloração de H&E) e acúmulo de substância fundamental, ou substância amorfa, (1 campo microscópico, aumento 100x, coloração azul de Alcian). Tais características foram graduadas de 0 (tecido tendíneo normal) a 3 (alterações teciduais tendíneas avançadas), conforme demonstrado na **Tabela 2**. A alteração tecidual do tendão do calcâneo de cada coelho foi então graduada pela somatória dos escores de cada uma das cinco categorias avaliadas, com variação entre um escore mínimo de 0 (zero) para um tendão normal, e de 15 (quinze) para um tendão com alterações patológicas máximas.

Tabela 2 – Escore de tendinopatia de Bonar: características avaliadas e graduação das alterações teciduais tendíneas

	Grau 0	Grau 1	Grau 2	Grau 3
Morfologia Celular	Núcleo celular discreto, alongado e fusiforme; citoplasma pouco evidente na microscopia ótica	Arredondamento aumentado: núcleo celular com formato mais ovoide/circular, citoplasma pouco evidente	Maior arredondamento e maior tamanho: núcleo redondo, ligeiramente aumentado; pequena quantidade de citoplasma é visível	Núcleo grande e circular; citoplasma abundante; formação de lacunas (metaplasia condroide)
Arranjo das Fibras Colágenas	Colágeno disposto em feixes bem delimitados e demarcados, com padrão de ondulação mantido; polarização densa, brilhante e homogênea na microscopia de luz polarizada	Separação e individualização de feixes de fibra colágena, mas com manutenção da arquitetura geral; diminuição da polarização dos feixes de fibras colágenas	Alterações dos feixes de fibras colágenas: separação e perda da demarcação, o que resulta em expansão tecidual generalizada e perda do padrão de polarização normal dos feixes de fibras colágenas	Separação importante dos feixes de fibras colágenas, com perda completa de sua arquitetura geral
Celularidade	Células com morfologia distinta e distribuição descontínua	Hipercelular (superior a 30 núcleos por campo microscópico): em fileiras e/ou aumento no número de células	Áreas de hipocelularidade (inferior a 20 núcleos por campo microscópico) assim como de hipercelularidade (superior a 30 núcleos por campo microscópico)	Área avaliada é praticamente acelular

continua

				continuação
	Grau 0	Grau 1	Grau 2	Grau 3
Vascularização	Vascularização discreta, com trajetória entre os feixes colágenos	Aglomerados ocasionais de vasos sanguíneos; menos de 2 aglomerados para cada 10 campos de grande aumento (aumento de 400x)	2 a 3 aglomerados capilares para cada 10 campos de grande aumento	Áreas com mais de 3 aglomerados capilares para cada 10 campos de grande aumento e/ou áreas de patológicas não vascularizadas
Substância Fundamental	Ausência de substância fundamental da matriz extracelular corável pela coloração de azul alciano	Mucina corável entre feixes de fibras colágenas; feixes ainda identificáveis	Mucina corável entre feixes de fibras colágenas; perda da demarcação dos feixes	Mucina abundante em toda a extensão do corte histológico com discreta coloração do colágeno
				conclusão

4.6 Estudo biomecânico

Após o descongelamento dos corpos de prova em solução fisiológica a 0,9% de NaCl, foi medida a área do tendão do calcâneo em três regiões distintas: próximo à inserção óssea, em sua região central e próximo à junção músculo-tendínea, mais precisamente 35 mm proximal a sua inserção na tuberosidade do calcâneo. As medidas de área foram feitas utilizando-se um dispositivo de aferição (**Figura 10**) composto por um medidor de altura ou

relógio comparador (Mitutoyo com resolução de 0,01 mm), por uma base constituída de uma canaleta com largura de 4,6 mm e por uma peça prismática em acrílico que se deslizava pela canaleta e era conectada à extremidade do relógio comparador.

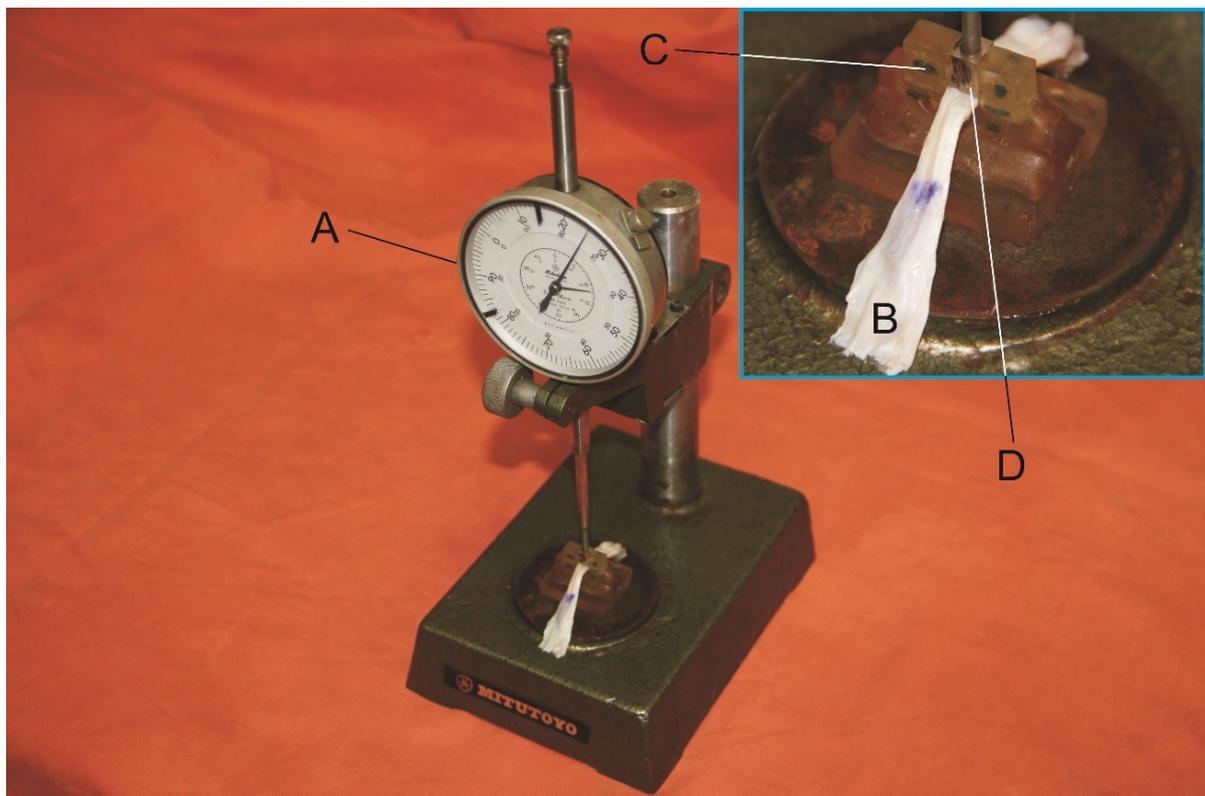


Figura 10. Dispositivo de medição de área de tendão, evidenciando o relógio comparador (A), o tendão (B), a canaleta (C) e a peça prismática (D)

Antes da realização de cada medida, o medidor de altura era zerado com a peça prismática em contato com a base da canaleta. Após esse procedimento inicial, o tendão foi inserido entre a base da canaleta e a peça prismática de maneira que a pressão exercida pelo relógio comparador conformasse o tendão em uma secção retangular. A leitura da medida foi efetuada após 90 segundos. A área em mm^2 foi determinada pelo produto da

altura, medida pelo relógio comparador, pela largura da canaleta (4,6 mm). A área de secção transversa foi calculada como a média das medidas efetuadas nas três diferentes regiões do tendão.

Cada corpo de prova foi submetido a ensaios cíclicos seguidos de ensaio destrutivo através de uma máquina de ensaios mecânicos Instron® modelo 3369 (**Figura 11**), dotada de célula de carga de 5 kN com exatidão de 0,5% e controlada pelo programa Bluehill®. Os ensaios foram executados no Laboratório de Impacto em Estruturas do Departamento de Engenharia Mecatrônica e de Sistemas Mecânicos da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo.

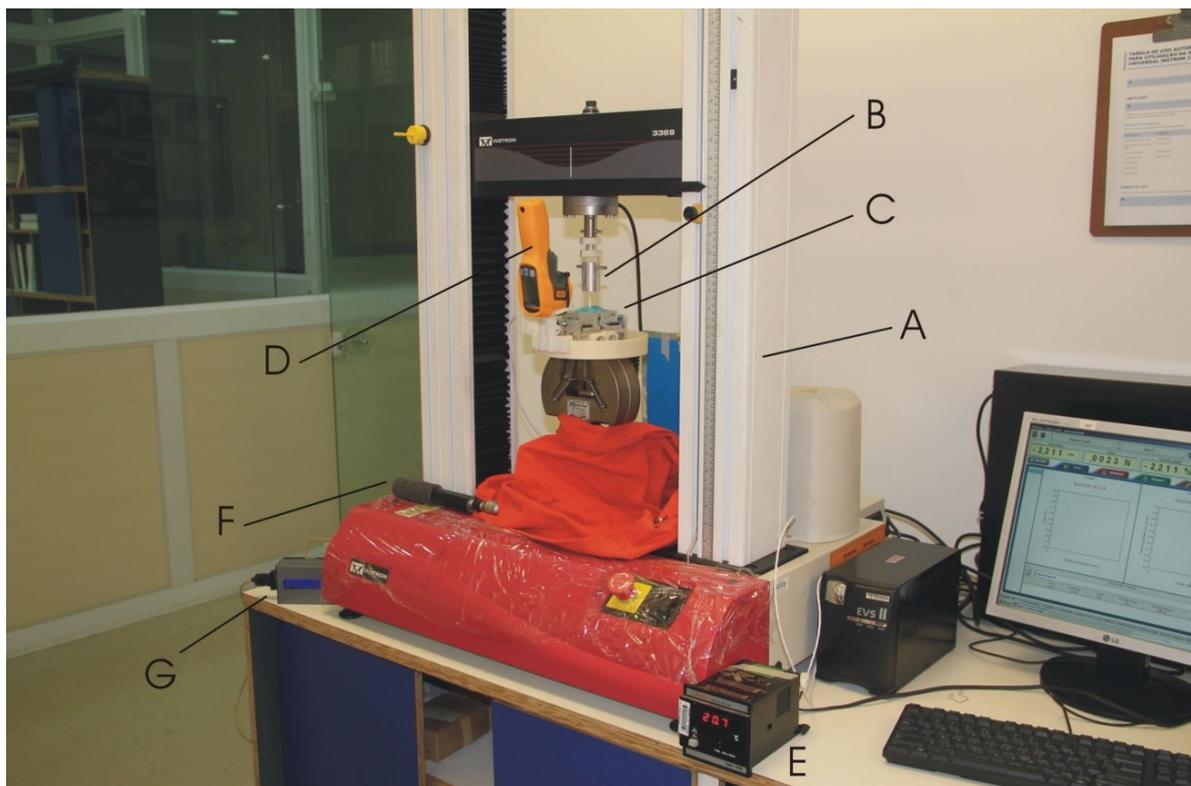


Figura 11. Máquina de ensaios mecânicos Instron modelo 3369 (A) com as garras cilíndrica (B) e criogênica (C), termômetro infravermelho (D), leitor do sensor de temperatura PT-100 (E), torquímetro (F) e leitor do torquímetro (G)

A fixação do corpo de prova junto à máquina de ensaios foi feita por duas garras desenvolvidas no Laboratório de Biomecânica LIM-41. A porção óssea do corpo de prova foi presa por uma garra cilíndrica acoplada à célula de carga da máquina e a outra extremidade do corpo de prova (junção músculo-tendínea) foi fixada por uma garra criogênica presa à base da máquina (**Figura 12**).

A garra cilíndrica consistia em um cilindro de alumínio de 45 mm de comprimento com um furo de 16 mm e 40 mm profundidade feito em uma extremidade e na outra, um furo de 4 mm de diâmetro com uma profundidade de 2 mm, uma superfície cônica à 45° foi feita entre os dois furos. Um corte longitudinal de 4 mm foi feito em uma das paredes do cilindro com o propósito de facilitar a introdução do tendão de maneira que os ossos do tarso travassem na região cônica do furo interno e o corpo do tendão ficasse frouxo em relação ao menor furo (**Figura 12**).

Foi padronizado um comprimento de 35 mm de tendão entre as garras e o excedente (aproximadamente 20 mm) foi inserido na garra criogênica.

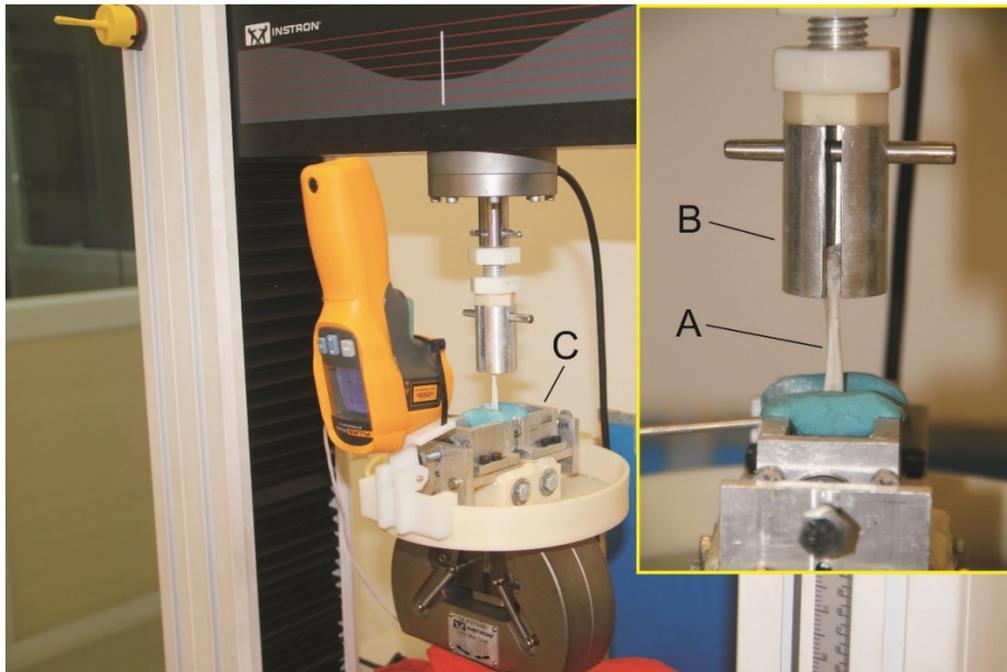


Figura 12. Corpo de prova (A) fixado à máquina de ensaios por meio da garra cilíndrica (B) e garra criogênica (C)

A garra criogênica era constituída por dois reservatórios em que as superfícies de contato com o tendão tinham um perfil senoidal, dois parafusos eram utilizados para aproximar os reservatórios entre si, foi utilizado um torquímetro desenvolvido no laboratório de biomecânica para promover um aperto de 1,5 N.m nos parafusos (**Figura 12**).

O corpo do torquímetro (**Figura 11**) era composto por um tubo de alumínio instrumentalizado com quatro extensômetros elétricos (*strain gages*) que era conectado a uma placa condicionadora HX711. O leitor do torquímetro (**Figura 11**) foi instalado em uma caixa plástica e continha a placa condicionadora, uma placa de desenvolvimento Arduino® modelo Micro e o *display* LCD (*Liquid Crystal Display*) para visualização das medidas.

O torquímetro foi aferido por outro torquímetro, marca Lutron, modelo TQ-8800 e apresentou um erro médio de 0,2 N.m.

Momentos antes do início do ensaio destrutivo, cada reservatório era preenchido com álcool etílico a 96° GL e por dois cubos de gelo seco. Essa mistura permitia atingir temperaturas de até -78°C dentro do reservatório, por indução térmica, as paredes de alumínio do reservatório promoviam a troca de calor entre a superfície senoidal e o tendão.

Para garantir que somente a região proximal do corpo de prova, muscular e músculo-tendínea, em contato com a garra criogênica congelasse, foram utilizados dois medidores de temperatura para certificar o instante ideal para o início do ensaio mecânico. Um sensor termo resistivo PT-100 ligado a um leitor marca RobertShaw (**Figura 11**) foi inserido entre as garras senoidais (**Figura 13**), e um termômetro infravermelho Fluke modelo 62 MAX foi utilizado para medir a temperatura do corpo do tendão próximo à garra criogênica (**Figura 13**).

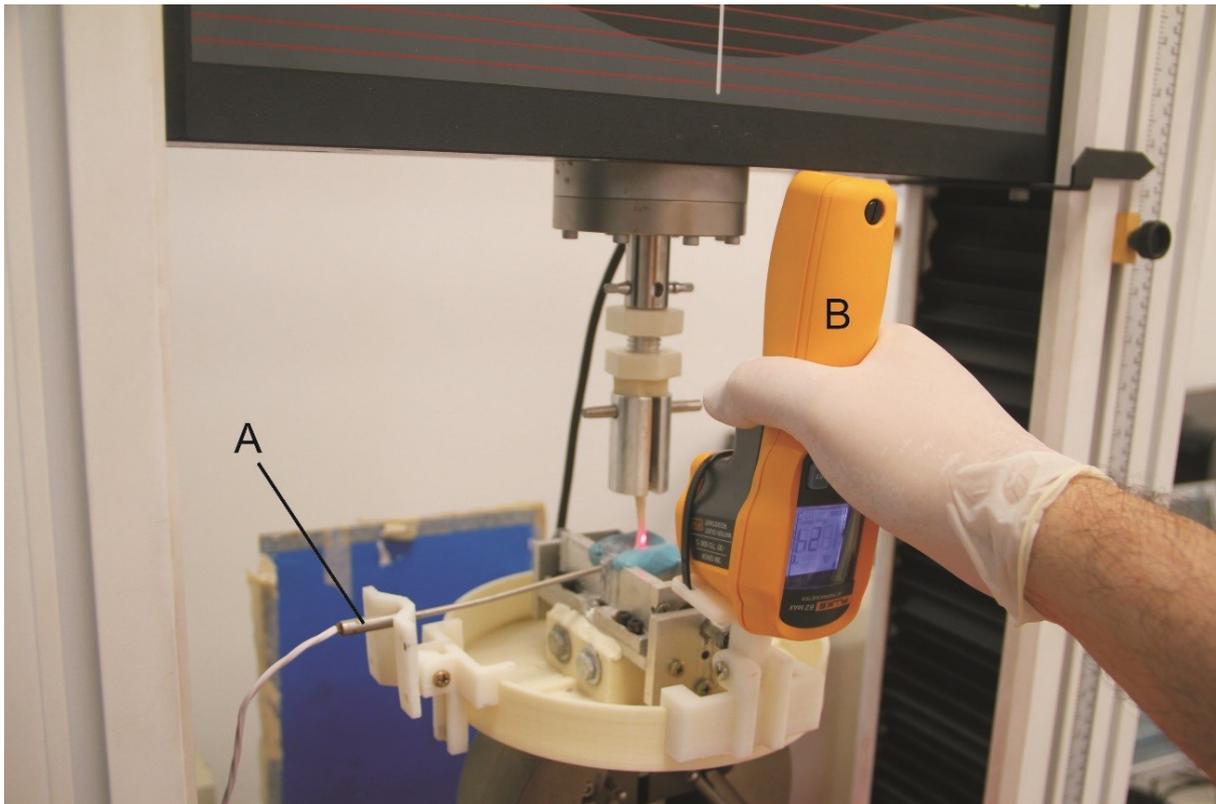


Figura 13. Medição de temperatura da garra criogênica pelo sensor termo resistivo PT-100 (A) e medição de temperatura do tendão pelo termômetro infravermelho (B)

Com o corpo de prova devidamente posicionado e fixado às garras, foi executado um ensaio cíclico inicial para condicionamento do corpo de prova. Inicialmente foi aplicada uma pré-carga 5 N por 30 segundos, nesse interim, foi medido com um paquímetro Mitutoyo (resolução de 0,05 mm) a distância entre a garra cilíndrica e a garra criogênica, essa medida foi chamada de comprimento útil do corpo de prova. Após os 30 segundos de pré-carga, foram aplicadas cargas de variavam de 5N a 50N a uma frequência de um ciclo por segundo, totalizando 50 repetições. Devido às baixas cargas envolvidas no ensaio cíclico, não foi colocado gelo seco no reservatório da garra criogênica.

Imediatamente após o término do ensaio cíclico, o gelo seco foi adicionado aos reservatórios da garra criogênica e as temperaturas foram

monitoradas, o ensaio destrutivo era iniciado quando a temperatura atingia -5°C no PT-100 e 10°C no termômetro infravermelho (**Chen et al., 2011; Machova et al., 2014**). O ensaio destrutivo foi executado a uma velocidade de 1 mm.s⁻¹ e foi finalizado quando ocorria a ruptura do material. O programa BlueHill registrava os valores de força e deformação aplicados ao material ensaiado a uma taxa de 100 amostras por segundo.

Os parâmetros calculados a partir dos ensaios destrutivos estão descritos a seguir:

A rigidez (**Gráfico 1**) foi calculada como a razão das diferenças de força e deformação entre dois pontos na região linear da curva força *versus* deformação e foi expressa em N.mm⁻¹. O módulo de elasticidade (**Gráfico 2**) foi calculado como a razão das diferenças de tensão e deformação relativa entre dois pontos na região linear da curva tensão *versus* deformação relativa e foi expresso em N.mm⁻² ou MPa.

A curva tensão *versus* deformação relativa foi obtida a partir da curva força *versus* deformação em que a tensão foi calculada como o valor de força (em Newtons) dividido pela área média do corpo de prova (em mm²) e a deformação relativa foi calculada como a divisão do valor de deformação absoluta, em milímetros, pelo comprimento útil do corpo de prova, em milímetros.

Foram então determinados o limite de escoamento, ou limite da elasticidade (LE), assim como o limite de resistência máxima. O LE foi baseado no método gráfico de Johnson (**Souza; 1982**) e correspondia ao ponto em que uma reta paralela ao segmento de reta OC tangenciava (ponto LE) a curva força *versus* deformação (**Gráfico 1**) ou a curva tensão *versus* deformação

relativa (**Gráfico 2**). Para esse limite, foram determinados os parâmetros força no limite da elasticidade (F_{LE}) em N, deformação no limite da elasticidade (D_{LE}) em mm, tensão no limite da elasticidade (T_{LE}) em MPa, e energia no limite da elasticidade (ϵ_{LE}) em $\text{mm}\cdot\text{mm}^{-1}$.

O limite de resistência máxima (LRM) correspondia ao pico da curva força *versus* deformação (**Gráfico 1**) ou da curva tensão *versus* deformação relativa (**Gráfico 2**). Para esse limite, foram determinados os parâmetros em N, deformação no limite de resistência máxima (D_{LRM}) em mm, tensão no limite da resistência máxima (T_{LRM}) em MPa, e energia no limite da resistência máxima (ϵ_{LRM}) em $\text{mm}\cdot\text{mm}^{-1}$.

Gráfico 1 – Representação do limite de elasticidade (LE) e de resistência máxima (LRM) em uma curva força *versus* deformação

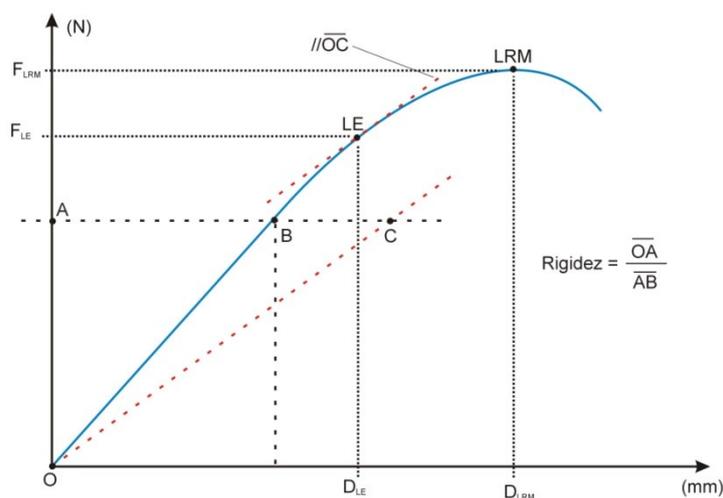
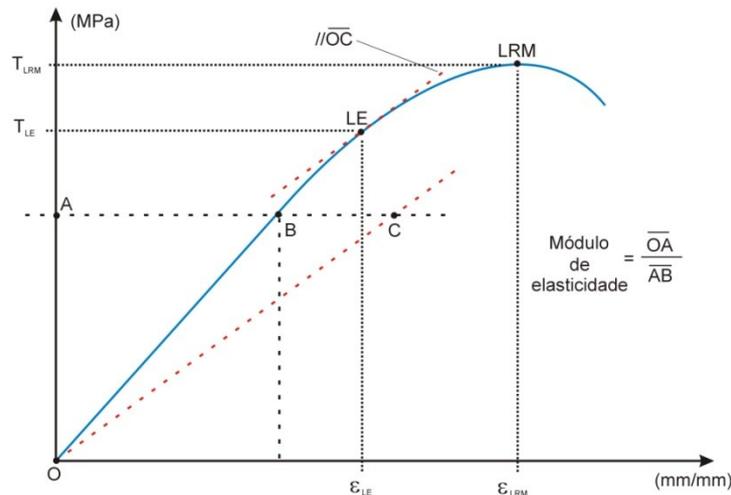


Gráfico 2 – Representação do limite de elasticidade (LE) e de resistência máxima (LRM) em uma curva tensão *versus* deformação relativa



Foram determinadas as áreas abaixo da curva força *versus* deformação (**Gráfico 3**), que correspondiam à energia absorvida até o limite de elasticidade (E_{LE}) e até o limite de resistência máxima (E_{LRM}), ambos medidos em mJ. Também foram calculadas as áreas sob a curva tensão *versus* deformação relativa (**Gráfico 4**) que correspondiam a densidade de energia de deformação no limite de elasticidade (DED_{LE}) e no limite de resistência máxima (DED_{LRM}), ambos medidos em $MJ.m^{-3}$.

Gráfico 3 – Representação das energias no limite de elasticidade (LE) e de resistência máxima (LRM) em uma curva força *versus* deformação

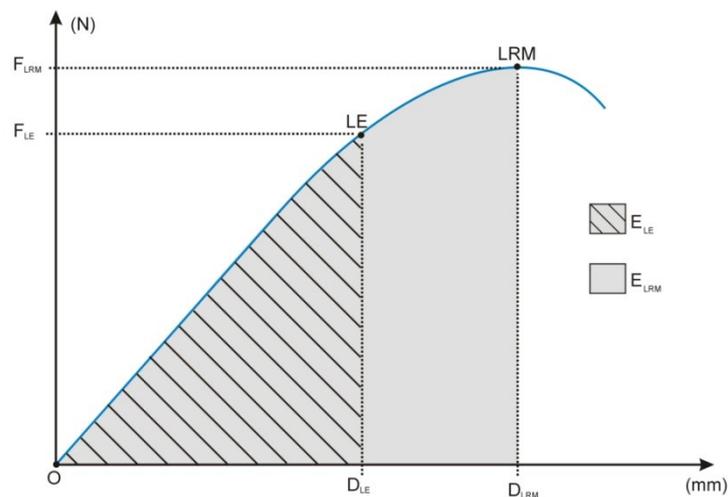
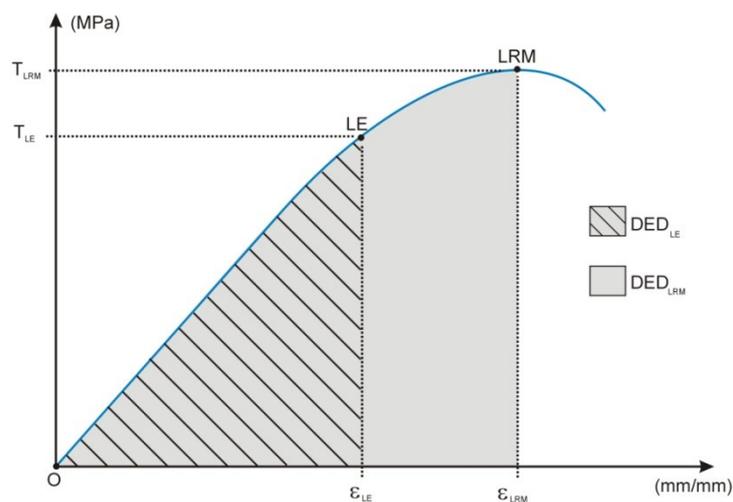


Gráfico 4 – Representação das densidades de energia de deformação no limite de elasticidade (DED_{LE}) e de resistência máxima (DED_{LRM}) em uma curva tensão *versus* deformação relativa



4.7 Cálculo da amostra

Na ausência de dados adequados para realização de uma análise formal de poder estatístico, o tamanho da amostra e o número de animais utilizados para a formação dos grupos, foi calculado de acordo com a equação de recursos de *Mead* ($E = N - T$): em que E representa graus de liberdade de erro, sendo suficiente e apropriado quando possui valor maior que 10 e menor que 20; N representa graus de liberdade total e é calculado pelo número de animais na amostra (n) subtraídos de uma unidade ($N = n - 1$); e T representa graus de liberdade do tratamento e é calculado pelo número de tratamentos ou intervenções realizadas (t) subtraídos de uma unidade ($T = t - 1$). Assim para cada momento de eutanásia (10, 12 e 16 semanas), o tamanho da amostra foi calculado da seguinte maneira: considerando-se três diferentes tipos de tratamento (injeção única, injeções seriadas e controle) o valor calculado de T seria 1 para as duas primeiras eutanásias (10 e 12 semanas) e 2 para a última eutanásia (16 semanas). Considerando-se $E=10$, limite mínimo preconizado, o número total de animais necessários seria 12 ($n=12$) para as duas eutanásias iniciais, e 13 ($n=13$) para a eutanásia final.

4.8 Desfechos avaliados

Os desfechos analisados foram o escore histológico de Bonar e os seguintes parâmetros biomecânicos:

- Área de secção transversa do tendão (mm^2)
- Rigidez ($\text{N}\cdot\text{mm}^{-1}$)
- Módulo de elasticidade (MPa)
- Força no limite de elasticidade (N)
- Deformação no limite de elasticidade (mm)
- Porcentagem de deformação no limite da elasticidade
- Tensão no limite de elasticidade (MPa)
- Energia no limite de elasticidade (mJ)
- Força no limite de resistência máxima (N)
- Deformação no limite de resistência máxima (mm)
- Porcentagem de deformação no limite de resistência máxima
- Tensão no limite de resistência máxima (MPa)
- Energia no limite de resistência máxima (mJ)
- Densidade de energia de deformação no limite da elasticidade ($\text{MJ}\cdot\text{m}^{-3}$)
- Densidade de energia de deformação no limite da resistência máxima ($\text{MJ}\cdot\text{m}^{-3}$)

Os desfechos foram considerados primários para a 16^a semana de seguimento e secundários para a 10^a e 12^a semanas.

4.9 Análise estatística

A formatação do banco de dados foi realizada através do programa de estatística *Statistical Package for Social Sciences (SPSS)*, versão 23.

A estatística descritiva foi apresentada de acordo com a média e desvios padrões.

Os dados avaliados eram representados exclusivamente por variáveis contínuas e assim foram inicialmente submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e ao teste de homogeneidade de *Levene*.

A comparação entre grupos foi testada em cada tempo de seguimento como variável independente.

Para a comparação entre os grupos (A, B e C) na 16ª semana de seguimento, e também para comparações dentro no mesmo grupo (A ou B) nos diferentes tempos de seguimento (10, 12 e 16 semanas), quando na presença de comportamento normal de distribuição de frequência dos dados, foi utilizado teste paramétrico de análise de variância (ANOVA) de uma via. Para distribuições assimétricas foi realizado o teste de Kruskal-Wallis.

Na comparação entre os grupos A e B nos seguimentos de 10 e 12 semanas, devido à ausência do grupo controle, foi utilizado teste de comparação de duas amostras independentes, teste t ou Mann-Whitney.

Partiu-se da hipótese nula, considerando-se a probabilidade do erro do tipo I de 5%.

5. *Resultados*

5 RESULTADOS

Foram operados no total 45 coelhos, incluindo 18 no grupo submetido à injeção única de 0,3 miligramas de colagenase, 18 no grupo submetido a três injeções seriadas de 0,1 miligramas de colagenase e nove animais do grupo controle, submetidos a três injeções seriadas de solução fisiológica de 0,9% de NaCl.

Houve perda de sete animais (15,5%), incluindo dois no grupo A (11,1%), quatro no grupo B (22,2%) e um no grupo C (11,1%). O detalhamento das perdas foi descrito na **Tabela 3**. Nenhum animal demonstrou perda de peso superior a 20% do peso corpóreo durante o período de estudo.

Tabela 3 – Detalhamento da perda de animais por grupo e subgrupo

	Grupo	Subgrupo	Numeração do Coelho	Motivo da Perda
Perda 1	A	A1	3	Óbito por complicações do procedimento anestésico durante a realização do segundo procedimento cirúrgico
Perda 2	A	A3	13	Sacrificado devido à fratura da pata traseira esquerda dentro da gaiola, no período entre segundo e terceiro procedimento cirúrgico
Perda 3	B	B1	23	Sacrificado devido à infecção pós-operatória profunda da pata traseira direita, 45 dias após o procedimento cirúrgico
Perda 4	B	B2	27	Morte súbita, sem sinais prévios, 13 dias após o procedimento cirúrgico
Perda 5	B	B2	29	Morte secundária à infecção urinária 32 dias após o procedimento cirúrgico
Perda 6	B	B3	32	Sacrificado devido à infecção pós-operatória profunda da pata traseira direita, 61 dias após o procedimento cirúrgico
Perda 7	C		40	Óbito por complicações do procedimento anestésico durante a realização do terceiro procedimento cirúrgico

5.1 Análise histológica

Exemplos da análise histológica para graduação de cada um dos 5 quesitos avaliados no escore de Bonar foram apresentados **nas Figuras 14, 15, 16, 17 e 18.**

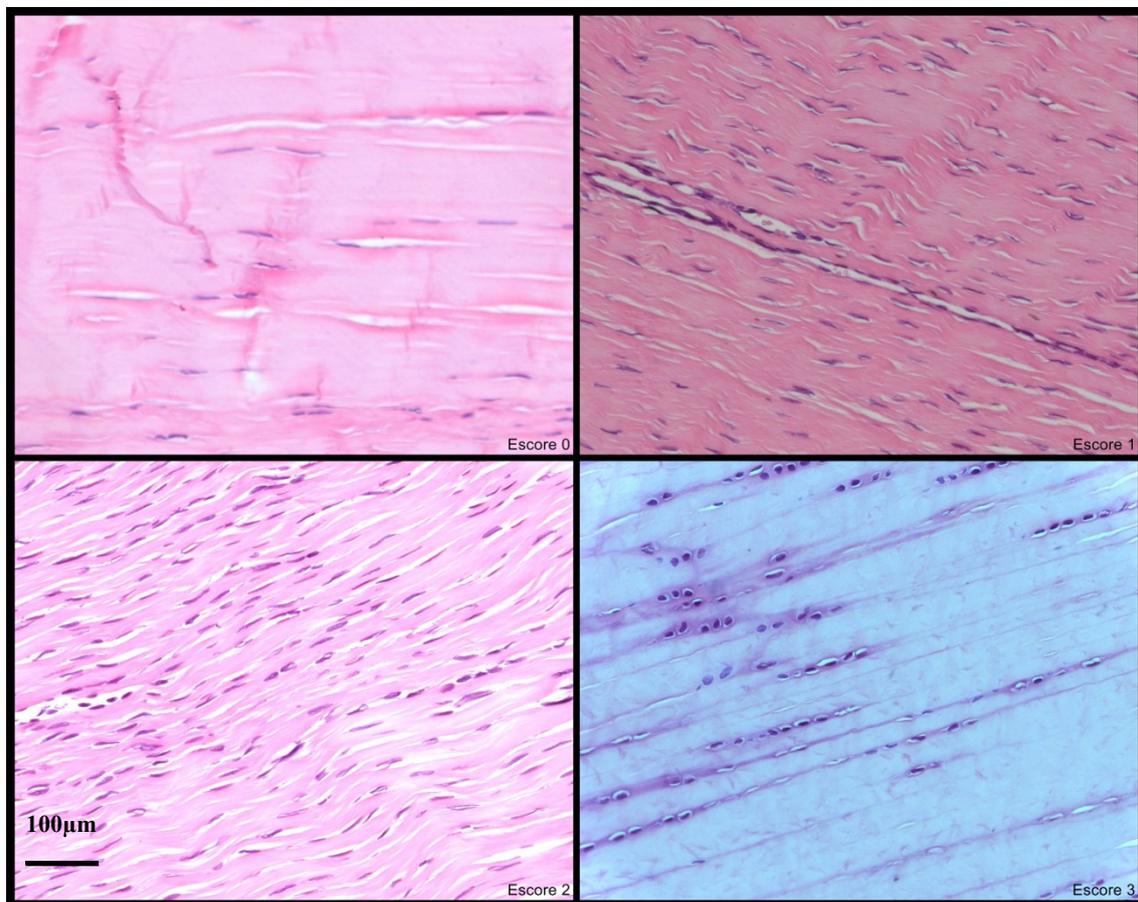


Figura 14. Fotografias de lâminas do tendão do calcâneo de coelho, Escore de Bonar, Morfologia de Tenócitos: tenócitos com formato preservado, alongados e fusiformes (Escore 0); tenócitos com núcleos mais ovoides e citoplasma pouco evidente (Escore 1); tenócitos com núcleos aumentados e arredondados (Escore 2); tenócitos com núcleos aumentados e circulares, citoplasma abundante, formação de halo e metaplasia condroide (Escore 3); (Aumento: 200 vezes; Coloração: Hematoxilina-Eosina)

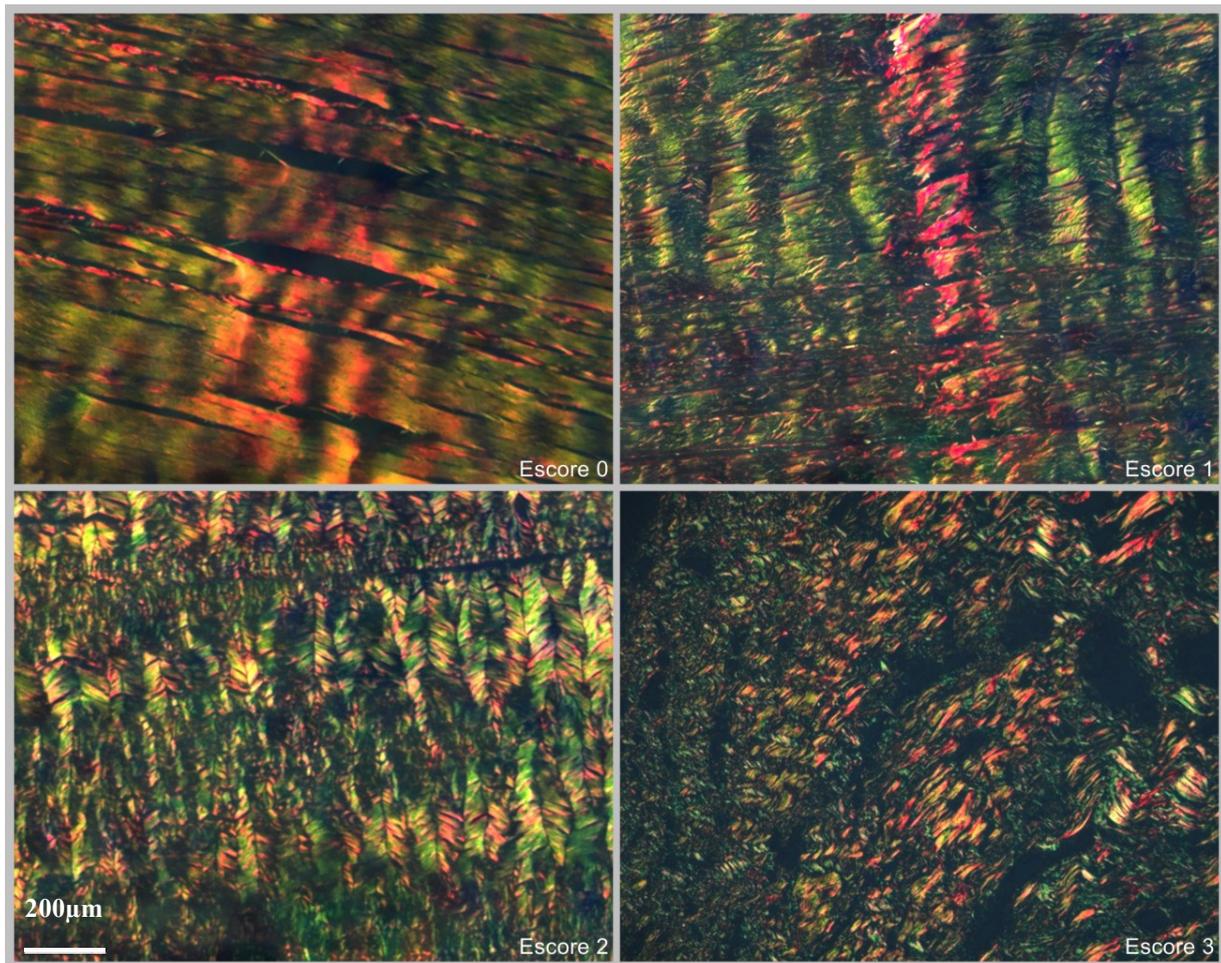


Figura 15. Fotografias de lâminas do tendão do calcâneo de coelho, Escore de Bonar, Arranjo das Fibras Colágenas: colágeno disposto em feixes bem delimitados e demarcados, com padrão de ondulação mantido, polarização densa, brilhante e homogênea (Escore 0); separação e individualização de feixes de fibra colágena, manutenção da arquitetura geral, diminuição da polarização (Escore 1); separação e perda da demarcação dos feixes de fibra colágena, perda do padrão de polarização (Escore 2); separação importante dos feixes de fibras colágenas, com perda completa da arquitetura geral (Escore 3); (Aumento: 100 vezes; Coloração: Picrossírius)

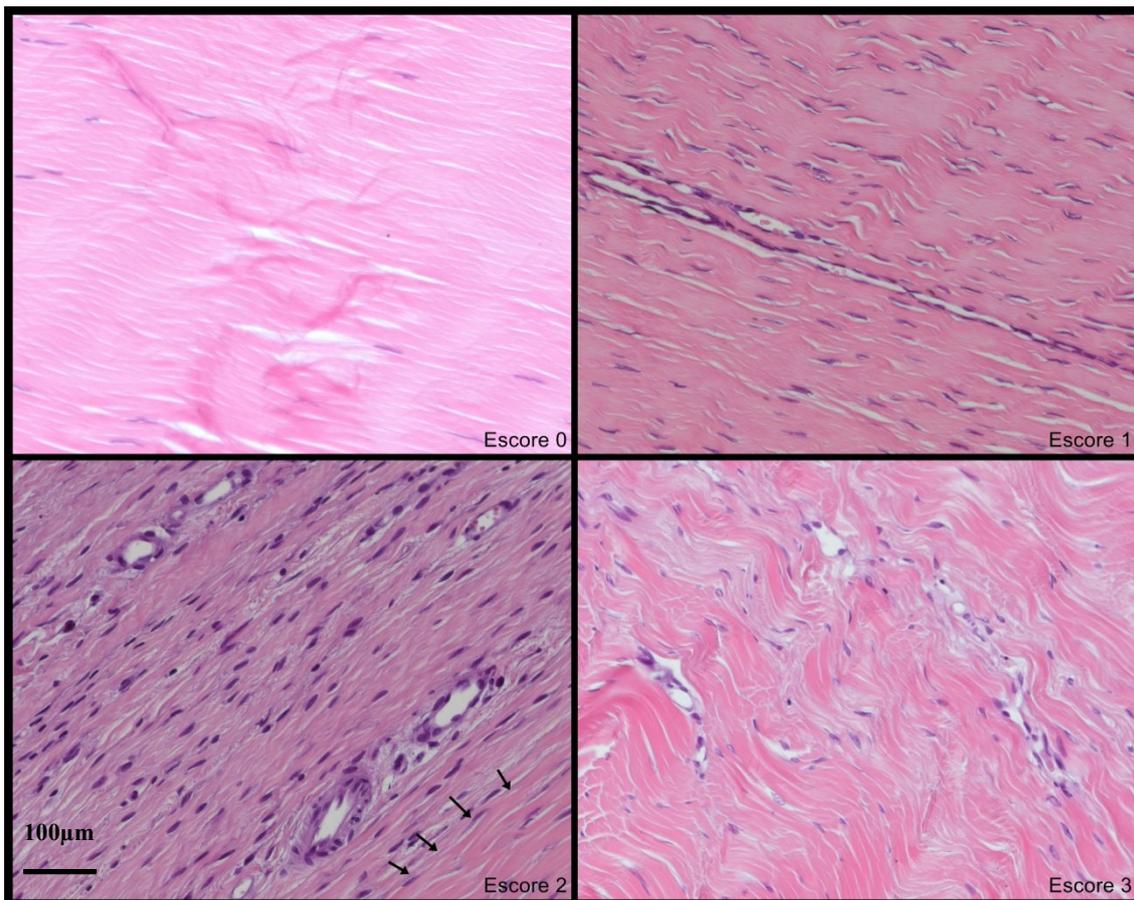


Figura 16. Fotografias de lâminas do tendão do calcâneo de coelho, Escore de Bonar, Celularidade: células com morfologia distinta e distribuição descontínua (Escore 0); áreas de hipercelularidade (Escore 1); áreas de hipercelularidade mescladas com áreas de hipocelularidade (setas) (Escore 2); áreas de acelularidade (Escore 3); (Aumento: 200 vezes; Coloração: Hematoxilina-Eosina)

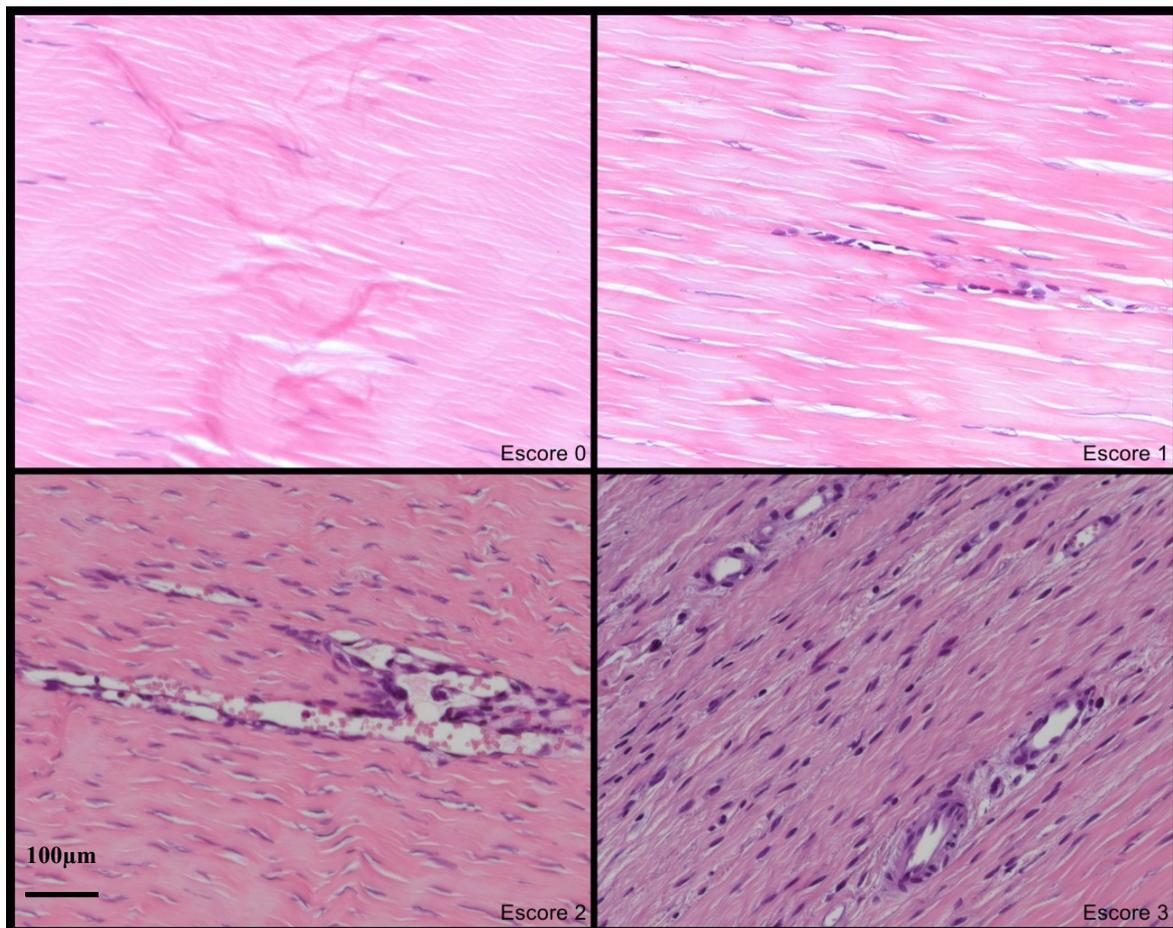


Figura 17. Fotografias de lâminas do tendão do calcâneo de coelho, Escore de Bonar, Vascularização: não observada (Escore 0); máximo de um aglomerado de vascularização por 10 campos de grande aumento (Escore 1); dois a três aglomerados de vascularização por 10 campos de grande aumento (Escore 2); mais de três aglomerados de vascularização por 10 campos de grande aumento (Escore 3); (Aumento: 200 vezes; Coloração: Hematoxilina-Eosina)

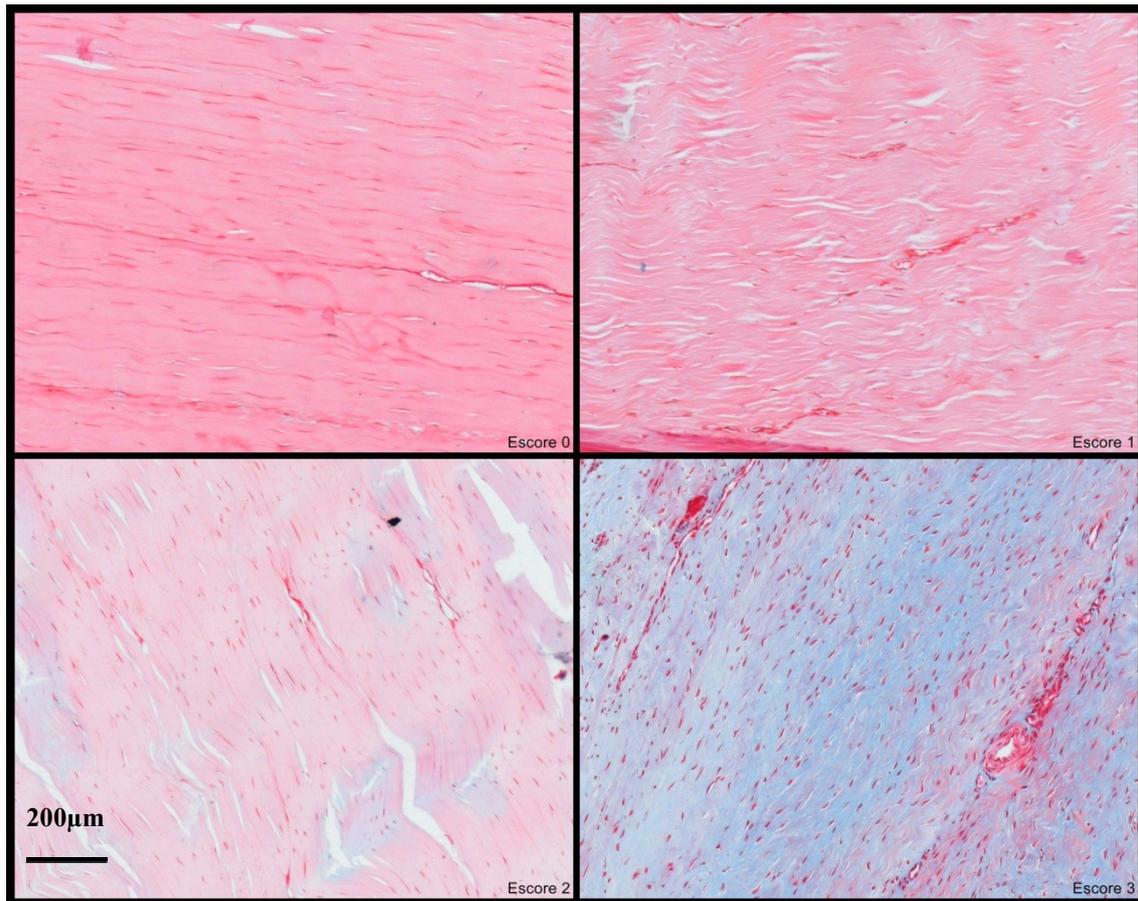


Figura 18. Fotografias de lâminas do tendão do calcâneo de coelho, Escore de Bonar, Substância Fundamental: ausência de mucina (Escore 0); mucina escassa, feixes de fibras colágenas identificáveis (Escore 1); mucina corável, áreas de perda de demarcação de fibras colágenas (Escore 2); mucina abundante com fibras colágenas, discreta coloração colágena (Escore 3); (Aumento: 100 vezes; Coloração: Azul de Alcian)

Na **Tabela 4** foram apresentadas as medidas descritivas da pontuação do escore histológico de Bonar para cada grupo e subgrupo de estudo assim como o valor do p para comparação dos subgrupos dentro de cada grupo. No **Gráfico 5**, foram demonstradas as médias do escore para cada grupo (**Gráfico 5**) e subgrupo (**Gráfico 5-B**), assim como a comparação das médias entre os grupos para cada tempo de seguimento, com 10 (**Gráfico 5-C**), 12 (**Gráfico 5-D**) e 16 semanas (**Gráfico 5-E**). Na Tabela 5 foram descritos os valores de p

para comparações entre os grupos, para subgrupos de mesmo tempo de seguimento.

Tabela 4 – Escore de Bonar: distribuição do número de animais avaliados, médias, desvios padrões, valores mínimo e máximo, e valor de p na comparação dentro dos grupos

Grupo	Subgrupo	N	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo	p
A	A1	5	11,60	0,55	11	12	0,012^{*ac}
	A2	6	8,00	2,01	6	11	
	A3	5	11,80	2,28	8	14	
	TOTAL	16	10,31	2,52	6	14	
B	B1	6	12,80	0,84	12	14	<0,001^{ab}
	B2	4	4,50	1,91	2	6	
	B3	5	5,60	2,51	2	8	
	TOTAL	14	7,86	4,22	2	14	
C	Controle	8	2,00	0,76	1	3	

* Diferença significativa na comparação dos subgrupos dentro do mesmo grupo, com 10, 12 e 16 semanas de seguimento.

^a Diferença na comparação individualizada entre subgrupos com 10 e 12 semanas de seguimento.

^b Diferença na comparação individualizada entre subgrupos com 10 e 16 semanas de seguimento.

^c Diferença na comparação individualizada entre subgrupos com 12 e 16 semanas de seguimento.

Tabela 5 – Escore de Bonar: Valor de p na comparação entre os grupos, para subgrupos de mesmo tempo de seguimento

Seguimento	Subgrupos		p
10 semanas	A1	B1	0,033*
12 semanas	A2	B2	0,028*
16 semanas	A3	B3	<0,001*
		Controle	<0,001*
	B3	Controle	0,011*

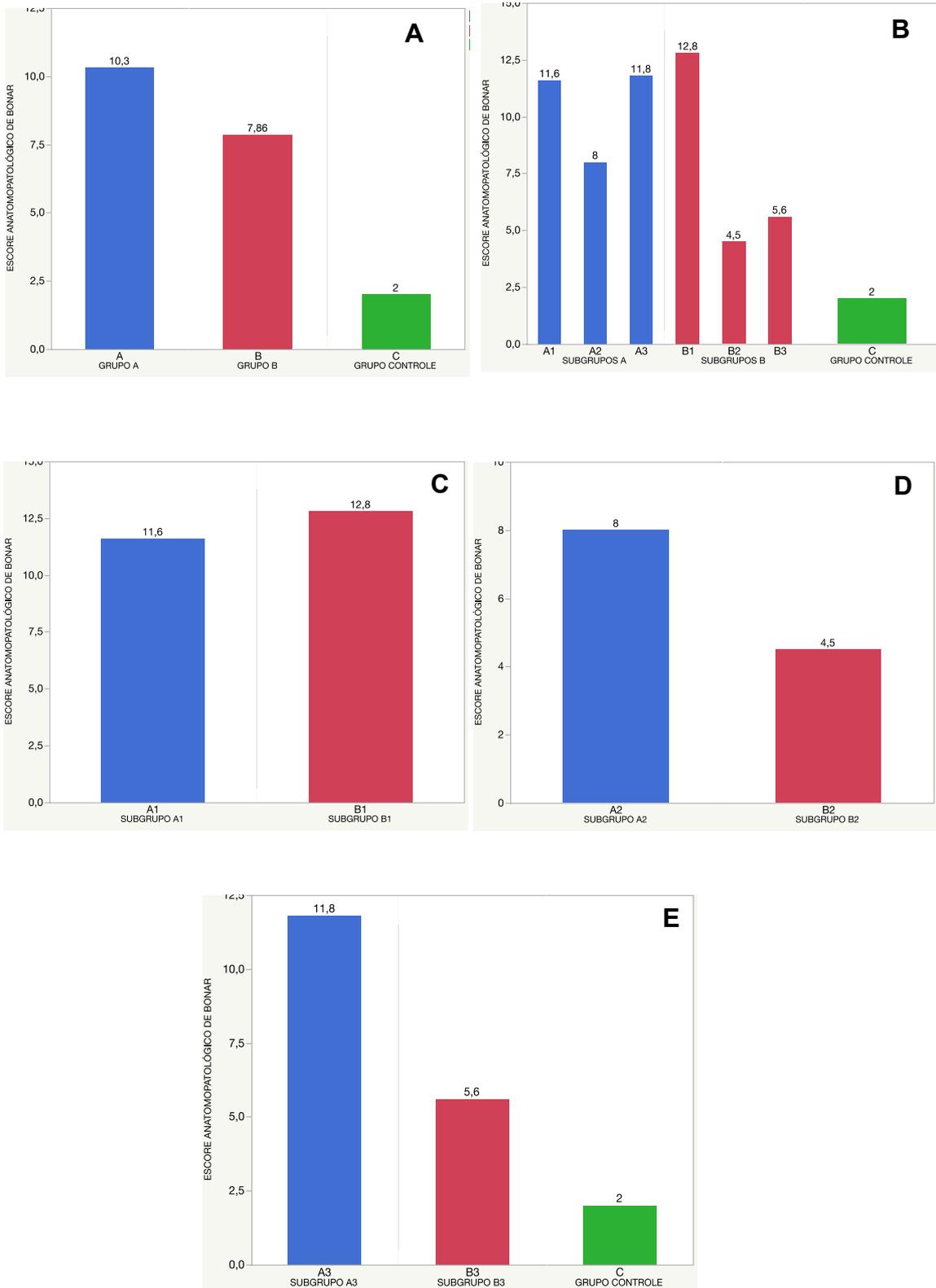
* Diferença significativa na comparação entre os subgrupos

Houve diferença significativa entre os grupos A, B e controles, na comparação do escore histológico de Bonar na 16^a semana de seguimento ($p < 0,001$). Na análise detalhada, os escores foram significativamente maiores ($p < 0,001$) nos coelhos submetidos a três injeções seriadas de colagenase (subgrupo A3), quando comparados aos submetidos à injeção única (subgrupo B3) e aos controles (grupo C). O escore do subgrupo B3 também foi significativamente maior que o dos controles ($p = 0,011$). Exemplos da avaliação histológica para animais dos Subgrupos A3, B3 e Controles foram apresentados nas **Figuras 19, 20, e 21**.

Também foram encontradas diferenças significativas entre os grupos A e B nos seguimentos de 10 semanas ($p = 0,033$), com valores superiores para o subgrupo B1 quando comparados ao subgrupo A1, e 12 semanas ($p = 0,028$), com valores do subgrupo A2 superando os valores do subgrupo B2.

A comparação dentro dos grupos, nos diferentes tempos de seguimento, demonstrou diferença para ambos os grupos A ($p = 0,012$) e B ($p < 0,001$). Mais especificamente, no grupo A, os valores do escore para o subgrupo A1 foram significativamente superiores ao subgrupo A2 ($p = 0,009$), assim como os valores para o subgrupo A3 foram superiores ao subgrupo A2 ($p = 0,022$). Não houve diferença entre os subgrupos A1 e A3. Nas comparações dentro do grupo B, os valores do escore de Bonar para o subgrupo B1 foram significativamente superiores aos valores de ambos os subgrupos B2 e B3 ($p < 0,001$). Já os subgrupos B2 e B3 eram semelhantes.

Gráfico 5 – Escore de Bonar: médias para cada grupo (A) e subgrupo (B), e comparação das médias entre os grupos para cada tempo de seguimento, com 10 (C), 12 (D) e 16 semanas (E)



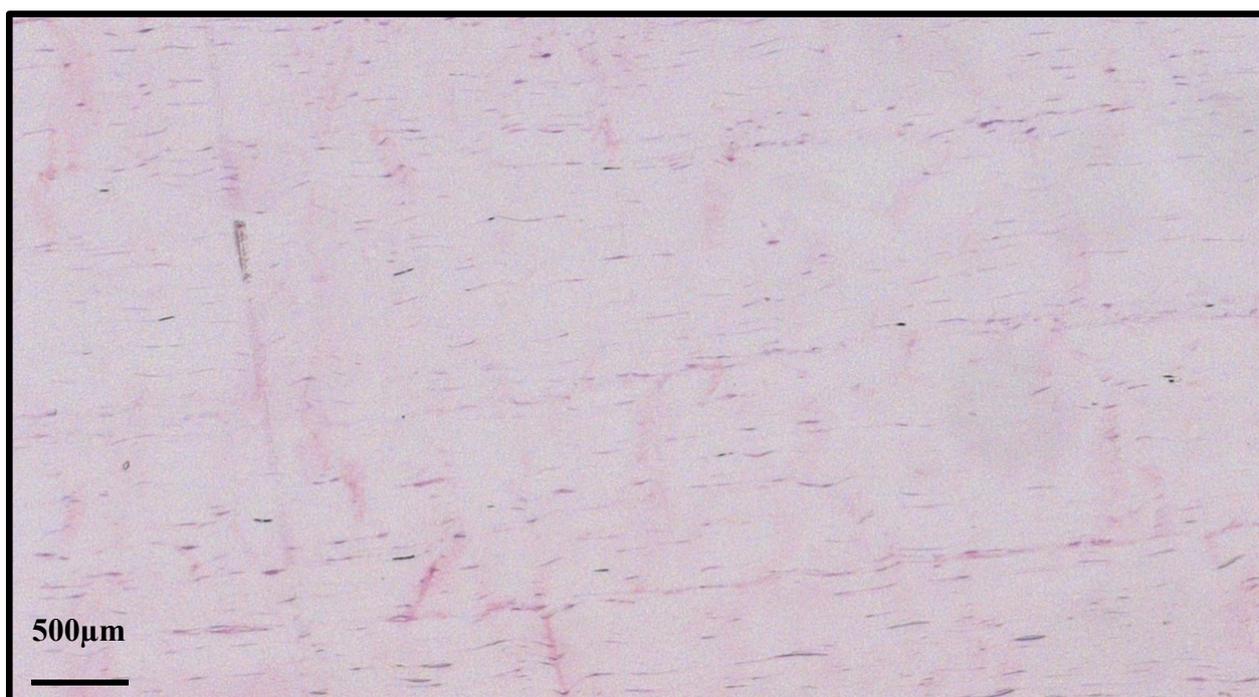


Figura 19. Fotografia da lâmina do tendão do calcâneo de coelho do Grupo Controle no seguimento de 16 semanas. Morfologia celular pouco alterada, feixes colágenos bem delimitados, discreto aumento da celularidade, vascularização e substância fundamental não aumentadas (aumento: 40 vezes, coloração: hematoxilina-eosina)

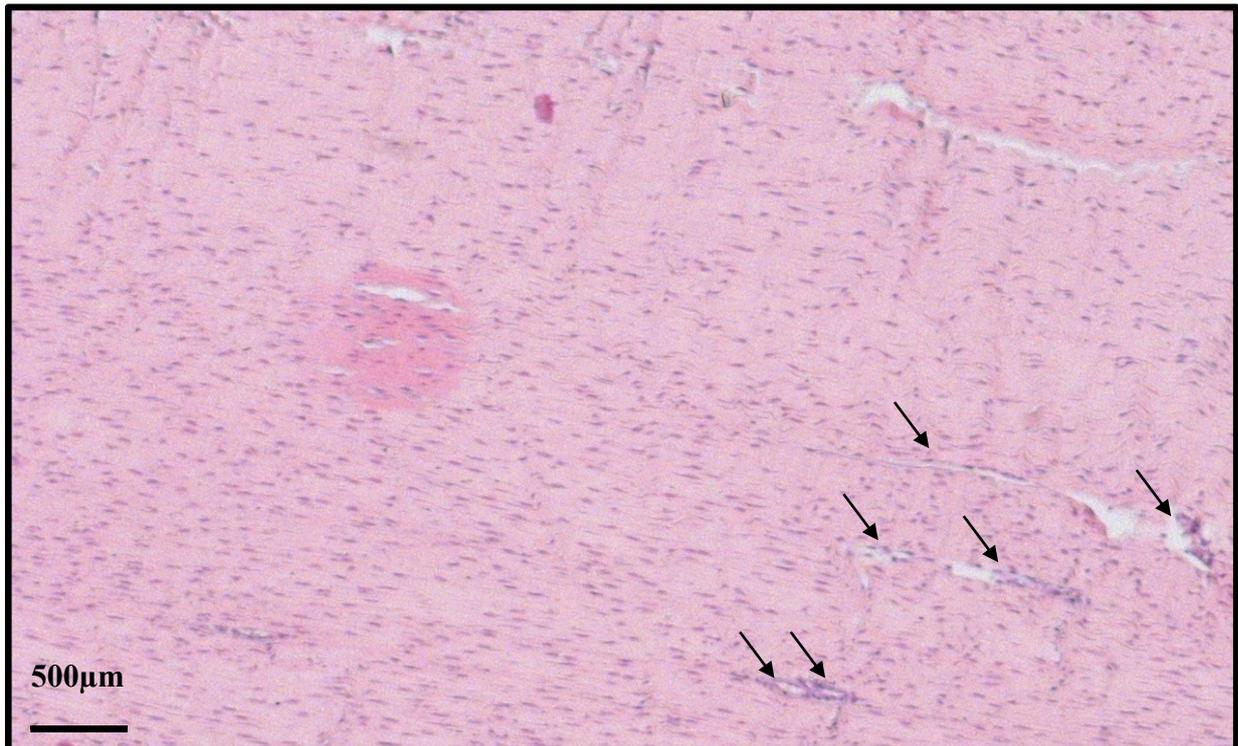


Figura 20. Fotografia da lâmina do tendão do calcâneo de coelho do Grupo B3 (injeção única, seguimento de 16 semanas). Hiper celularidade, morfologia celular alterada com maior arredondamento dos núcleos celulares, perda do padrão ondulado dos feixes colágenos, discreto aumento da celularidade, áreas de hipervascularização (setas) (aumento: 40 vezes, coloração: hematoxilina-eosina)

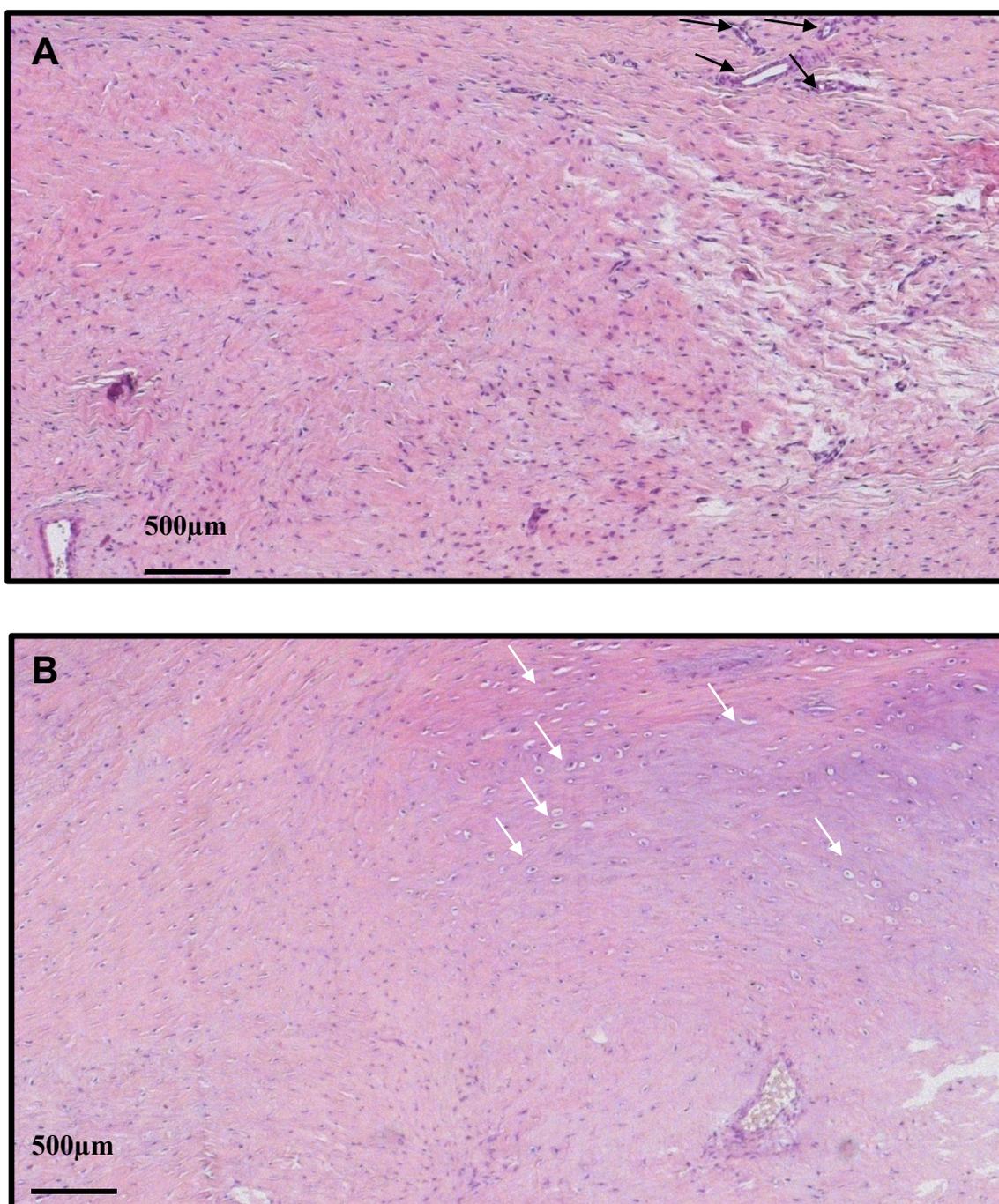


Figura 21. Fotografias de lâminas do tendão do calcâneo de coelho do Grupo A3 (injeções seriadas, seguimento de 16 semanas). Áreas de hiper celularidade, hipocelularidade e acelularidade; morfologia celular alterada, arredondamento dos núcleos celulares, formação de lacunas ou halo, compatível com metaplasia condroide (Figura C-B, setas brancas), perda da arquitetura dos feixes colágenos, aglomerados vasculares (Figura C-A, setas pretas) e aumento difuso da substância fundamental (aumento: 40 vezes, coloração: hematoxilina-eosina)

5.2 Análise biomecânica

Dos 45 coelhos operados, 34 foram submetidos ao estudo biomecânico. Além das perdas previamente mencionadas (sete animais), foram excluídos mais quatro corpos de prova devido à má qualidade da amostra, impossibilitando fixação adequada nas garras de apreensão. Das quatro amostras excluídas, duas pertenciam ao subgrupo A2 (injeções seriadas e eutanásia com 12 semanas de seguimento), uma pertencia ao subgrupo B3 (injeção única e eutanásia com 16 semanas de seguimento) e a outra pertencia ao grupo controle.

Durante o ensaio mecânico destrutivo, foram verificados os locais de ruptura do corpo de prova. Em 28 deles (82.3%), a ruptura ocorreu no nível da inserção do tendão do calcâneo na tuberosidade calcânea (**Figura 22**). Nos outros seis corpos de prova, a ruptura ocorreu próximo à garra criogênica, na região da junção músculo-tendínea (17.7%).

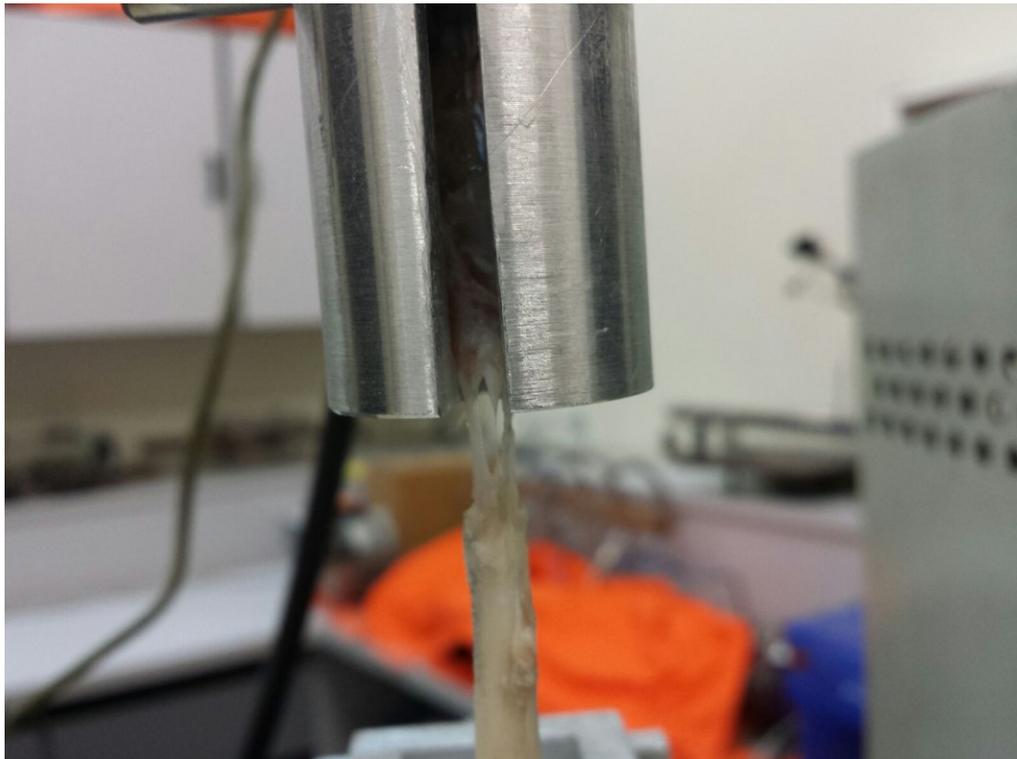


Figura 22. Ensaio mecânico destrutivo: rotura do tendão do calcâneo no nível da sua inserção na tuberosidade do calcâneo

Um sumário com os resultados para os diferentes desfechos biomecânicos em cada grupo e subgrupo de estudo, assim como o valor do **p** para comparação entre os subgrupos de mesmo tempo de seguimento foram apresentados a seguir, respectivamente para a 16^a (**Tabela 6**), 12^a (**Tabela 7**) e 10^a semanas (**Tabela 8**).

Tabela 6 – Desfechos Biomecânicos: média, desvio padrão (DP) e valor de p na comparação entre os subgrupos na 16ª semana de seguimento

Desfechos na 16ª semana (Média±DP)	Grupo Controle (n=7)	Subgrupo A3 (n=5)	Subgrupo B3 (n=4)	Valor de p
Área de Secção Transversa (mm ²)	9,58±1,47	22,61±14,35	11,74±1,42	0,003^{*abc}
Rigidez (N/mm)	91,4±23,7	60,338±35,93	57,82±16,06	0,094
Módulo de Elasticidade (MPa)	300,1±116,32	129,45±81,76	191,18±52,54	0,024^{*a}
Força no Limite da Elasticidade (N)	215,24±55,88	155,34±98,07	164,73±62,67	0,341
Deformação no Limite da Elasticidade (mm)	6,30±2,17	12,25±5,28	8,2±4,01	0,057
Porcentagem de Deformação no Limite da Elasticidade (%)	20,39±5,62	30,74±12,42	21,01±9,54	0,159
Tensão no Limite da Elasticidade (MPa)	23,45±8,78	9,09±6,72	14,47±6,14	0,020^{*a}
Energia no Limite da Elasticidade (mJ)	309,75±120,15	263,03±266,55	291,01±163,97	0,913
Força no Limite da Resistência Máxima (N)	267,28±50,11	213,84±127,12	253,66±95,32	0,954
Deformação no Limite da Resistência Máxima (mm)	7,88±2,49	15,38±6,13	12,80±5,80	0,050
Porcentagem de Deformação no Limite da Resistência Máxima (%)	25,37±5,48	38,70±14,19	32,79±13,37	0,144
Tensão no Limite da Resistência Máxima (MPa)	28,86±8,13	12,43±8,93	22,39±9,61	0,022^{*a}
Energia no Limite da Resistência Máxima (mJ)	674,14±257,01	874,02±781,45	1167,14±369,9	0,151

continua

continuação

Desfechos na 16^a semana (Média±DP)	Grupo Controle (n=7)	Subgrupo A3 (n=5)	Subgrupo B3 (n=4)	Valor de p
Densidade de energia de deformação no limite da elasticidade (MJ.m ⁻³)	1,16±0,66	0,41±0,41	0,69±0,43	0,095
Densidade de energia de deformação no limite da Resistência Máxima (MJ.m ⁻³)	2,34±0,81	1,37±1,32	2,70±1,19	0,187

conclusão

* Diferença significativa na comparação dos subgrupos Controle, A3 e B3.

^a Diferença na comparação individualizada entre subgrupos Controle e A3.

^b Diferença na comparação individualizada entre subgrupos Controle e B3.

^c Diferença na comparação individualizada entre subgrupos A3 e B3.

Tabela 7 – Desfechos Biomecânicos: média, desvio padrão (DP) e valor de p na comparação entre os subgrupos na 12ª semana de seguimento

Desfechos na 12ª semana (Média±DP)	Subgrupo A2 (n=4)	Subgrupo B2 (n=4)	Valor de p
Área de Secção Transversa (mm ²)	18,00±7,45	10,29±1,68	0,128
Rigidez (N/mm)	64,84±5,9	61,02±18,84	0,564
Módulo de Elasticidade (MPa)	130,21±50,19	233,55±87,15	0,083
Força no Limite da Elasticidade (N)	251,42±100,80	205,23±46,80	0,773
Deformação no Limite da Elasticidade (mm)	9,00±4,44	8,00±1,56	0,438
Porcentagem de Deformação no Limite da Elasticidade (%)	27,45±12,03	21,04±4,5	0,378
Tensão no Limite da Elasticidade (MPa)	14,06±0,72	20,01±3,31	0,013*
Energia no Limite da Elasticidade (mJ)	635,77±557,55	402,70±169,14	0,454
Força no Limite da Resistência Máxima (N)	335,53±83,78	247,99±50,44	0,134
Deformação no Limite da Resistência Máxima (mm)	12,61±4,48	9,98±2,8	0,386
Porcentagem de Deformação no Limite da Resistência Máxima (%)	38,55±11,39	26,23±7,79	0,083
Tensão no Limite da Resistência Máxima (MPa)	19,66±3,58	24,58±6,33	0,225
Energia no Limite da Resistência Máxima (mJ)	1692,71±893,69	849,45±408,95	0,137
Densidade de energia de deformação no limite da elasticidade (MJ.m ⁻³)	0,93±0,44	0,98±0,23	0,850
Densidade de energia de deformação no limite da Resistência Máxima (MJ.m ⁻³)	2,87±0,62	2,21±1,19	0,371

* Diferença significativa na comparação entre subgrupos.

Tabela 8 – Desfechos Biomecânicos: média, desvio padrão (DP) e valor de p na comparação entre os subgrupos na 10^a semana de seguimento

Desfechos na 10^a semana (Média±DP)	Subgrupo A1 (n=5)	Subgrupo B1 (n=5)	Valor de p
Área de Secção Transversa (mm ²)	16,59±5,40	27,17±7,87	0,038*
Rigidez (N/mm)	84,26±33,11	43,43±13,61	0,048*
Módulo de Elasticidade (MPa)	219,63±135,50	74,99±43,97	0,016*
Força no Limite da Elasticidade (N)	271,10±87,39	117,56±42,36	0,008*
Deformação no Limite da Elasticidade (mm)	9,65±3,43	13,61±3,89	0,127
Porcentagem de Deformação no Limite da Elasticidade (%)	24,69±8,78	33,22±10,42	0,199
Tensão no Limite da Elasticidade (MPa)	17,91±9,92	4,72±2,14	0,020*
Energia no Limite da Elasticidade (mJ)	535,05±203,13	213,89±133,21	0,047*
Força no Limite da Resistência Máxima (N)	389,14±105,67	168,17±59,59	0,004*
Deformação no Limite da Resistência Máxima (mm)	14,13±4,44	21,62±7,78	0,098
Porcentagem de Deformação no Limite da Resistência Máxima (%)	35,98±11,08	53,06±20,65	0,142
Tensão no Limite da Resistência Máxima (MPa)	25,08±10,58	7,13±4,16	0,008*
Energia no Limite da Resistência Máxima (mJ)	1981,93±882,94	1346,40±1405,55	0,417
Densidade de energia de deformação no limite da elasticidade (MJ.m ⁻³)	0,88±0,47	0,20±0,13	0,015*
Densidade de energia de deformação no limite da Resistência Máxima (MJ.m ⁻³)	3,00±0,83	1,68±2,21	0,241

* Diferença significativa na comparação entre subgrupos.

Tabela 9 – Desfechos Biomecânicos: valor de p para comparação dentro dos grupos de estudo, entre os diferentes tempos de seguimento

Desfechos	Grupo A (Valor de p)	Grupo B (Valor de p)
Área de Secção Transversa (mm ²)	0,628	0,011^{*a}
Rigidez (N/mm)	0,432	0,200
Módulo de Elasticidade (MPa)	0,304	0,024^{*a}
Força no Limite da Elasticidade (N)	0,171	0,094
Deformação no Limite da Elasticidade (mm)	0,516	0,060
Porcentagem de Deformação no Limite da Elasticidade (%)	0,698	0,158
Tensão no Limite da Elasticidade (MPa)	0,201	0,023^{*a}
Energia no Limite da Elasticidade (mJ)	0,295	0,387
Força no Limite da Resistência Máxima (N)	0,106	0,158
Deformação no Limite da Resistência Máxima (mm)	0,739	0,105
Porcentagem de Deformação no Limite da Resistência Máxima (%)	0,698	0,134
Tensão no Limite da Resistência Máxima (MPa)	0,108	0,031^{*a}
Energia no Limite da Resistência Máxima (mJ)	0,151	0,529
Densidade de energia de deformação no limite da elasticidade (MJ.m ⁻³)	0,180	0,017^{*a}
Densidade de energia de deformação no limite da Resistência Máxima (MJ.m ⁻³)	0,049^{*b}	0,295

* Diferença significativa na comparação dos subgrupos com 10, 12 e 16 semanas de seguimento.

^a Diferença na comparação individualizada entre subgrupos com 10 e 12 semanas de seguimento.

^b Diferença na comparação individualizada entre subgrupos com 12 e 16 semanas de seguimento.

5.2.1 Análise dos dados para área de secção transversa

No Gráfico 6 foram demonstradas as médias da área de secção transversa do TC para cada grupo (**Gráfico 6-A**) e subgrupo (**Gráfico 6-B**), assim como a comparação das médias entre os grupos para cada tempo de seguimento, com 10 (**Gráfico 6-C**), 12 (**Gráfico 6-D**) e 16 semanas (**Gráfico 6-E**).

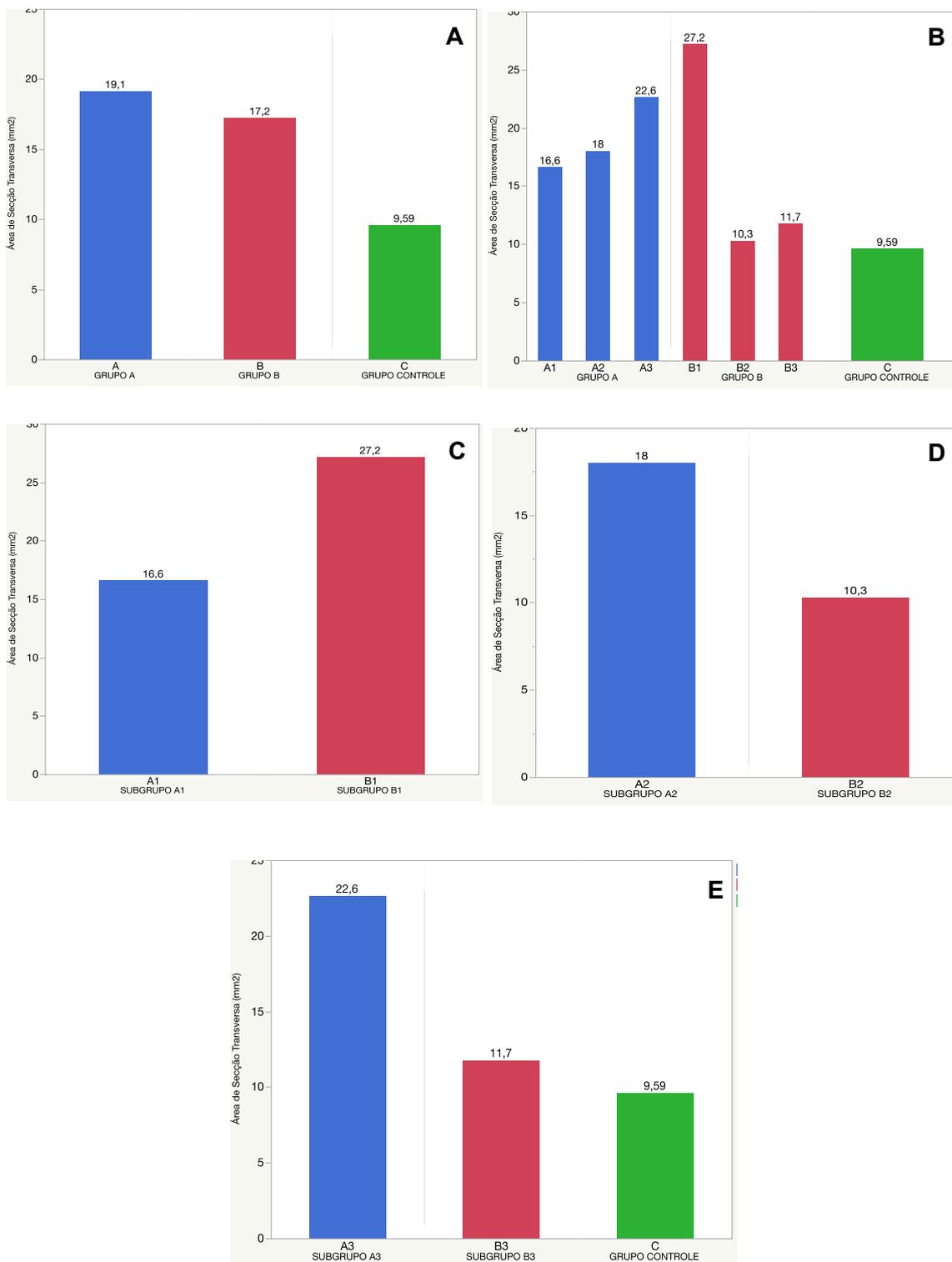
Houve diferença significativa entre os grupos A, B e controles, na comparação da área de secção transversa do tendão na 16^a semana de seguimento ($p=0,003$). Na análise detalhada, os valores foram significativamente maiores nos animais do subgrupo A3, quando comparados aos do subgrupo B3 ($p=0,027$) e aos controles ($p=0,004$). Os valores para o subgrupo B3 também foram significativamente maiores que os valores dos controles ($p=0,023$).

Também foi encontrada diferença significativa entre os grupos A e B no seguimento de 10 semanas, com valores superiores para o subgrupo B1 quando comparados ao subgrupo A1 ($p=0,038$). Não houve diferença na comparação entre os subgrupos A2 e B2, para a 12^a semana de seguimento.

Na comparação dentro dos grupos, nos diferentes tempos de seguimento, não houve diferença entre os subgrupos do grupo A. Já no grupo B, encontrou-se diferença significativa entre os subgrupos ($p=0,011$). Mais especificamente, na comparação detalhada, os valores do subgrupo B1 eram significativamente maiores do que do subgrupo B2 ($p=0,014$). Não houve diferença na comparação entre os outros subgrupos.

Na **Figura 23** foi demonstrado um exemplo de avaliação clínica de um dos coelhos submetidos a três injeções seriadas de colagenase, com evidente espessamento do TC e conseqüente aumento de sua área de secção transversa.

Gráfico 6 – Área de Secção Transversa: médias para cada grupo (A) e subgrupo (B), e comparação das médias entre os grupos para cada tempo de seguimento, com 10 (C), 12 (D) e 16 semanas (E)



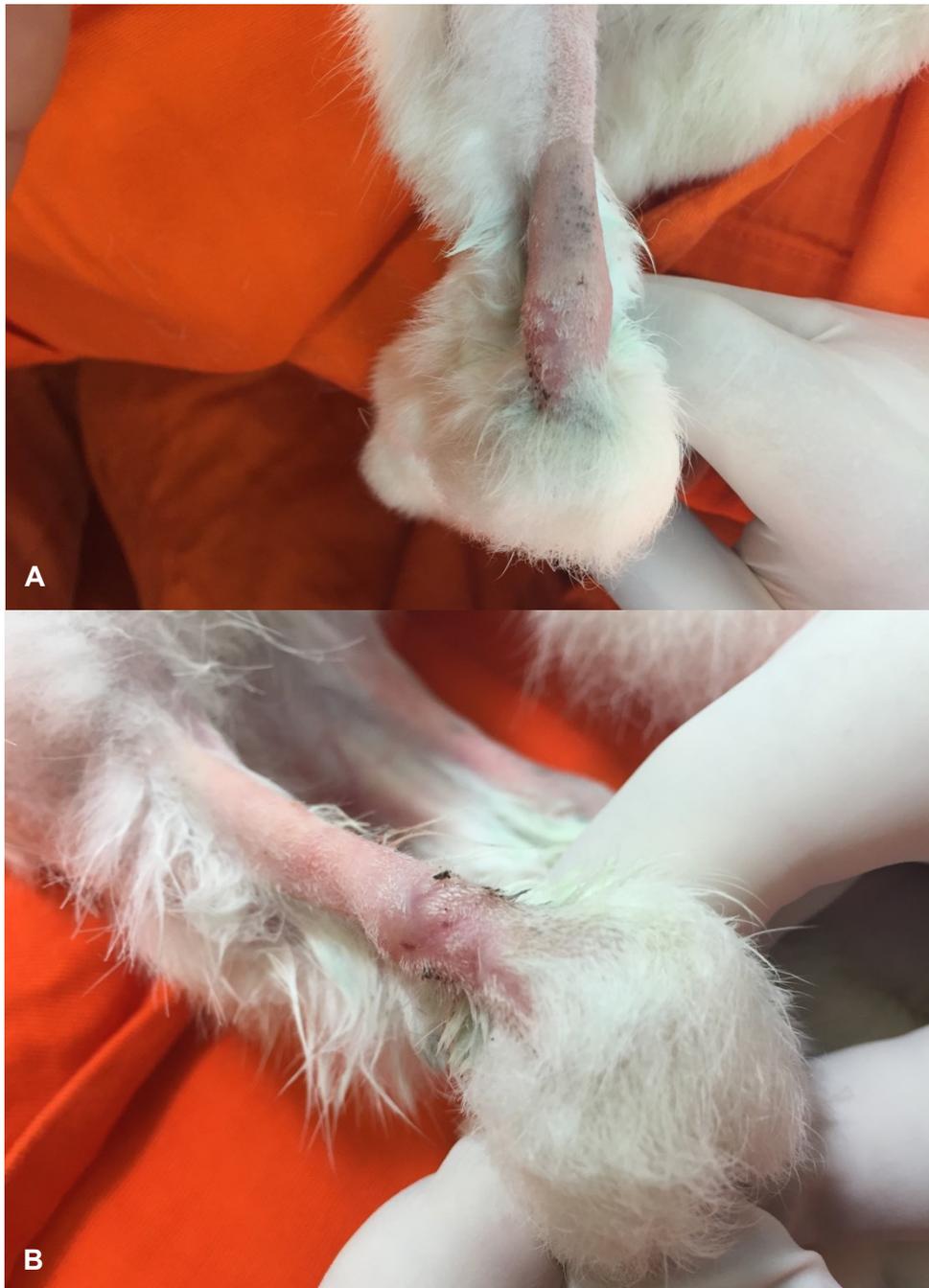


Figura 23. Avaliação clínica de coelho submetido a três injeções seriadas de colagenase, com espessamento difuso do TC. Visão posterior (A) e lateral (B)

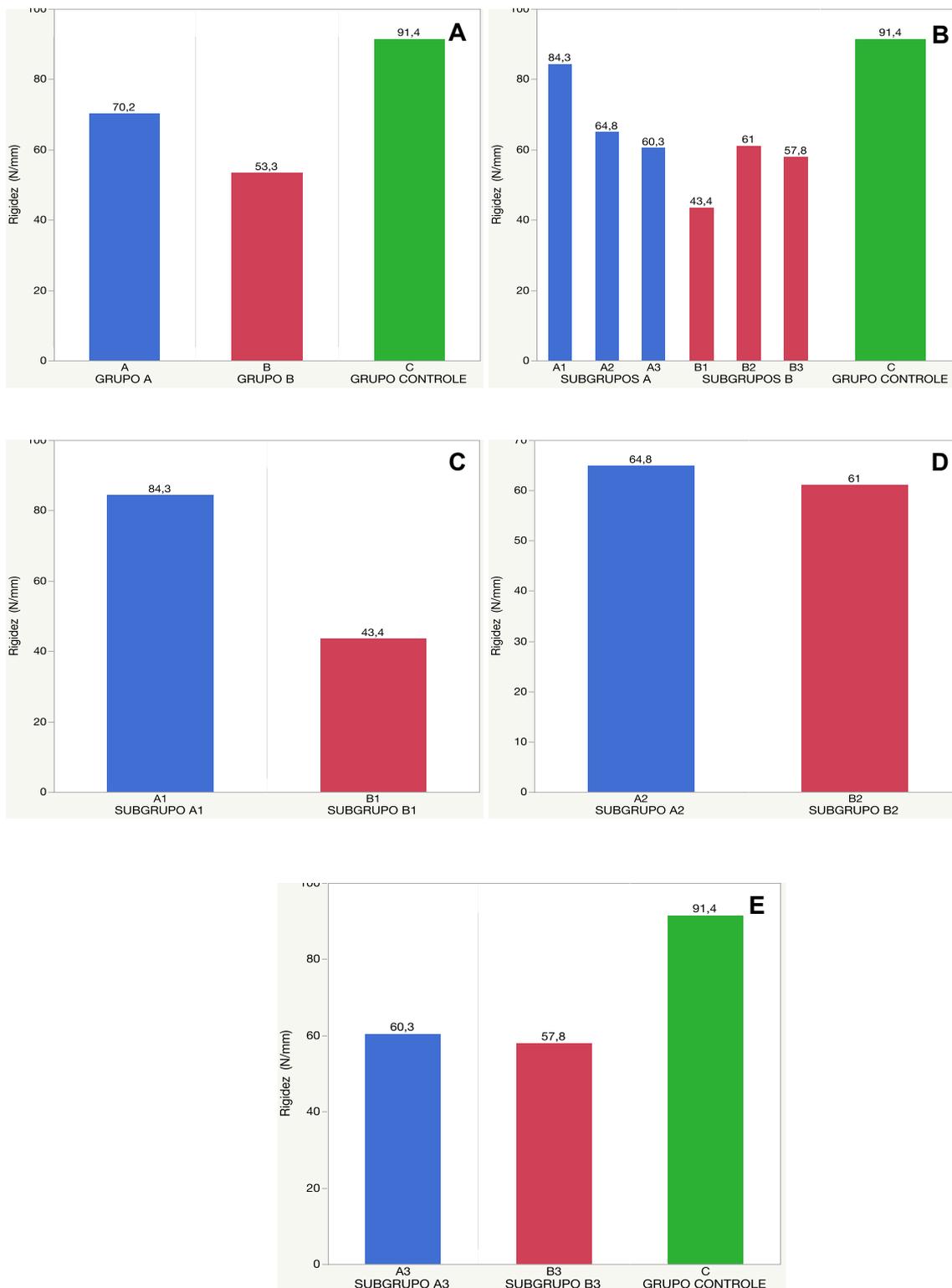
5.2.2 Análise dos dados para rigidez

No Gráfico 7 foram demonstradas as médias da rigidez do TC para cada grupo (**Gráfico 7-A**) e subgrupo (**Gráfico 7-B**), assim como a comparação das médias entre os grupos para cada tempo de seguimento, com 10 (**Gráfico 7-C**), 12 (**Gráfico 7-D**) e 16 semanas (**Gráfico 7-E**).

Houve diferença significativa entre os grupos A e B na comparação da rigidez do TC na 10^a semana de seguimento ($p=0,048$), sendo que os valores para o subgrupo B1 eram significativamente menores que os do subgrupo A1. Não foi encontrada diferença entre os grupos na 12^a e 16^a semanas de seguimento.

Na comparação dentro dos grupos, nos diferentes tempos de seguimento, não houve diferença tanto entre os subgrupos do grupo A quanto entre os do grupo B.

Gráfico 7 – Rigidez: médias para cada grupo (A) e subgrupo (B), e comparação das médias entre os grupos para cada tempo de seguimento, com 10 (C), 12 (D) e 16 semanas (E)



5.2.3 Análise dos dados para módulo de elasticidade

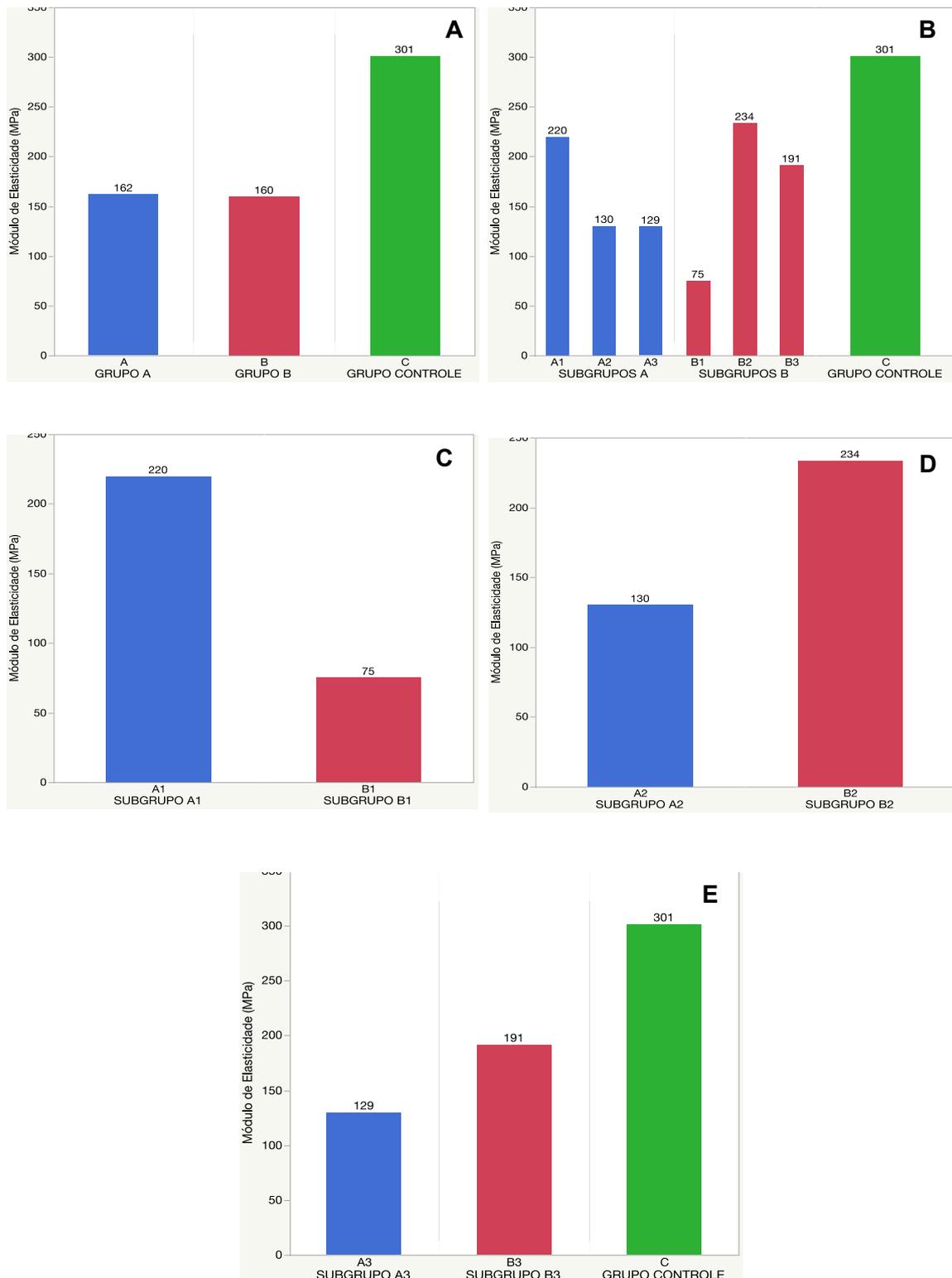
No Gráfico 8 foram demonstradas as médias de módulo de elasticidade para cada grupo (**Gráfico 8-A**) e subgrupo (**Gráfico 8-B**), assim como a comparação das médias entre os grupos para cada tempo de seguimento, com 10 (**Gráfico 8-C**), 12 (**Gráfico 8-D**) e 16 semanas (**Gráfico 8-E**).

Houve diferença significativa entre os grupos A, B e controles, na comparação do módulo de elasticidade dos TC na 16^a semana de seguimento ($p=0,024$). Na análise detalhada, os valores foram significativamente menores nos animais do subgrupo A3, quando comparados aos controles ($p=0,025$). Não houve diferença entre os outros subgrupos.

Também foi encontrada diferença significativa entre os grupos A e B no seguimento de 10 semanas, com valores superiores para o subgrupo A1 quando comparados ao subgrupo B1 ($p=0,016$). Não houve diferença na comparação entre os subgrupos A2 e B2, para a 12^a semana de seguimento.

Na comparação dentro dos grupos, nos diferentes tempos de seguimento, não houve diferença entre os subgrupos do grupo A. Já no grupo B, encontrou-se diferença significativa entre os subgrupos ($p=0,024$). Mais especificamente, na comparação detalhada, os valores do subgrupo B1 eram significativamente menores do que do subgrupo B2 ($p=0,027$). Não houve diferença na comparação entre os outros subgrupos.

Gráfico 8 – Módulo de Elasticidade: médias para cada grupo (A) e subgrupo (B), e comparação das médias entre os grupos para cada tempo de seguimento, com 10 (C), 12 (D) e 16 semanas (E)



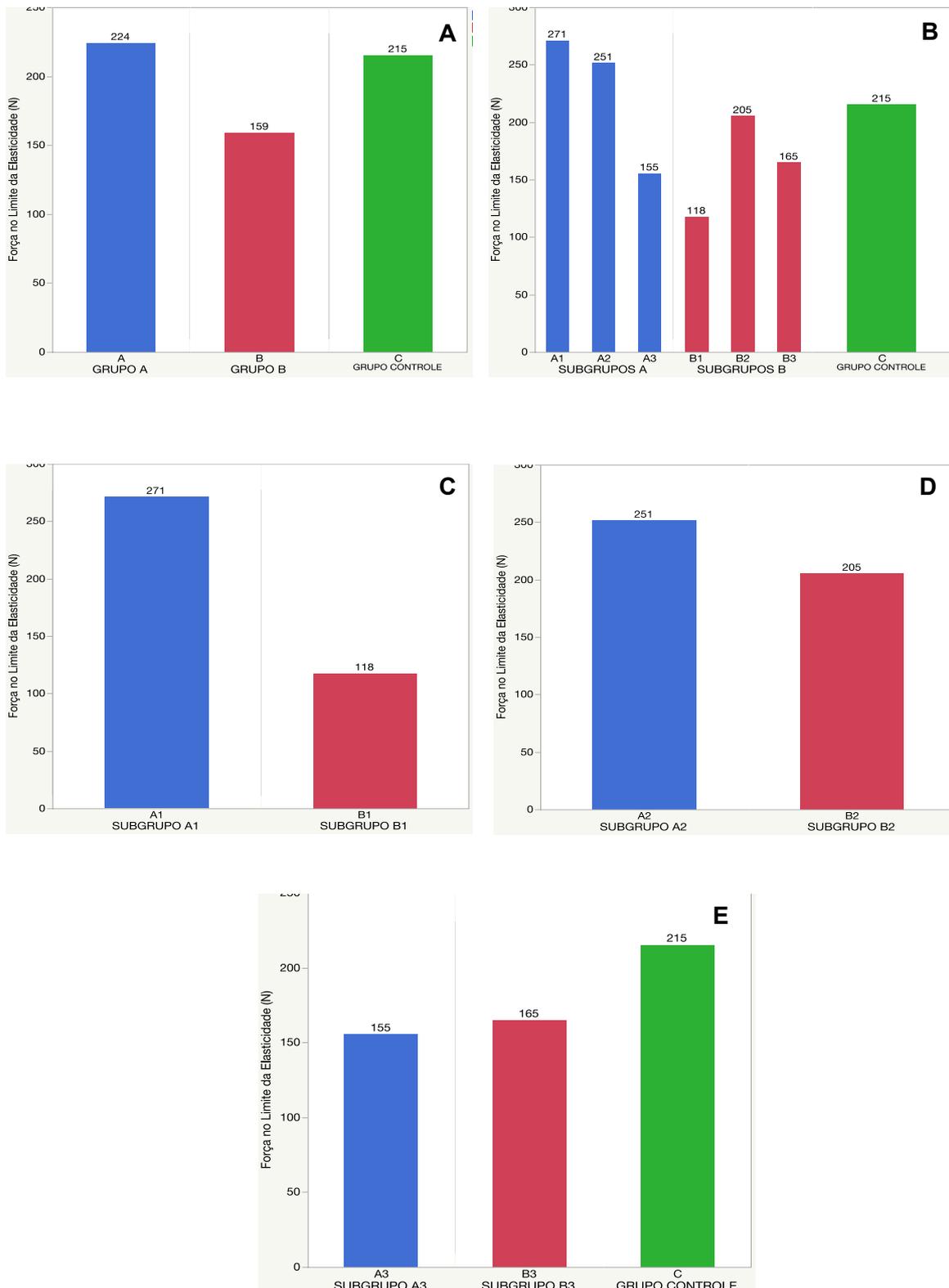
5.2.4 Análise dos dados para força no limite da elasticidade

No Gráfico 9 foram demonstradas as médias da força no limite da elasticidade, para cada grupo (**Gráfico 9-A**) e subgrupo (**Gráfico 9-B**), assim como a comparação das médias entre os grupos para cada tempo de seguimento, com 10 (**Gráfico 9-C**), 12 (**Gráfico 9-D**) e 16 semanas (**Gráfico 9-E**).

Houve diferença significativa entre os grupos A e B na comparação da força no limite da elasticidade dos TC na 10^a semana de seguimento ($p=0,008$), cujos valores para o subgrupo B1 eram significativamente menores que os do subgrupo A1. Não foi encontrada diferença entre os grupos na 12^a e 16^a semanas de seguimento.

Na comparação dentro dos grupos, nos diferentes tempos de seguimento, não houve diferença tanto entre os subgrupos do grupo A quanto entre os do grupo B.

Gráfico 9 – Força no Limite da Elasticidade: médias para cada grupo (A) e subgrupo (B), e comparação das médias entre os grupos para cada tempo de seguimento, com 10 (C), 12 (D) e 16 semanas (E)



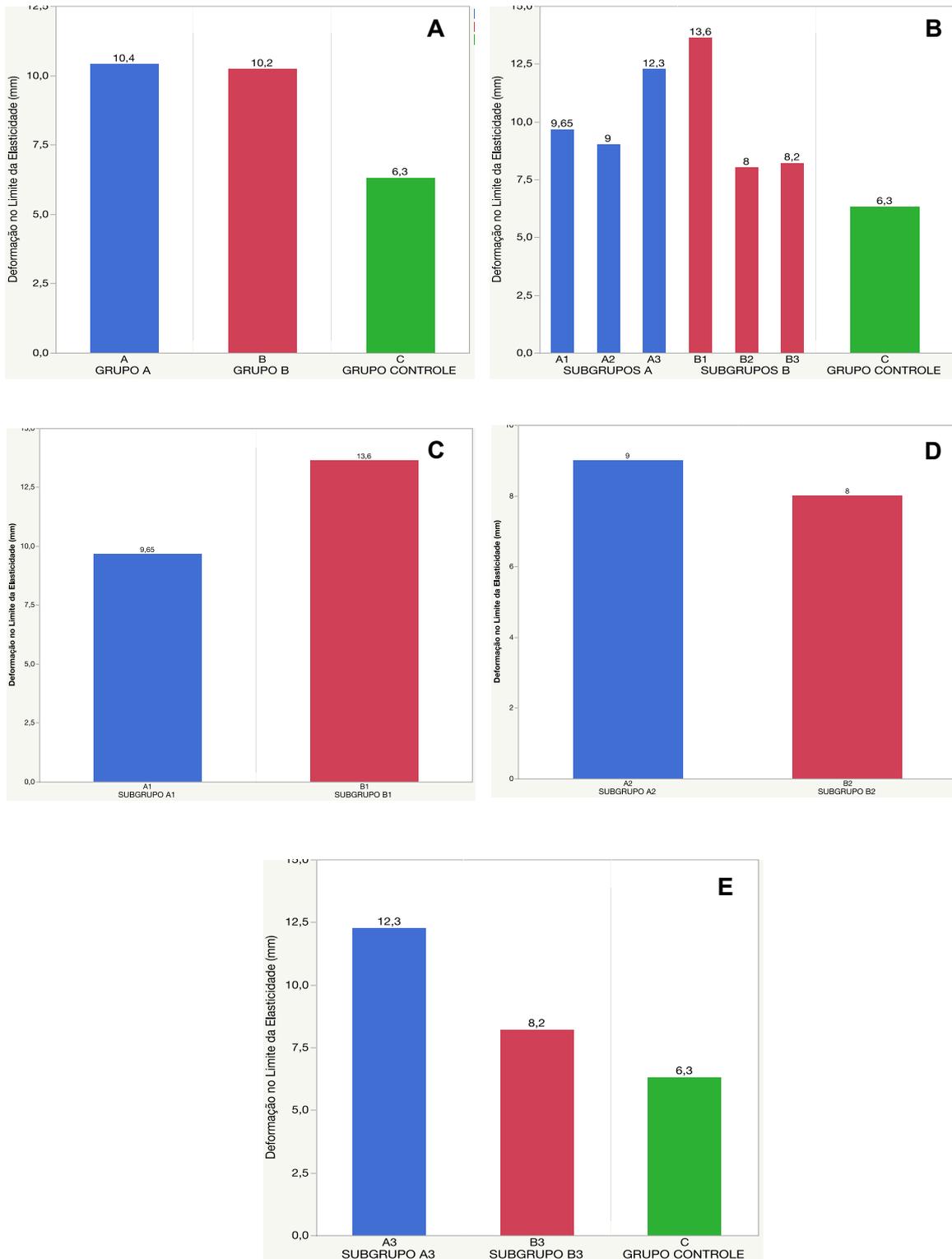
5.2.5 Análise dos dados para deformação no limite da elasticidade

No Gráfico 10 foram demonstradas as médias da deformação do TC no limite da elasticidade, para cada grupo (**Gráfico 10-A**) e subgrupo (**Gráfico 10-B**), assim como a comparação das médias entre os grupos para cada tempo de seguimento, com 10 (**Gráfico 10-C**), 12 (**Gráfico 10-D**) e 16 semanas (**Gráfico 10-E**).

Não foi encontrada diferença entre os grupos A, B e Controle em nenhum dos tempos de seguimento, com 10, 12 e 16 semanas.

Também não houve diferença na comparação dentro dos grupos, nos diferentes tempos de seguimento.

Gráfico 10 – Deformação no Limite da Elasticidade: médias para cada grupo (A) e subgrupo (B), e comparação das médias entre os grupos para cada tempo de seguimento, com 10 (C), 12 (D) e 16 semanas (E)



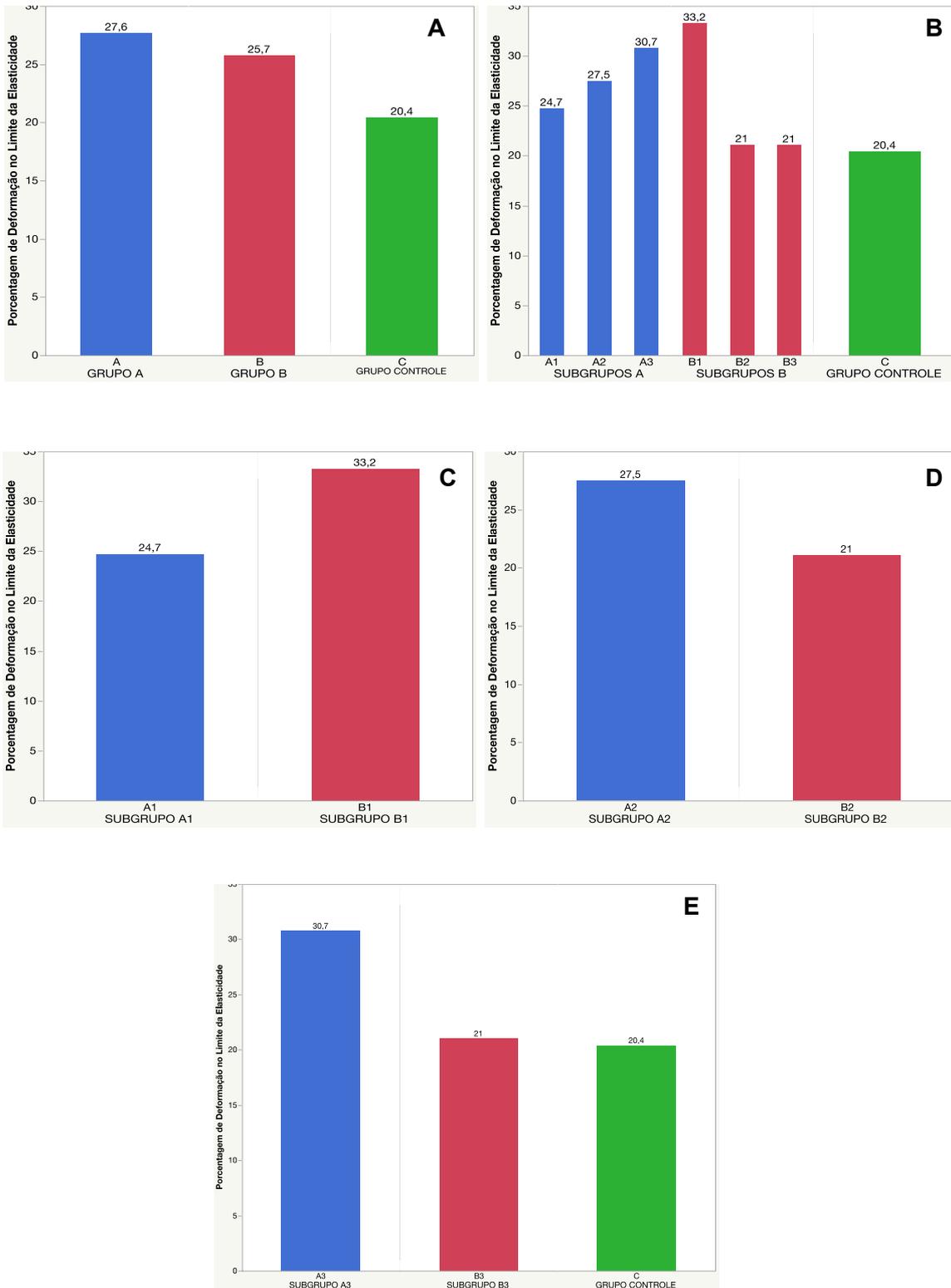
5.2.6 Análise dos dados para porcentagem de deformação no limite da elasticidade

No Gráfico 11 foram demonstradas as médias para a porcentagem de deformação do TC no limite da elasticidade, para cada grupo (**Gráfico 11-A**) e subgrupo (**Gráfico 11-B**), assim como a comparação das médias entre os grupos para cada tempo de seguimento, com 10 (**Gráfico 11-C**), 12 (**Gráfico 11-D**) e 16 semanas (**Gráfico 11-E**).

Não foi encontrada diferença entre os grupos A, B e Controle em nenhum dos tempos de seguimento, com 10, 12 e 16 semanas.

Também não houve diferença na comparação dentro dos grupos, nos diferentes tempos de seguimento.

Gráfico 11– Porcentagem de deformação no Limite da Elasticidade: médias para cada grupo (A) e subgrupo (B), e comparação das médias entre os grupos para cada tempo de seguimento, com 10 (C), 12 (D) e 16 semanas (E)



5.2.7 Análise dos dados para tensão no limite da elasticidade

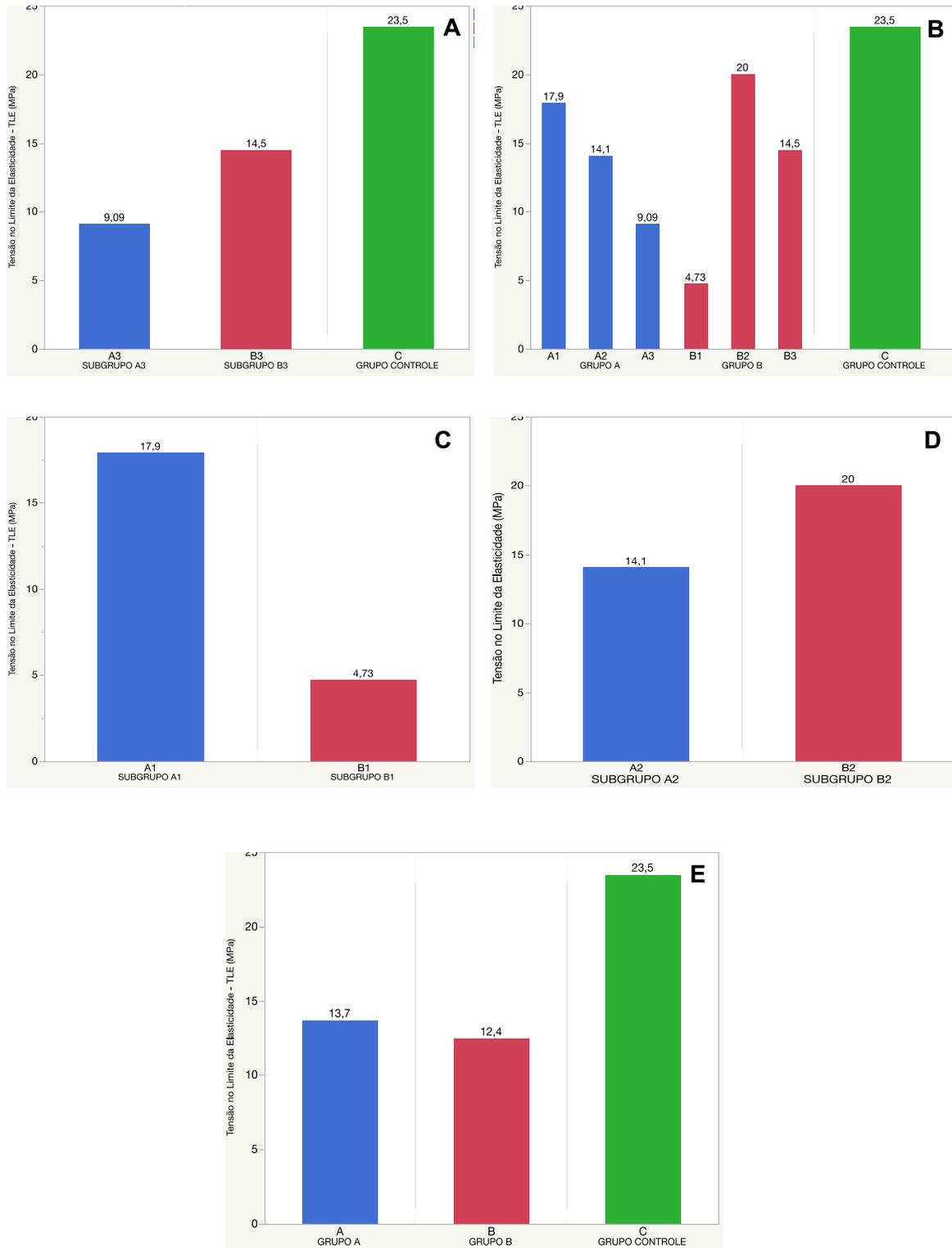
No Gráfico 12 foram demonstradas as médias da tensão do TC no limite da elasticidade, para cada grupo (**Gráfico 12-A**) e subgrupo (**Gráfico 12-B**), assim como a comparação das médias entre os grupos para cada tempo de seguimento, com 10 (**Gráfico 12-C**), 12 (**Gráfico 12-D**) e 16 semanas (**Gráfico 12-E**).

Houve diferença significativa entre os grupos A, B e controles, na comparação da tensão no limite da elasticidade do tendão na 16^a semana de seguimento ($p=0,020$). Na análise detalhada, os valores foram significativamente menores nos animais do subgrupo A3, quando comparados aos controles ($p=0,020$). Não houve diferença entre os outros subgrupos.

Também foi encontrada diferença significativa entre os grupos A e B nos seguimentos de 10 e 12 semanas, com valores inferiores para o subgrupo B1 quando comparados ao subgrupo A1 ($p=0,020$) e superiores para o subgrupo B2 quando comparados ao subgrupo A2 ($p=0,013$).

Na comparação dentro dos grupos, nos diferentes tempos de seguimento, não houve diferença entre os subgrupos do grupo A. Já no grupo B, encontrou-se diferença significativa entre os subgrupos ($p=0,023$). Mais especificamente, na comparação detalhada, os valores do subgrupo B1 eram significativamente menores do que do subgrupo B2 ($p=0,014$). Não houve diferença na comparação entre os outros subgrupos.

Gráfico 12 – Tensão no Limite da Elasticidade: médias para cada grupo (A) e subgrupo (B), e comparação das médias entre os grupos para cada tempo de seguimento, com 10 (C), 12 (D) e 16 semanas (E)



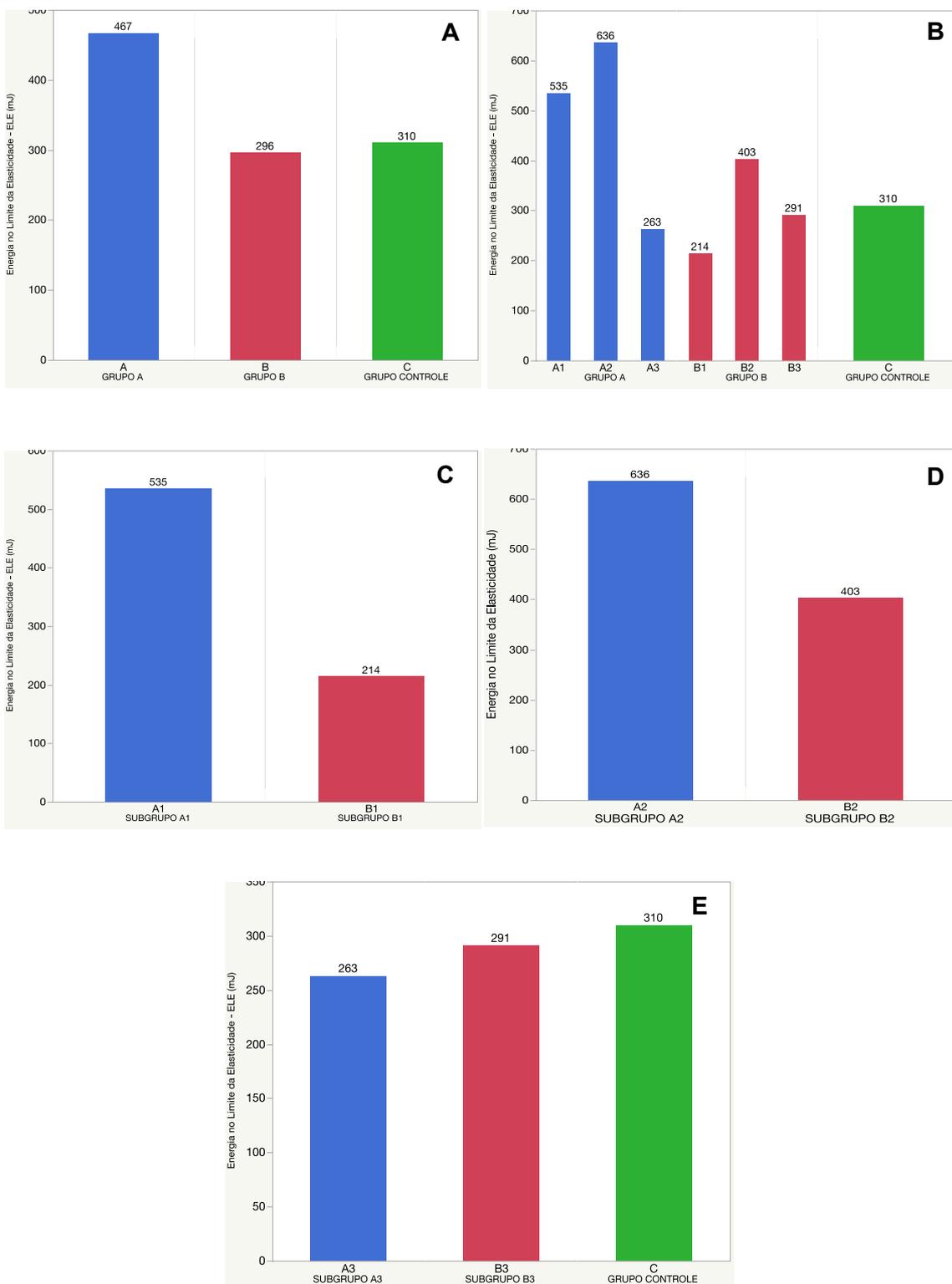
5.2.8 Análise dos dados para energia no limite da elasticidade

No Gráfico 13 foram demonstradas as médias da energia no limite da elasticidade, para cada grupo (**Gráfico 13-A**) e subgrupo (**Gráfico 13-B**), assim como a comparação das médias entre os grupos para cada tempo de seguimento, com 10 (**Gráfico 13-C**), 12 (**Gráfico 13-D**) e 16 semanas (**Gráfico 13-E**).

Houve diferença significativa entre os grupos A e B na comparação da energia no limite da elasticidade dos TC na 10^a semana de seguimento ($p=0,047$), cujos valores para o subgrupo B1 eram significativamente menores que os do subgrupo A1. Não foi encontrada diferença entre os grupos na 12^a e 16^a semanas de seguimento.

Na comparação dentro dos grupos, nos diferentes tempos de seguimento, não houve diferença tanto entre os subgrupos do grupo A quanto entre os do grupo B.

Gráfico 13 – Energia no Limite da Elasticidade: médias para cada grupo (A) e subgrupo (B), e comparação das médias entre os grupos para cada tempo de seguimento, com 10 (C), 12 (D) e 16 semanas (E)



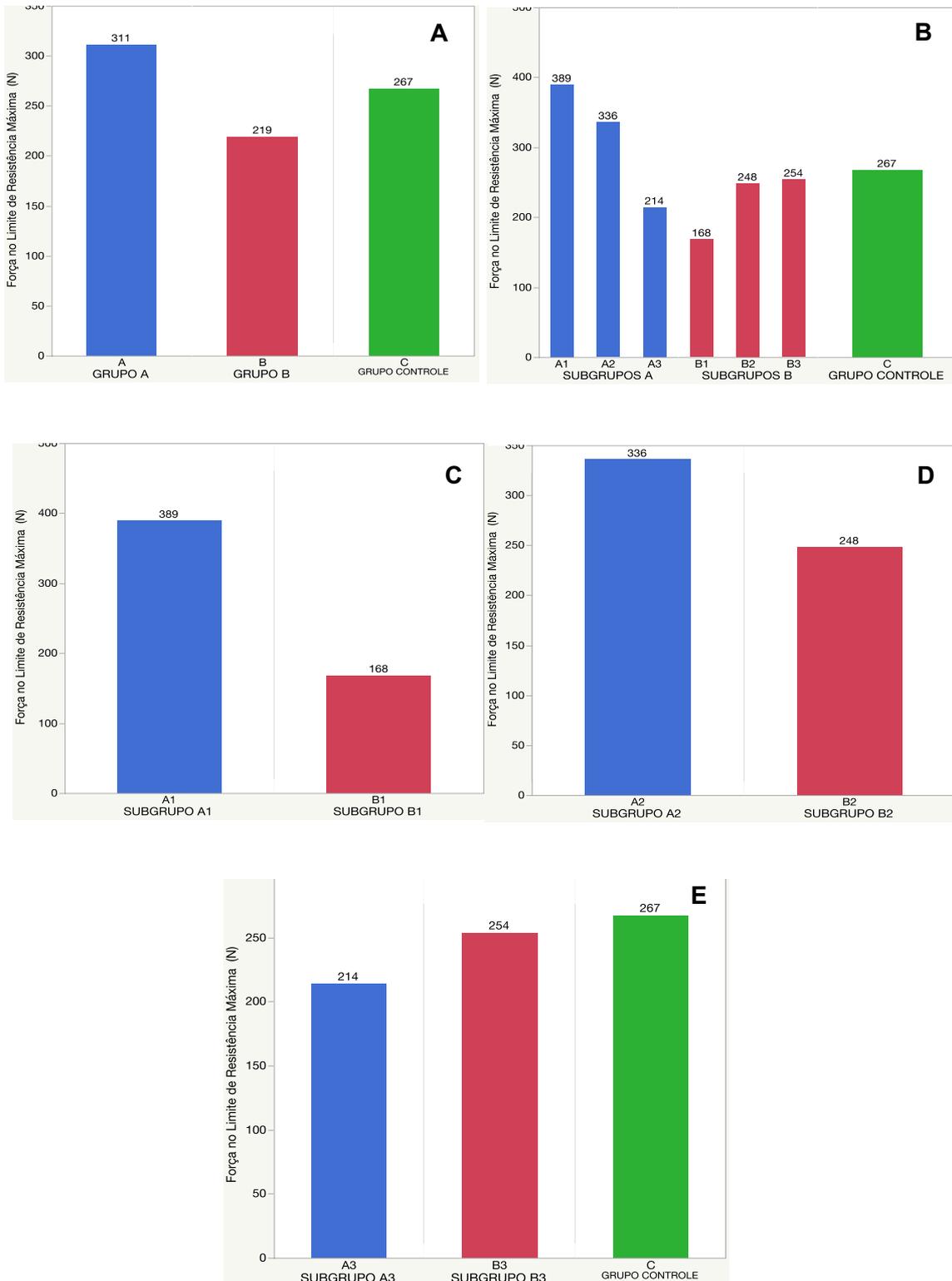
5.2.9 Análise dos dados para força no limite da resistência máxima

No Gráfico 14 foram demonstradas as médias da força no limite da resistência máxima, para cada grupo (**Gráfico 14-A**) e subgrupo (**Gráfico 14-B**), assim como a comparação das médias entre os grupos para cada tempo de seguimento, com 10 (**Gráfico 14-C**), 12 (**Gráfico 14-D**) e 16 semanas (**Gráfico 14-E**).

Houve diferença significativa entre os grupos A e B na comparação da força no limite da resistência máxima dos TC na 10^a semana de seguimento ($p=0,004$), cujos valores para o subgrupo B1 eram significativamente menores que os do subgrupo A1. Não foi encontrada diferença entre os grupos na 12^a e 16^a semanas de seguimento.

Na comparação dentro dos grupos, nos diferentes tempos de seguimento, não houve diferença tanto entre os subgrupos do grupo A quanto entre os do grupo B.

Gráfico 14 – Força no Limite da Resistência Máxima: médias para cada grupo (A) e subgrupo (B), e comparação das médias entre os grupos para cada tempo de seguimento, com 10 (C), 12 (D) e 16 semanas (E)



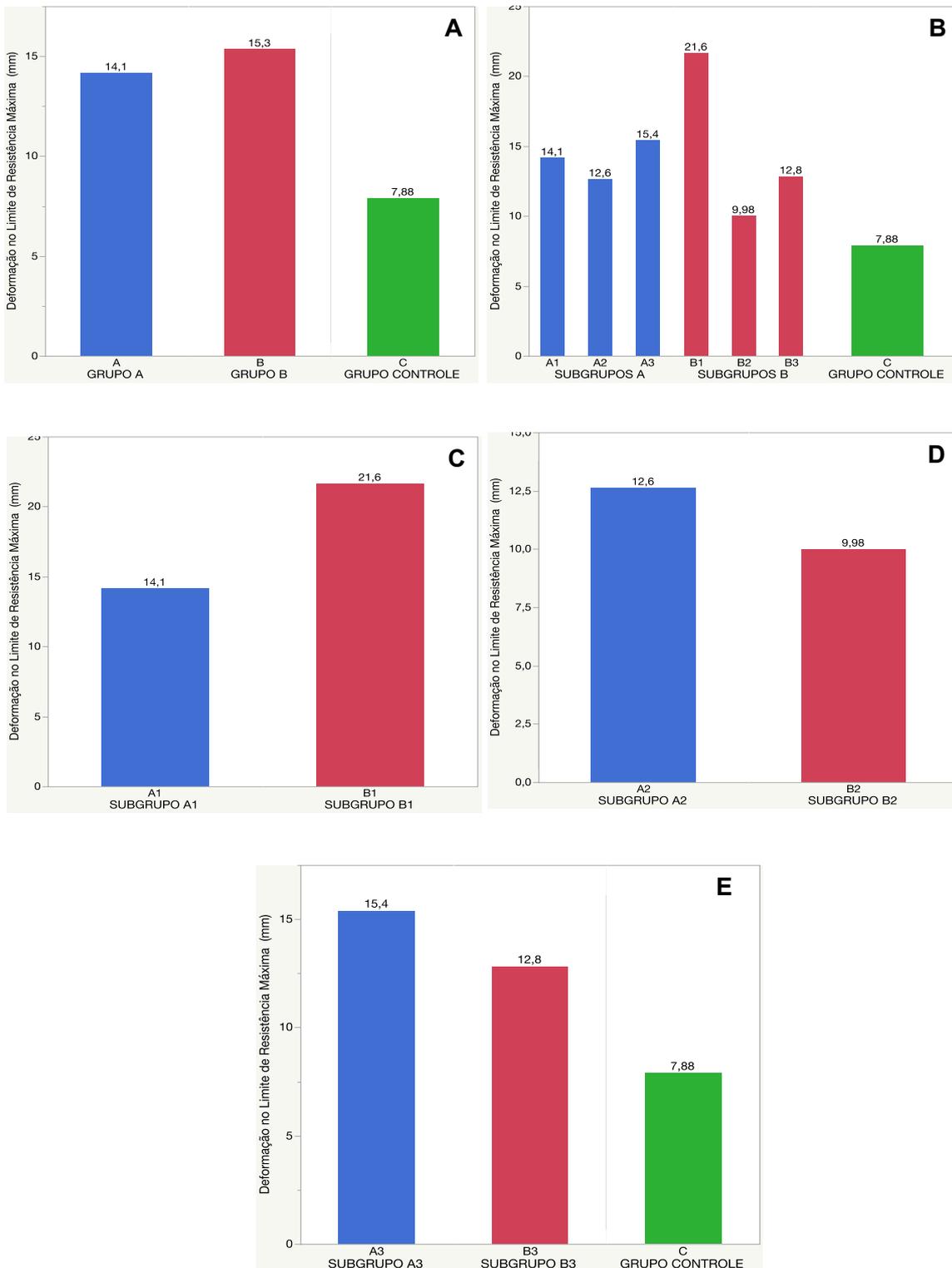
5.2.10 Análise dos dados para deformação no limite da resistência máxima

No Gráfico 15 foram demonstradas as médias da deformação no limite da resistência máxima, para cada grupo (**Gráfico 15-A**) e subgrupo (**Gráfico 15-B**), assim como a comparação das médias entre os grupos para cada tempo de seguimento, com 10 (**Gráfico 15-C**), 12 (**Gráfico 15-D**) e 16 semanas (**Gráfico 15-E**).

Não foi encontrada diferença entre os grupos A, B e Controle em nenhum dos tempos de seguimento, com 10, 12 e 16 semanas.

Também não houve diferença na comparação dentro dos grupos, nos diferentes tempos de seguimento.

Gráfico 15 – Deformação no Limite da Resistência Máxima: médias para cada grupo (A) e subgrupo (B), e comparação das médias entre os grupos para cada tempo de seguimento, com 10 (C), 12 (D) e 16 semanas (E)



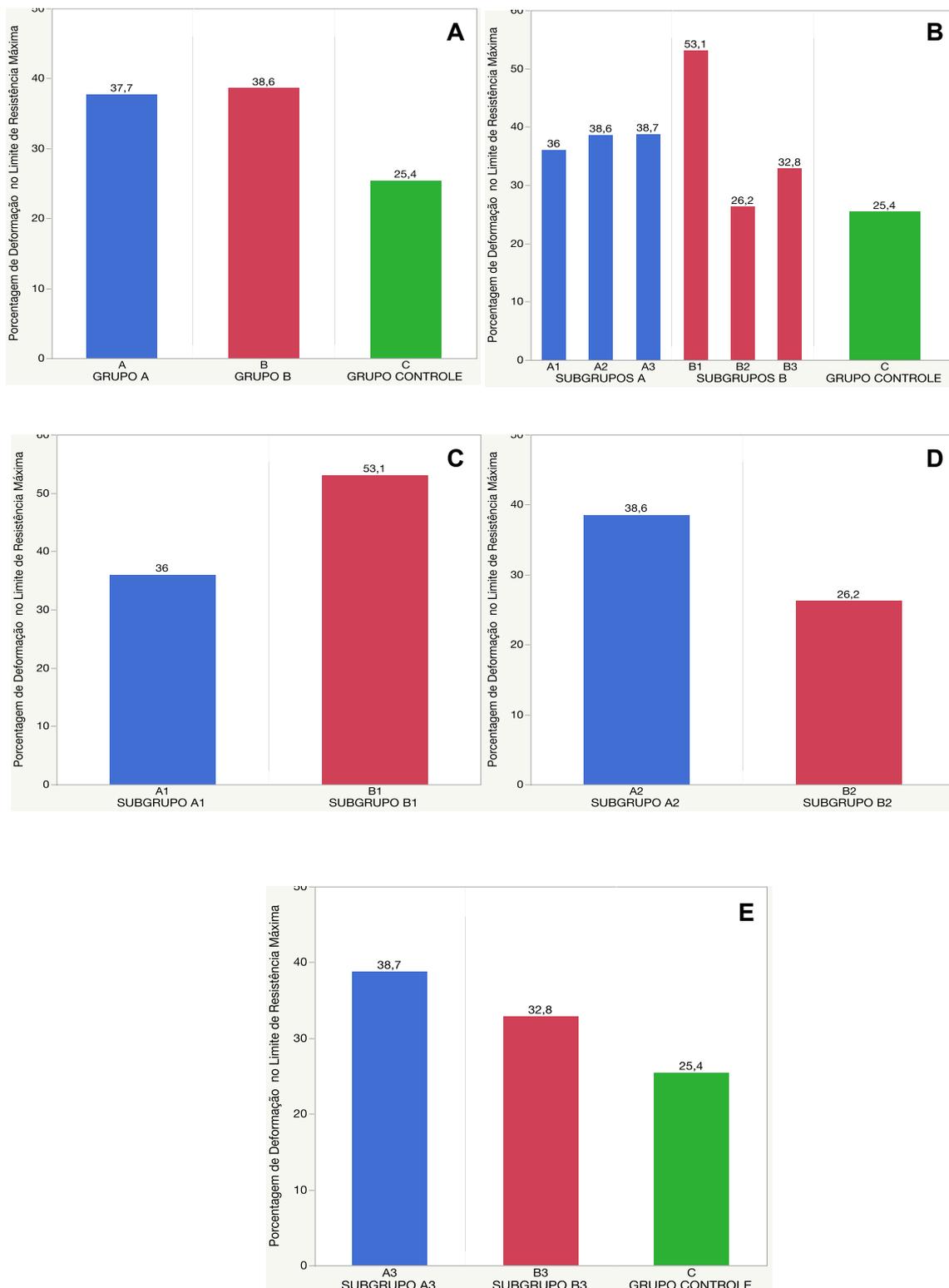
5.2.11 Análise dos dados para porcentagem de deformação no limite da resistência máxima

No Gráfico 16 foram demonstradas as médias para a porcentagem de deformação no limite da resistência máxima, para cada grupo (**Gráfico 16-A**) e subgrupo (**Gráfico 16-B**), assim como a comparação das médias entre os grupos para cada tempo de seguimento, com 10 (**Gráfico 16-C**), 12 (**Gráfico 16-D**) e 16 semanas (**Gráfico 16-E**).

Não foi encontrada diferença entre os grupos A, B e controle em nenhum dos tempos de seguimento, com 10, 12 e 16 semanas.

Também não houve diferença na comparação dentro dos grupos, nos diferentes tempos de seguimento.

Gráfico 16 – Porcentagem de Deformação no Limite da Resistência Máxima: médias para cada grupo (A) e subgrupo (B), e comparação das médias entre os grupos para cada tempo de seguimento, com 10 (C), 12 (D) e 16 semanas (E)



5.2.12 Análise dos dados para tensão no limite da resistência máxima

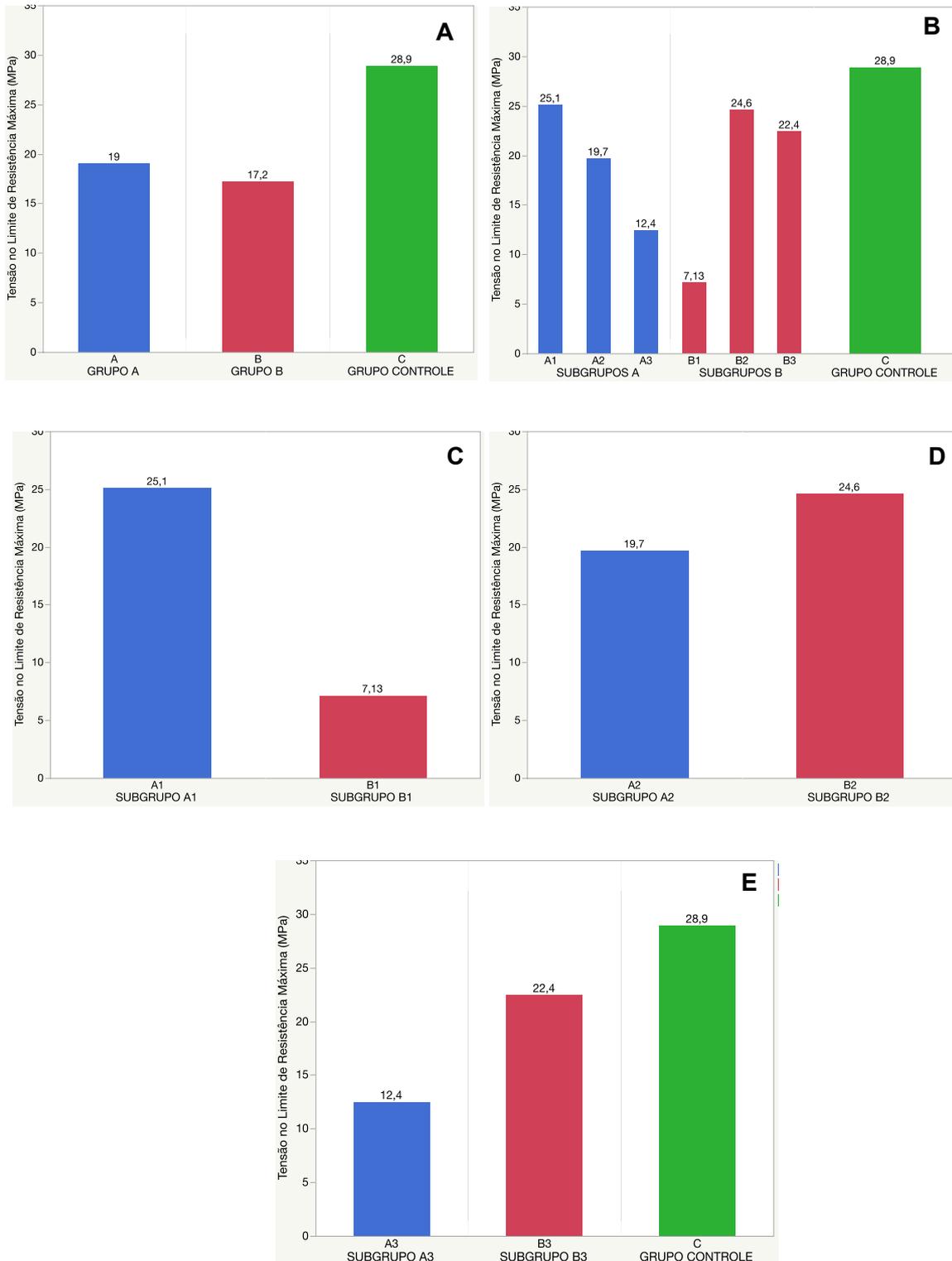
No Gráfico 17 foram demonstradas as médias da tensão no limite da resistência máxima, para cada grupo (**Gráfico 17-A**) e subgrupo (**Gráfico 17-B**), assim como a comparação das médias entre os grupos para cada tempo de seguimento, com 10 (**Gráfico 17-C**), 12 (**Gráfico 17-D**) e 16 semanas (**Gráfico 17-E**).

Houve diferença significativa entre os grupos A, B e controles, na comparação da tensão no limite da resistência máxima, na 16^a semana de seguimento ($p=0,022$). Na análise detalhada, os valores foram significativamente menores nos animais do subgrupo A3, quando comparados aos controles ($p=0,020$). Não houve diferença entre os outros subgrupos.

Também foi encontrada diferença significativa entre os grupos A e B no seguimento de 10 semanas, com valores inferiores para o subgrupo B1 quando comparados ao subgrupo A1 ($p=0,008$). Não houve diferença na comparação entre os subgrupos A2 e B2, para a 12^a semana de seguimento.

Na comparação dentro dos grupos, nos diferentes tempos de seguimento, não houve diferença entre os subgrupos do grupo A. Já no grupo B, encontrou-se diferença significativa entre os subgrupos ($p=0,031$). Mais especificamente, na comparação detalhada, os valores do subgrupo B1 eram significativamente menores do que do subgrupo B2 ($p=0,014$). Não houve diferença na comparação entre os outros subgrupos.

Gráfico 17 – Tensão no Limite da Resistência Máxima: médias para cada grupo (A) e subgrupo (B), e comparação das médias entre os grupos para cada tempo de seguimento, com 10 (C), 12 (D) e 16 semanas (E)



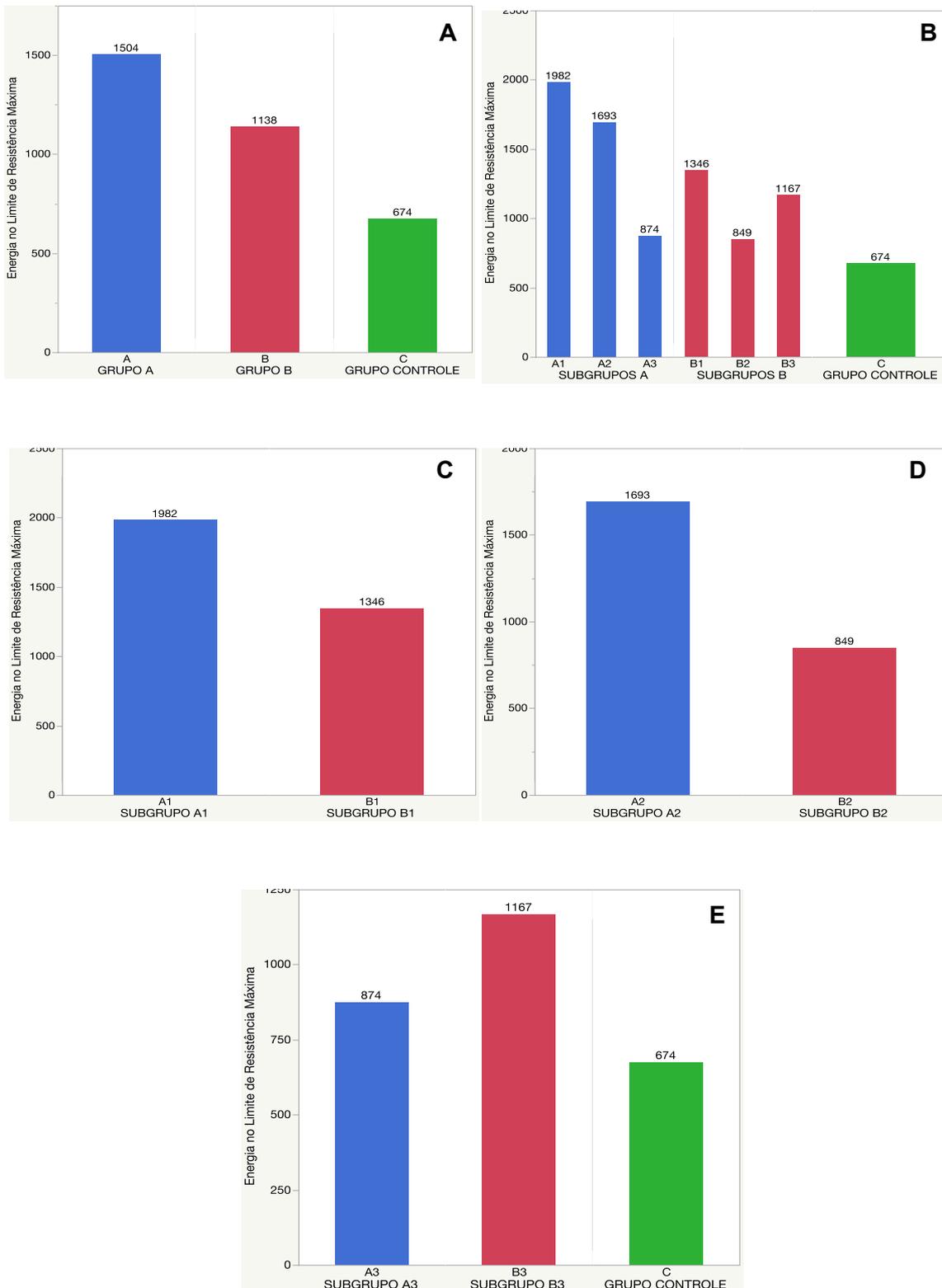
5.2.13 Análise dos dados para energia no limite da resistência máxima

No Gráfico 18 foram demonstradas as médias da energia no limite da resistência máxima, para cada grupo (**Gráfico 18-A**) e subgrupo (**Gráfico 18-B**), assim como a comparação das médias entre os grupos para cada tempo de seguimento, com 10 (**Gráfico 18-C**), 12 (**Gráfico 18-D**) e 16 semanas (**Gráfico 18-E**).

Não foi encontrada diferença entre os grupos A, B e controle em nenhum dos tempos de seguimento, com 10, 12 e 16 semanas.

Também não houve diferença na comparação dentro dos grupos, nos diferentes tempos de seguimento.

Gráfico 18 – Energia no Limite da Resistência Máxima: médias para cada grupo (A) e subgrupo (B), e comparação das médias entre os grupos para cada tempo de seguimento, com 10 (C), 12 (D) e 16 semanas (E)



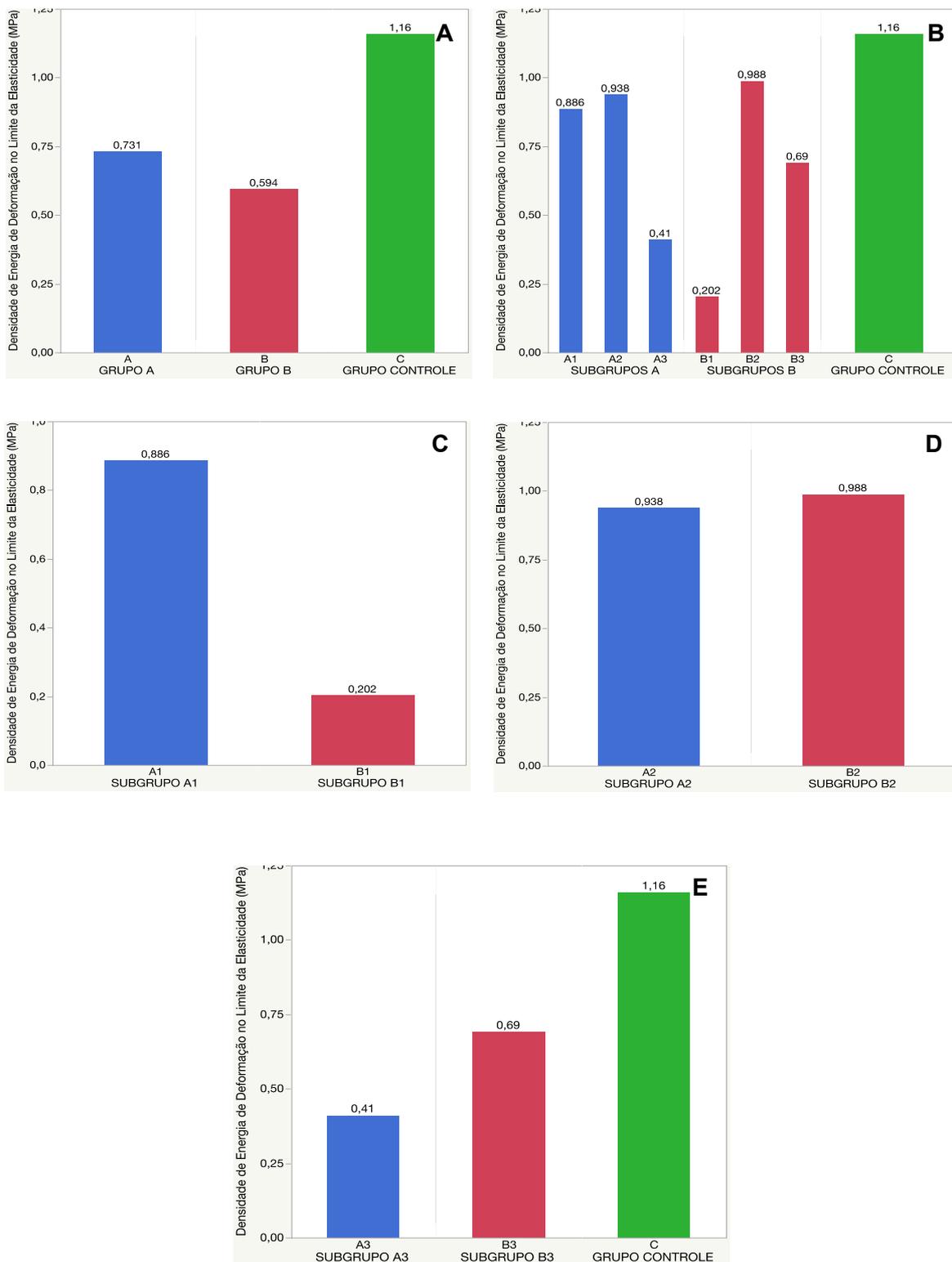
5.2.14 Análise dos dados para densidade de energia de deformação no limite da elasticidade

No Gráfico 19 foram demonstradas as médias da densidade de energia de deformação no limite da elasticidade, para cada grupo (**Gráfico 19-A**) e subgrupo (**Gráfico 19-B**), assim como a comparação das médias entre os grupos para cada tempo de seguimento, com 10 (**Gráfico 19-C**), 12 (**Gráfico 19-D**) e 16 semanas (**Gráfico 19-E**).

Houve diferença significativa entre os grupos A e B para densidade de energia de deformação no limite da elasticidade na 10^a semana de seguimento ($p=0,015$), sendo que os valores para o subgrupo B1 eram significativamente menores que os do subgrupo A1. Não foi encontrada diferença entre os grupos na 12^a e 16^a semanas de seguimento.

Na comparação dentro dos grupos, nos diferentes tempos de seguimento, não houve diferença entre os subgrupos do grupo A. Já no grupo B, encontrou-se diferença significativa entre os subgrupos ($p=0,017$). Mais especificamente, na comparação detalhada, os valores do subgrupo B1 eram significativamente menores do que do subgrupo B2 ($p=0,014$). Não houve diferença na comparação entre os outros subgrupos.

Gráfico 19 – Densidade de Energia de Deformação no Limite da Elasticidade: médias para cada grupo (A) e subgrupo (B), e comparação das médias entre os grupos para cada tempo de seguimento, com 10 (C), 12 (D) e 16 semanas (E)



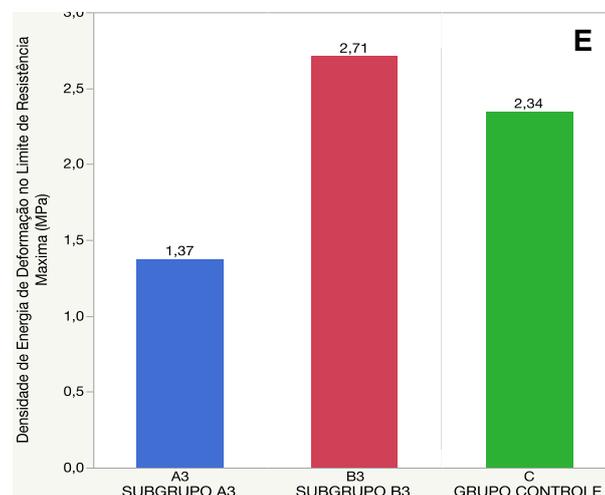
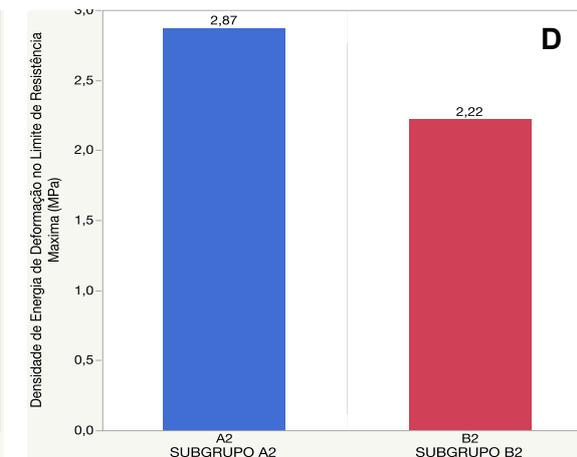
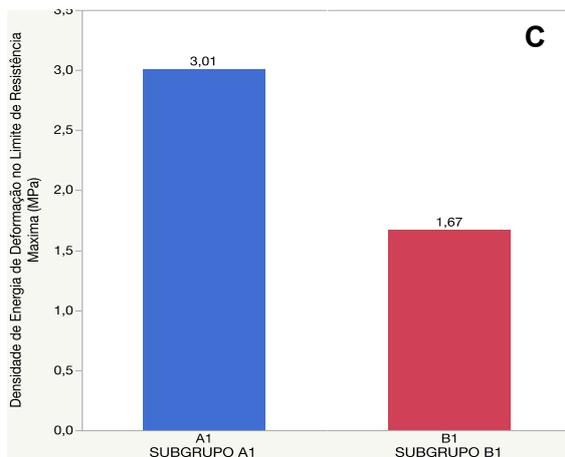
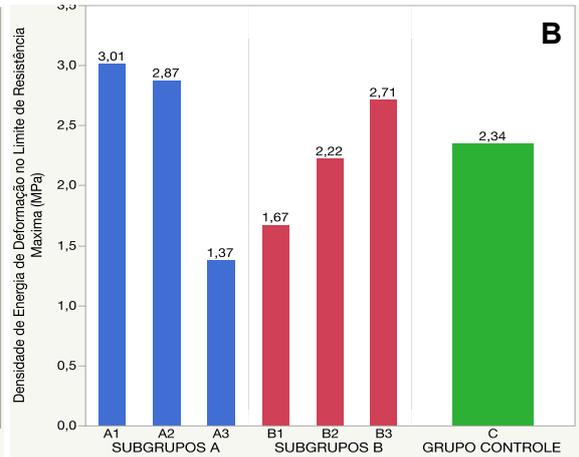
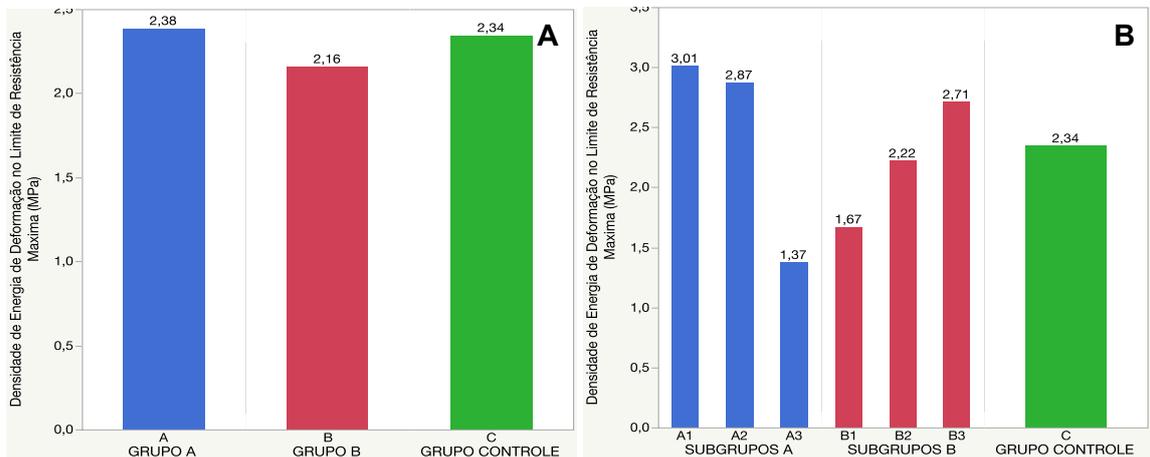
5.2.15 Análise dos dados para densidade de energia de deformação no limite da resistência máxima

No Gráfico 20 foram demonstradas as médias da densidade de energia de deformação no limite da resistência máxima, para cada grupo (**Gráfico 20-A**) e subgrupo (**Gráfico 20-B**), assim como a comparação das médias entre os grupos para cada tempo de seguimento, com 10 (**Gráfico 20-C**), 12 (**Gráfico 20-D**) e 16 semanas (**Gráfico 20-E**).

Não foi encontrada diferença entre os grupos A, B e controle em nenhum dos tempos de seguimento, com 10, 12 e 16 semanas.

Na comparação dentro dos grupos, nos diferentes tempos de seguimento, houve diferença limítrofe, aparentemente significativa, entre os subgrupos do grupo A ($p=0,049$). No entanto, na análise detalhada a posteriori essa diferença não se confirmou e não foram encontradas diferenças entre os subgrupos A1 e A2 ($p=1,00$), A1 e A3 ($p=0,076$), e A2 e A3 ($p=0,142$). Também não foram encontradas diferenças entre os subgrupos do grupo B.

Gráfico 20 – Densidade de Energia de Deformação no Limite da Resistência Máxima: médias para cada grupo (A) e subgrupo (B), e comparação das médias entre os grupos para cada tempo de seguimento, com 10 (C), 12 (D) e 16 semanas (E)



6. *Discussão*

6 DISCUSSÃO

A tendinopatia é uma doença comum. Aproximadamente 8% da população e 42% dos corredores de média e longa distância desenvolvem tendinopatia do tendão do calcâneo antes dos 45 anos de idade (**Kvist, 1994; Rolf e Movin, 1997; Kujala et al., 2005**). As consequências dessa doença incluem dor, incapacidade física e mental, interrupção na prática de atividades físicas esportivas, aposentadoria precoce e custos aumentados com a saúde (**Kvist, 1994; Józsa e Kannus, 1997; Aström, 1998; Alfredson e Lorentzon, 2000**). Apesar da importante prevalência da tendinopatia, sua fisiopatologia não é totalmente elucidada (**Riley, 2004**).

Como amostras teciduais humanas em estágios iniciais da TP são praticamente indisponíveis e os estudos clínicos não permitem controle adequado do desenvolvimento da doença, modelos experimentais animais são necessários para o estudo da sua fisiopatologia, prevenção e tratamento (**Carpenter et al., 1999; 2004; Warden, 2007; Lake et al., 2008; Dirks e Warden; Lui et al., 2011**).

Os modelos animais de TP induzida incluem os de indução por sobrecarga mecânica (**Glazebrook et al., 2008; Silva et al., 2011**), que simulam fator de risco extrínseco da doença (**Stanish et al., 1985; Hering e Nilson, 1987; Archambault et al., 1995; Kannus; Selvanetti et al., 1997; Kjaer, 2001**), e os de indução por sobrecarga química, que simulam fatores de risco intrínsecos da patologia e utilizam substâncias como citocinas (**Stone et**

al., 1999), prostaglandinas (Sullo et al., 2001; Khan et al., 2005; Ferry et al., 2012), fluoroquinolonas (Kato et al., 1995; Kashida e Kato, 1997), ou colagenase, sendo esta a mais utilizada na literatura (Silver et al., 1983; Williams et al., 1984; Foland et al., 1992; Soslowsky et al., 1996; Davidson et al., 1997; Stone et al., 1999; Marsolais et al., 2001; Dahlgren et al., 2002; Chen et al., 2004; Dahlgren et al., 2006b; Godbout et al., 2006; Lui et al.; Fu et al., 2009; Lui et al., 2010a,b; Chen et al., 2011; Marcos et al.; Yoo et al., 2012; Rui et al.; Shah et al.; Casalechi et al.; Tsai et al., 2013; Solchaga et al.; Machova Urdzikova et al.; Chen et al., 2014; Kamineni et al., 2015; Orfei et al., 2016).

Os modelos animais de TP induzida por injeções intratendíneas de colagenase possuem a vantagem da rapidez e efetividade de sua aplicação, com alterações teciduais condizentes com a patologia. No entanto, os achados são induzidos agudamente, o que não reproduz a evolução progressiva da TP nos humanos (Dirks e Warden 2011; Lui et al., 2011). A colagenase bacteriana do tipo I é a mais utilizada na literatura, e demonstra sucesso na indução de tendinopatia em diversos modelos animais. A enzima é empiricamente injetada em dose única de 0,3 a 0,5 miligramas (Davidson et al., 1997; Dahlgren et al., 2002; Godbout et al., 2006; Fu et al., 2009; Lui et al., 2009a,b, 2010b; Rui et al.; Shah et al., 2013; Solchaga et al., 2014). Orfei et al. (2016) são os primeiros a comparar achados histológicos na aplicação de doses únicas de 0,1mg e 0,3mg da mesma enzima. No entanto, até o presente momento, não existem estudos que avaliem o papel de múltiplas e consecutivas injeções da enzima colagenase.

A aplicação seriada de menores doses da enzima, quando comparadas a injeções únicas e de maior dose, pode induzir alterações tendíneas mais progressivas e duradouras, e reproduzir de maneira mais acurada as alterações crônicas da TTC dos humanos e do modelo de TP em contínuo proposto por Cook e Purdam (**Cook e Purdam, 2009; Cook et al., 2016**). O presente estudo tinha o objetivo de comparar os resultados, em diferentes momentos de seguimento (10, 12 e 16 semanas), da avaliação biomecânica e histológica de um novo modelo animal de tendinopatia do tendão do calcâneo, induzido por três injeções seriadas de baixa dose da colagenase (0,1mg), com o modelo mais utilizado na literatura, induzido por injeção única de maior dose (0,3mg) e com os animais controles.

Decidiu-se pela utilização de coelhos no modelo experimental pela notória similaridade anatômica do tendão do calcâneo desses animais com o tendão dos humanos (**Nisbet, 1960**) e também pela maior dimensão do tendão nos coelhos, quando comparada a outros animais laboratoriais de menor porte, o que proporcionou mais facilidade na realização das injeções intratendíneas e coleta de maior quantidade de amostras teciduais para análise. Utilizou-se critérios de inclusão rígidos para aumentar a homogeneidade da amostra e reduzir o número necessário de animais.

Optou-se pela realização de injeção de colagenase em ambos os membros pélvicos, abdicando-se da utilização de um suposto membro pélvico contralateral sadio como controle, devido à existência de relatos na literatura do desenvolvimento de TTC no membro contralateral, apesar da realização de indução unilateral da TP, por alteração no padrão de marcha e distribuição de peso do animal e pela atuação de mecanismo neuronal central (**Andersson et**

al., 2011). Também foi considerado o fato de que a indução da tendinopatia em apenas um dos membros pélvicos impossibilitaria a análise biomecânica e anatomopatológica no mesmo TC.

Utilizou-se o grupo controle submetido a três injeções seriadas de solução fisiológica a 0,9% de NaCl. Esse grupo de estudo objetivava avaliar a atuação do trauma induzido pelos procedimentos cirúrgicos e injeções consecutivas na possível indução da TTC. Em 1999, **Stone et al.** avaliam a ação de injeção única de solução fisiológica do TC de coelhos e demonstram que os achados histológicos após 14 dias de seguimento eram compatíveis com os de um tendão normal, estando algumas amostras com pequena elevação do número de tenócitos na região do trajeto da agulha utilizada para a injeção. Tais achados são reproduzidos por outros autores (**Lui et al., 2009a,b; Orfei et al., 2016**).

O aminoglicosídeo gentamicina foi escolhido como antibioticoterapia perioperatória. Diferentemente dos antibióticos da classe das quinolonas (**Movin et al., 1997a; van der Linden et al., 2001**), frequentemente utilizados em procedimentos cirúrgicos de animais, não há na literatura descrição de eventual associação entre o uso dos aminoglicosídeos com o desenvolvimento de TP.

No manejo da sintomatologia dolorosa perioperatória dos animais, decidiu-se pela utilização isolada de analgésicos e pela não administração de drogas anti-inflamatórias que poderiam alterar a indução da TTC, uma vez que a participação de mediadores inflamatórios na fisiopatologia da doença já está comprovada (**Almekinders et al., 1993; Stone et al.; Langberg et al., 1999;**

Fu et al., 2002; Zhang et al., 2003; Sullo et al., 2001; Khan et al., 2005; Zhang e Wang 2010; Ferry et al., 2012).

Com relação ao tempo de seguimento e momentos de eutanásia, a intenção do estudo era avaliar resultados a longo prazo, compatíveis com a TP crônica. Estudos prévios demonstram que após quatro semanas da injeção intratendínea de colagenase ocorre processo degenerativo no tendão (**Stone et al., 1999; Dahlgren et al., 2002; Hsu et al., 2004; Chen et al., 2011**). Após oito a 12 semanas de seguimento, há uma tentativa de reparo do tendão, com melhora parcial das características anatomopatológicas e biomecânicas tendíneas (**Soslowsky et al., 1996; Dahlgren et al., 2006b; Lui et al., 2009; Fu et al., 2009**) semelhante aos achados do modelo de TP em contínuo (**Cook e Purdam, 2009; Cook et al., 2016**), entretanto, após 12 a 16 semanas de seguimento o processo degenerativo volta a progredir (**Stone et al., 1999; Lui et al.; Fu et al., 2009; Lui et al., 2010a,b; Rui et al., 2013**). Para avaliar tais alterações, foram escolhidos para o presente estudo os tempos de seguimento de 10, 12 e 16 semanas do início do processo patológico. Para os controles, conforme descrito na literatura, foi utilizado tempo de seguimento único com 16 semanas de seguimento, evitando assim o sacrifício desnecessário de animais controles (**Lui et al., 2009**).

Para a avaliação das alterações anatomopatológicas foi escolhido o escore histológico de TP de *Bonar* (**Khan et al., 1996**). Tal escore é amplamente utilizado na literatura e permite a avaliação das principais alterações teciduais da TP (**Khan et al., 1999; Cook et al., 2004**). Foi seguida a sistemática de avaliação do escore proposta por **Fearon et al. (2014)**,

objetivando-se a padronização e otimização na graduação dos achados patológicos teciduais.

Na avaliação biomecânica, para a apreensão adequada do corpo de prova durante os ensaios, foram utilizadas duas diferentes garras. A primeira, de configuração cilíndrica, continha o osso calcâneo no seu interior, impedindo o deslizamento da região distal do corpo de prova. Já para a apreensão da região proximal do corpo de prova, composta por tecidos moles da junção músculo-tendínea do complexo gastrocnêmio-sóleo, utilizou-se uma garra senoidal criogênica que permitia o congelamento de sua porção muscular, minimizando o deslizamento. Tal mecanismo associado ao controle de temperatura da região tendínea do corpo de prova com um termômetro digital é descrito e utilizado com sucesso na literatura (**Lui et al., 2009; Chen et al., 2011; Machova et al., 2014**).

A avaliação dos desfechos histológicos e biomecânicos tendo sido cega foi fundamental na redução da interferência da opinião do observador sobre o resultado do estudo.

Os desfechos foram considerados primários na 16^a semana de seguimento pelo maior interesse na avaliação dos resultados em longo prazo, que pudessem demonstrar ou descartar a cronificação do processo patológico da tendinopatia. Os animais do grupo controle foram submetidos à eutanásia apenas após 16 semanas de seguimento e, desta maneira, serviram como verdadeiros controles apenas para comparações a animais dos Grupos A e B com mesmo tempo de seguimento (Subgrupos A3 e B3). Os desfechos na 10^a e 12^a semanas de seguimento foram considerados secundários e objetivavam demonstrar possível reversão parcial dos achados de TP, conforme descrito na

literatura (**Soslowsky et al., 1996; Dahlgren et al., 2006; Lui et al., 2009; Fu et al., 2009; Cook e Purdam, 2009; Cook et al., 2016**).

Na análise histológica pelo escore de Bonar, foram encontradas diferenças entre os grupos experimentais na 10^a e 12^a semanas de seguimento, e entre os grupos experimentais e os controles na 16^a semana. Após 10 semanas, os achados teciduais de TP eram mais pronunciados nos animais submetidos à injeção única (Grupo B). Tal resultado demonstrava que a realização de injeção de dose aumentada da enzima colagenase (0,3mg) levava à alteração histológica mais intensa no seguimento mais precoce. No entanto, os achados patológicos nesses tendões retrocederam após 12 semanas e se mantiveram reduzidos no seguimento de 16^a semana, porém, não retornaram aos valores de normalidade quando comparados aos controles. Esses resultados para o grupo submetido à injeção única de 0,3mg de colagenase são similares ao que se reporta na literatura para seguimentos de 10 e 12 semanas, inicialmente com maiores escores, e subsequente tentativa de reparo tecidual e melhora do escore em torno de 12 semanas (**Soslowsky et al., 1996; Dahlgren et al., 2006; Lui et al., 2009; Fu et al., 2009**). No entanto, diferentemente do que se é descrito, não foi encontrada na 16^a semana intensificação do processo patológico de TP (**Stone et al., 1999; Lui et al.; Fu et al., 2009; Lui et al., 2010a,b; Rui et al., 2013**). Os escores se mantiveram alterados quando comparados a controles, porém sem diferença significativa com os escores da 12^a semana de seguimento. Já na avaliação específica dos animais do Grupo A, submetidos a três injeções seriadas de menor dose de colagenase (0,1mg), as alterações histológicas na 12^a semana eram significativamente menos pronunciadas do que na 10^a e 16^a semanas de

seguimento, o que demonstrava de maneira mais adequada a tentativa de reparo cicatricial após 12 semanas, porém, com progressão das alterações após 16 semanas e diferença significativa quando comparadas aos animais do Grupo B e aos controles.

Em resumo, os achados histológicos encontrados para animais do Grupo A reproduziram de maneira mais acurada o processo patológico de tendinopatia em contínuo, com alterações iniciais menos pronunciadas (10 semanas), tentativa de reparo (12 semanas) e posterior intensificação e cronificação da TP (16 semanas) **(Cook e Purdam, 2009; Cook et al., 2016)**.

Na análise biomecânica para a 16^a semana de seguimento foi encontrada diferença significativa para os valores de área de secção transversa entre os grupos experimentais, assim como entre os grupos experimentais e os controles. Os tendões do grupo submetido a três injeções seriadas de menor dose de colagenase (Grupo A) possuíam valores médios de área de secção transversa aproximadamente duas vezes maior que os do grupo submetido à injeção única de colagenase (Grupo B), demonstrando maior alteração e cronificação do processo patológico de TP, e duas vezes e meia maior que os valores para os controles. Os valores para animais do Grupo B também diferiram significativamente dos controles, de maneira similar aos relatos na literatura TP **(Stone et al., 1999; Chen et al., 2011; Marcos et al., 2012; Shah et al., 2013)**.

Na 16^a semana de seguimento também foram encontradas diferenças significativas no módulo de elasticidade e tensão no limite da elasticidade e da resistência máxima, apenas para a comparação entre os animais submetidos às injeções seriadas de colagenase (Grupo A) e controles, com valores

significativamente menores no grupo experimental. Apesar dos resultados para esses desfechos terem demonstrado tendência a menores valores para animais do Grupo A quando comparados aos do Grupo B, e do grupo Grupo B quando comparados aos controles, não houve confirmação estatística.

Também na 16^a semana, os desfechos rigidez e força no limite da elasticidade e da resistência máxima também demonstraram tendência a menores valores nos animais dos grupos experimentais em relação aos controles, e no Grupo A quando comparado ao Grupo B. No entanto, não houve diferença estatística significativa. Os achados do presente estudo são similares aos descritos na literatura, que demonstram em diversos tempos de seguimento a alteração destes parâmetros biomecânicos de tendões injetados por dose única de colagenase (**Stone et al., 1999; Chen et al., 2004; Godbout et al., 2006; Chen et al., 2011; Marcos et al., 2012; Shah et al., 2013; Solchaga et al.; Machova Urdzikova et al., 2014**). Porém, é a primeira vez que foi demonstrada a mesma tendência para animais submetidos às injeções seriadas de menor dose da mesma enzima. Apesar de não ter sido encontrada diferença estatística significativa, é importante se considerar que o número de animais em cada subgrupo era limítrofe para um poder estatístico adequado do estudo e o fato de terem ocorrido perdas adicionais de animais e exclusão de amostra teciduais por má qualidade do preparo e impossibilidade de realização do ensaio biomecânico, levaram ao prejuízo da análise estatística. É possível que se o número de animais por Grupo e Subgrupo fosse maior, seriam encontradas diferenças estatisticamente significativas.

Ainda na 16^a semana, também foram encontradas tendências para alterações mais pronunciadas nos animais dos grupos experimentais, quando

comparados aos controles, e nos coelhos do Grupo A, quando comparados aos do Grupo B para os outros desfechos biomecânicos avaliados, incluindo deformação, porcentagem de deformação, energia e densidades de deformação em ambos os limites da elasticidade e da resistência máxima. No entanto, não houve diferença estatística para nenhuma das comparações. Esses achados foram similares ao que se reporta na literatura para comparações entre tendões injetados por dose única de colagenase e controles (**Stone et al., 1999**).

Na análise dos desfechos biomecânicos na 12^a semana, a única diferença significativa encontrada entre os grupos experimentais foi a tensão no limite da elasticidade, que demonstrou valores médios significativamente menores nos animais do Grupo A, quando comparados aos do Grupo B.

Após 10 semanas de seguimento, houve diferença significativa entre os grupos experimentais para nove dos 15 desfechos biomecânicos avaliados, com alterações mais pronunciadas nos animais submetidos à injeção única e de maior dose de colagenase (Grupo B). Alterações incluíam maior área de secção transversa e menores rigidez, módulo de elasticidade, força e tensão nos limites da elasticidade e da resistência máxima, energia no limite da resistência máxima e densidade de energia de deformação no limite da elasticidade. Tais achados demonstraram que a aplicação da maior dose da enzima colagenase levou a alterações teciduais mais intensas e agudas, que refletiram nos achados biomecânicos do seguimento de tempo mais precoce, após 10 semanas.

Estes achados biomecânicos mais intensos encontrados nos animais do Grupo B para o seguimento mais precoce demonstraram recuperação

significativa na 12^a semana para área de secção transversa, módulo de elasticidade, tensão no limite da elasticidade e da resistência máxima e densidade de deformação no limite da elasticidade. Tais resultados vão ao encontro dos dados presentes na literatura, com cicatrização parcial e possível recuperação de propriedades biomecânicas de tendões submetidos à injeção única e de maior dose de colagenase após 12 semanas (**Stone et al., 1999; Chen et al., 2004**). Os outros parâmetros biomecânicos também demonstraram tendência de recuperação com 12 semanas para animais do Grupo B, tendência esta mantida após 16 semanas, porém sem diferença estatística significativa. Assim, os achados biomecânicos para os animais do Grupo B demonstraram resultados condizentes aos encontrados na análise histológica, novamente não havendo intensificação significativa do processo patológico de TP na 16^a semana.

Na avaliação dos resultados biomecânicos para o Grupo A nos diferentes tempos de seguimento, com 10, 12 e 16 semanas, a única diferença significativa encontrada foi para a densidade de energia de deformação no limite da resistência máxima, com valor médio significativamente menor na 16^a semana, em relação à 12^a semana. No entanto, foi demonstrada tendência à intensificação progressiva de alterações das propriedades biomecânicas dos tendões submetidos a três injeções seriadas de menor dose de colagenase, alterações estas condizentes com TP em contínuo, e diferentes da alteração precoce e efêmera encontrada nos animais submetidos à injeção única e de maior dose da enzima. Novamente, a tendência de alterações biomecânicas progressivas nos animais do Grupo A poderia ter demonstrado diferenças

estatisticamente significativas caso tivesse sido utilizada uma maior amostragem, com maior número de animais por subgrupo.

Em resumo, após 10 semanas as alterações precoces das propriedades biomecânicas foram mais intensas no Grupo B, em que os animais foram submetidos à injeção única e de maior dose de colagenase. Essas alterações demonstraram recuperação nos seguimentos mais tardios com 12 e 16 semanas. Já os animais do Grupo A injetados com doses baixas e seriadas da mesma enzima apresentaram alterações precoces de menor intensidade que progressivamente se intensificaram nos seguimentos com 12 e 16 semanas, sendo que nesse último, houve diferença significativa de alguns dos parâmetros na comparação com controles e tendência a alterações mais pronunciadas na comparação com animais do Grupo B.

A avaliação combinada dos achados biomecânicos e histológicos demonstraram que a aplicação seriada de menores doses da enzima colagenase no tendão calcâneo de coelhos, quando comparadas às injeções únicas de maior dose e aos controles, induziram alterações tendíneas mais progressivas e duradouras, e reproduziram de maneira mais acurada as alterações crônicas da tendinopatia em humanos. Este novo modelo animal de tendinopatia induzida pode representar uma melhor opção para o estudo da tendinopatia do tendão do calcâneo. Os resultados encontrados possibilitam a realização de novos estudos no futuro, com objetivo de melhor elucidação da fisiopatologia da doença e busca de melhores possibilidades terapêuticas.

7. *Conclusão*

7 CONCLUSÃO

O novo modelo animal de tendinopatia do tendão do calcâneo induzida por três injeções seriadas de baixa dose da colagenase demonstrou:

- Na 10^a semana de seguimento:
 - Alterações histológicas e biomecânicas significativamente menos intensas que no modelo submetido à injeção única de maior dose da enzima.
- Na 12^a semana de seguimento:
 - Propriedades biomecânicas similares e alterações histológicas significativamente mais intensas que no modelo submetido à injeção única de maior dose da enzima.
- Na 16^a semana de seguimento:
 - Alterações histológicas e biomecânicas significativamente mais intensas que no grupo controle e no modelo submetido à injeção única de maior dose da enzima.

8. *Anexos*

ANEXO 1 – Aprovação do protocolo de pesquisa pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEP-FMUSP)



A CEUA do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de **23/05/2012**, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **148/12** intitulado: **“JUNÇÃO ÓSTEO-TENDÍNEA: ESTUDO BIOMECÂNICO, HISTOLÓGICO E MOLECULAR EM COELHOS.”** que utilizará **44** animais da espécie **Coelhos Nova Zelândia**, apresentado pelo **Departamento de ORTOPEDIA E TRAUMATOLOGIA**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Olavo Pires de Camargo

Pesquisador (a) Executante: César de César Netto

CEP-FMUSP, 25 de Maio de 2012.

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

ANEXO 2 – Certificado de apresentação do tipo pôster no Congresso Europeu de Pé e Tornozelo (European Foot and Ankle Society - EFAS), Berlim, Alemanha, 23 a 25 de Junho de 2016



Foot International 2016
23rd ~25th June 2016
Berlin, Germany

This is to Certify that

Dr. med C. de Cesar Netto

Participated with a Poster
*A new Animal Model of Induced Achilles Tendinopathy:
Consecutive low dose injections of collagenase
at Foot International 2016*

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Martinus Richter'.

Dr. med Martinus Richter
EFAS President & Local Host

ANEXO 3 – Certificado de apresentação oral no Congresso Americano de Pé e Tornozelo (American Orthopaedic Foot and Ankle Society - AOFAS), Toronto, Canadá, 20 a 23 de Julho de 2016



AMERICAN ORTHOPAEDIC
FOOT & ANKLE SOCIETY®

RECONSTRUCTION • SPORTS MEDICINE • TRAUMA • TECHNOLOGY

Suite 220
9400 West Higgins Road
Rosemont, IL 60018-4975

800-235-4855 or 847-698-4654 (outside US)
847-692-3315 (fax)
aofasinfo@aofas.org



www.aofas.org
www.aofas.org/foundation
www.FootCareMD.org

To Whom it May Concern:

Dr. Cesar de Cesar Netto was an author of the following electronic posters (ePosters) and scientific papers presented during the Annual Meeting of the American Orthopaedic Foot & Ankle Society (AOFAS), July 20-23, 2016 in Toronto, Ontario, Canada.

Metal Artifact Reduction MRI for Sagittal Balance Evaluation of Total Ankle Arthroplasty

Cesar de Cesar Netto, MD, Eric J. Dein, BS, Lucas F. Fonseca, MD, Apisan Chinanuvathana, MD, Moses Lee, MD, Hanci Zhang, BA, Talal A. Zahoor, MBBS, Michael Aynardi, MD, Lew C. Schon, MD, Jan Fritz, MD

Flexible Adult Acquired Flatfoot Deformity: Comparison Between Weightbearing and Nonweightbearing Cone-Beam CT Examinations

Cesar de Cesar Netto, MD, Shadpour Demehri, Eric J. Dein, BS, Gaurav K. Thawait, MD, Hanci Zhang, BA, Lucas F. Fonseca, MD, Talal A. Zahoor, MBBS, Moses Lee, MD, Yi Guo, MD, James R. Ficke, MD, Lew C. Schon, MD

Interobserver Variability of Measurements for Flatfoot Deformity Using High Resolution Weightbearing Cone-Beam CT Examination According to Reader Experience

Cesar de Cesar Netto, MD, Shadpour Demehri, Eric J. Dein, BS, Hanci Zhang, BA, Gaurav K. Thawait, MD, Talal A. Zahoor, MBBS, Lucas F. Fonseca, MD, Moses Lee, MD, Eva U. Asomugha, MD, James R. Ficke, MD, Lew C. Schon, MD

Metal Artifact Reduction MRI of Total Ankle Arthroplasty

Cesar de Cesar Netto, MD, Lucas F. Fonseca, MD, Eric J. Dein, BS, Hanci Zhang, BA, Talal A. Zahoor, MBBS, Lew C. Schon, MD, Jan Fritz, MD

Tendinopathy Induced by Serial Low-Dose Collagenase Injections: A Novel Experimental Animal Model in the Achilles Tendon of Rabbits.

Cesar de Cesar Netto, MD, Cesar Augusto Martins Pereira, Alexandre Godoy-Santos, PhD, Francisco D. Oliveira Lima, Pedro A. Pontin, MD, Talal A. Zahoor, MBBS, Eric J. Dein, BS, Lew C. Schon, MD, Olavo P. Camargo, Tulio Fernandes, PhD

This activity has been planned and implemented in accordance with the accreditation requirements and policies of the **Accreditation Council for Continuing Medical Education (ACCME)**. The AOFAS is accredited by the ACCME to provide continuing medical education for physicians.

Sincerely,

Elaine M. Leighton, MPH, CAE
Deputy Executive Director

ANEXO 4 – Folha de rosto do termo de outorga do auxílio Fapesp, Processo 2013/25046-3



Para uso exclusivo de FAPESP
Processo: 2013/25046-3
Data impressão: 11/12/2015 15:29:13
Folha:
Volume:
Rubrica:

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO
TERMO DE OUTORGA E ACEITAÇÃO DE AUXÍLIOS
 PROCESSO 2013/25046-3

<p>Pelo presente instrumento, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, com sede na Rua Pio XI, nº 1.500, Alto da Lapa, São Paulo, Capital, inscrita no CNPJ/MF sob nº 43.828.151/0001-45, doravante denominada OUTORGANTE, por meio de seu Conselho Técnico-Administrativo, nos termos do Artigo 14, letra "b", da Lei Estadual nº 5.918, de 18 de outubro de 1960, concede ao OUTORGADO, a seguir qualificado, Auxílio para a realização do Projeto de Pesquisa a seguir especificado, nas instalações e com o apoio da INSTITUIÇÃO SEDE, de acordo com as especificações, cláusulas e condições descritas a seguir e nos Anexos, que passam a ser parte integrante deste Termo.</p>	
1. OUTORGADO:	Olavo Pires de Camargo CPF: 919.526.468-04 RG: 4693167-SSP/SP
2. Correspondência:	Rua Rio de Janeiro, 338 - 7 andar, Higienópolis, São Paulo/SP, CEP 01240-010 olapcama@uol.com.br
3. Instituição Sede:	Faculdade de Medicina/FM Universidade de São Paulo/USP
4. Projeto de Pesquisa:	JUNÇÃO ÓSTEO-TENDÍNEA: ESTUDO BIOMECÂNICO, HISTOLÓGICO E MOLECULAR EM COELHOS
5. Linha de Fomento:	Programas Regulares / Auxílios a Pesquisa / Projeto de Pesquisa / Projeto de Pesquisa - Regular
6. Área/Subárea:	Medicina Cirurgia
7. Coordenação:	Saúde I
8. Período da Vigência:	01/12/2015 a 30/11/2017
9. Relatórios Científicos:	30/11/2016, 30/12/2017
10. Prestações de Contas:	30/11/2016, 28/02/2018

9. *Referências*

9 REFERÊNCIAS

Abate M, Silbernagel KG, Siljeholm C, Di Iorio A, De Amicis D, Salini V, et al. Pathogenesis of tendinopathies: inflammation or degeneration? *Arthritis Res Ther.* 2009;11(3):235.

Agur AM, Ng-Thow-Hing V, Ball KA, Fiume E, McKee NH. Documentation and three-dimensional modelling of human soleus muscle architecture. *Clin Anat.* 2003;16(4):285–93.

Ahmed IM, Lagopoulos M, McConnell P, Soames RW, Sefton GK. Blood supply of the Achilles tendon. *J Orthop Res.* 1998;16(5):591-6.

Alexander RM, Bennet-Clark HC. Storage of elastic strain energy in muscle and other tissues. *Nature.* 1977;265(5590):114-7.

Alfredson H, Forsgren S, Thorsen K, Lorentzon R. In vivo microdialysis and immunohistochemical analyses of tendon tissue demonstrated high amounts of free glutamate and glutamate NMDAR1 receptors, but no signs of inflammation, in Jumper's knee. *J Orthop Res.* 2001;19(5):881–6.

Alfredson H, Ljung BO, Thorsen K, Lorentzon R. In vivo investigation of ECRB tendons with microdialysis technique--no signs of inflammation but high amounts of glutamate in tennis elbow. *Acta Orthop Scand.* 2000;71(5):475–9.

Alfredson H, Lorentzon R. Chronic Achilles tendinosis: recommendations for treatment and prevention. *Sports Med.* 2000;29(2):135-46.

Alfredson H, Ohberg L, Forsgren S. Is vasculo-neural ingrowth the cause of pain in chronic Achilles tendinosis? An investigation using ultrasonography and colour Doppler, immunohistochemistry, and diagnostic injections. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2003;11(5):334-8.

Alfredson H. The chronic painful Achilles and patellar tendon: research on basic biology and treatment. *Scand J Med Sci Sports.* 2005;15(4):252-9.

Almekinders LC, Banes AJ, Ballenger CA. Effects of repetitive motion on human fibroblasts. *Med Sci Sports Exerc.* 1993;25(5):603-7.

Ames PR, Longo UG, Denaro V, Maffulli N. Achilles tendon problems: not just an orthopaedic issue. *Disabil Rehabil.* 2008;30(20-22):1646-50.

Andersson G, Forsgren S, Scott A, Gaida JE, Stjernfeldt JE, Lorentzon R, et al. Tenocyte hypercellularity and vascular proliferation in a rabbit model of tendinopathy: contralateral effects suggest the involvement of central neuronal mechanisms. *Br J Sports Med.* 2011;45(5):399-406.

Archambault JM, Hart DA, Herzog W. Response of rabbit Achilles tendon to chronic repetitive loading. *Connect Tissue Res.* 2001;42(1):13-23.

Archambault JM, Wiley JP, Bray RC. Exercise loading of tendons and the development of overuse injuries. *Sports Med.* 1995;20(2):77–89.

Arnoczky SP, Lavagnino M, Egerbacher M. The mechanobiological aetiopathogenesis of tendinopathy: is it the over-stimulation or the under-stimulation of tendon cells? *Int J Exp Pathol.* 2007;88(4):217–26.

Arnoczky SP, Lavagnino M, Whallon JH, Hoonjan A. In situ cell nucleus deformation in tendons under tensile load; a morphological analysis using confocal laser microscopy. *J Orthop Res.* 2002;20(1):29-35.

Arya S, Kulig K. Tendinopathy alters mechanical and material properties of the Achilles tendon. *J Appl Physiol* (1985). 2010;108(3):670-5.

Åström M, Rausing A. Chronic Achilles tendinopathy. A survey of surgical and histopathologic findings. *Clin Orthop Relat Res.* 1995;(316):151–64.

Åström M, Westlin N. Blood flow in chronic Achilles tendinopathy. *Clin Orthop Relat Res.* 1994a;(308):166–72.

Åström M, Westlin N. Blood flow in the human Achilles tendon assessed by laser Doppler flowmetry. *J Orthop Res.* 1994b;12(2):246-52.

Åström M. Laser Doppler flowmetry in the assessment of tendon blood flow. *Scand J Med Sci Sports.* 2000;10(6):365–7.

Aström M. Partial rupture in chronic Achilles tendinopathy. A retrospective analysis of 342 cases. *Acta Orthop Scand*. 1998;69(4):404-7.

Asundi KR, King KB, Rempel DM. Evaluation of gene expression through qRT-PCR in cyclically loaded tendons: an in vivo model. *Eur J Appl Physiol*. 2008;102(3):265–70.

Backman C, Boquist L, Fridén J, Lorentzon R, Toolanen G. Chronic achilles paratenonitis with tendinosis: an experimental model in the rabbit. *J Orthop Res*. 1990;8(4):541–7.

Benjamin MM. Tendons are dynamic structures that respond to changes in exercise levels. *Scand J Med Sci Sports*. 2002;12(2):63–4.

Birch HL, Wilson AM, Goodship AE. The effect of exercise-induced localised hyperthermia on tendon cell survival. *J Exp Biol*. 1997;200(Pt 11):1703-8.

Bjur D, Alfredson HK, Forsgren S. The innervation pattern of the human Achilles tendon: studies of the normal and tendinosis tendon with markers for general and sensory innervation. *Cell Tissue Res*. 2005;320(1):201–6.

Burge AJ, Gold SL, Potter HG. Imaging of sports-related midfoot and forefoot injuries. *Sports Health*. 2012;4(6):518-34.

Burssens A, Forsyth R, Bongaerts W, Jagodzinski M, Mahieu N, Praet M, et al. Arguments for an increasing differentiation towards fibrocartilaginous components in midportion Achilles tendinopathy. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2013;21(6):1459-67.

Butler DL, Grood ES, Noyes FR, Zernicke RF. Biomechanics of ligaments and tendons. *Exerc Sport Sci Rev.* 1978;6:125–81.

Canoso JJ, Liu N, Traill MR, Runge VM. Physiology of the retrocalcaneal bursa. *Ann Rheum Dis.* 1988;47(11):910-2.

Carl T, Barret SL. Cadaveric assessment of the gastrocnemius aponeurosis to assist in the pre-operative planning for two-portal endoscopic gastrocnemius recession (EGR). *The Foot.* 2005;15(3):137–40.

Carpenter JE, Hankenson KD. Animal models of tendon and ligament injuries for tissue engineering applications. *Biomaterials.* 2004;25(9):1715–22.

Carpenter JE, Thomopoulos S, Soslowky LJ. Animal models of tendon and ligament injuries for tissue engineering applications. *Clin Orthop Relat Res.* 1999;(367 Suppl):S296-311.

Carr AJ, Norris SH. The blood supply of the calcaneal tendon. *J Bone Joint Surg Br.* 1989;71(1):100–1.

Casalechi HL, Leal-Junior ECP, Xavier M, Silva JA, de Carvalho P de TC, Aimbire F, et al. Low-level laser therapy in experimental model of collagenase-induced tendinitis in rats: effects in acute and chronic inflammatory phases. *Lasers Med Sci. Lasers Med Sci.* 2013;28(3):989-95.

Chao W, Deland JT, Bates JE, Kenneally SM. Achilles tendon insertion: an in vitro anatomic study. *Foot Ankle Int.* 1997;18(2):81-4.

Chen J, Yu Q, Wu B, Lin Z, Pavlos NJ, Xu J, et al. Autologous tenocyte therapy for experimental Achilles tendinopathy in a rabbit model. *Tissue Eng Part A.* 2011;17(15-16):2037–48.

Chen L, Liu J-P, Tang K-L, Wang Q, Wang G-D, Cai X-H, et al. Tendon derived stem cells promote platelet-rich plasma healing in collagenase-induced rat achilles tendinopathy. *Cell Physiol Biochem.* 2014;34(6):2153-68.

Chen YJ, Wang CJ, Yang KD, Kuo YR, Huang HC, Huang YT, et al. Extracorporeal shock waves promote healing of collagenase-induced Achilles tendinitis and increase TGF-beta1 and IGF-I expression. *J Orthop Res.* 2004;22(4):854-61.

Chhajed PN, Plit ML, Hopkins PM, Malouf MA, Glanville AR. Achilles tendon disease in lung transplant recipients: association with ciprofloxacin. *Eur Respir J.* 2002;19(3):469–71.

Clancy WG Jr, Neidhart D, Brand RL. Achilles tendonitis in runners: a report of five cases. *Am J Sports Med.* 1976;4(2):46-57.

Clement DB, Taunton JE, Smart GW. Achilles tendinitis and peritendinitis: etiology and treatment. *Am J Sports Med.* 1984;12(3):179-84.

Cook JL, Feller JA, Bonar SF, Khan KM. Abnormal tenocyte morphology is more prevalent than collagen disruption in asymptomatic athletes' patellar tendons. *J Orthop Res.* 2004;22(2):334-8.

Cook JL, Khan KM, Kiss ZS, Coleman BD, Griffiths L. Asymptomatic hypoechoic regions on patellar tendon ultrasound: A 4-year clinical and ultrasound followup of 46 tendons. *Scand J Med Sci Sports.* 2001;11(6):321-7.

Cook JL, Purdam CR. Is tendon pathology a continuum? A pathology model to explain the clinical presentation of load-induced tendinopathy. *Br J Sports Med.* 2009;43(6):409–16.

Cook JL, Rio E, Purdam CR, Docking SI. Revisiting the continuum model of tendon pathology: what is its merit in clinical practice and research? *Br J Sports Med.* 2016;50(19):1187-91.

Cummins EJ, Anson BJ, et al. The structure of the calcaneal tendon (of Achilles) in relation to orthopedic surgery, with additional observations on the plantaris muscle. *Surg Gynecol Obstet.* 1946;83:107-16.

Dahlgren LA, Mohammed HO, Nixon AJ. Expression of insulin-like growth factor binding proteins in healing tendon lesions. *J Orthop Res.* 2006a; 24(2):183–92.

Dahlgren LA, Mohammed HO, Nixon AJ. Temporal expression of growth factors and matrix molecules in healing tendon lesions. *J Orthop Res.* 2006b;23(1):84–92.

Dahlgren LA, van der Meulen MCH, Bertram JEA, Starrak GS, Nixon AJ. Insulin-like growth factor-I improves cellular and molecular aspects of healing in a collagenase-induced model of flexor tendinitis. *J Orthop Res.* 2002;20(5):910–9.

Danielson P, Alfredson HK, Forsgren S. Distribution of general (PGP 9.5) and sensory (substance P/CGRP) innervations in the human patellar tendon. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2006;14(2):125-32.

Davidson CJ, Ganion LR, Gehlsen GM, Verhoestra B, Roepke JE, Sevier TL. Rat tendon morphologic and functional changes resulting from soft tissue mobilization. *Med Sci Sports Exerc.* 1997;29(3):313-9.

Devkota AC, Tsuzaki M, Almekinders LC, Banes AJ, Weinhold PS. Distributing a fixed amount of cyclic loading to tendon explants over longer periods induces greater cellular and mechanical responses. *J Orthop Res.* 2007;25(8):1078-86.

Devkota AC, Weinhold PS. A tissue explant system for assessing tendon overuse injury. *Med Eng Phys.* 2005;27(9):803-8.

Devkota AC, Weinhold PS. Prostaglandin E(2), collagenase, and cell death responses depend on cyclical load magnitude in an explant model of tendinopathy. *Connect Tissue Res.* 2010;51(4):306–13.

DiGiovanni CW, Kuo R, Tejwani N, Price R, Hansen ST, Cziernecki J, et al. Isolated gastrocnemius tightness. *J Bone Joint Surg Am.* 2002;84(6):962–70.

Dirks RC, Galley MR, Childress PJ, Fearon AM, Scott A, Koch LG, et al. Uphill running does not exacerbate collagenase-induced pathological changes in the Achilles tendon of rats selectively bred for high-capacity running. *Connect Tissue Res.* 2013a;54(6):386–93.

Dirks RC, Richard JS, Fearon AM, Scott A, Koch LG, Britton SL, et al. Uphill treadmill running does not induce histopathological changes in the rat Achilles tendon. *BMC Musculoskelet Disord.* 2013b;14:90.

Dirks RC, Warden SJ. Models for the study of tendinopathy. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2011; 11(2):141–9.

Dowling BA, Dart AJ, Hodgson DR, Rose RJ, Walsh WR. Recombinant equine growth hormone does not affect the in vitro biomechanical properties of equine superficial digital flexor tendon. *Vet Surg.* 2002;31(4):325-30.

Duncan W, Dahm DL. Clinical anatomy of the fabella. *Clin Anat.* 2003;16(5):448–9.

el Hawary R, Stanish WD, Curwin SL. Rehabilitation of tendon injuries in sport. *Sports Med.* 1997;24(5):347-58.

Fearon A, Dahlstrom JE, Twin J, Cook J, Scott A. The Bonar score revisited: Region of evaluation significantly influences the standardized assessment of tendon degeneration. *J Sci Med Sport.* 2014;17(4):346-50.

Ferry ST, Afshari HM, Lee JA, Dahnert LE, Weinhold PS. Effect of prostaglandin E2 injection on the structural properties of the rat patellar tendon. *Sports Med Arthrosc Rehabil Ther Technol.* 2012;4(1):2.

Foland JW, Trotter GW, Powers BE, Wrigley RH, Smith FW. Effect of sodium hyaluronate in collagenase-induced superficial digital flexor tendinitis in horses. *Am J Vet Res.* 1992;53(12):2371-6.

Fransson BA, Gavin PR, Lahmers KK. Supraspinatus tendinosis associated with biceps brachii tendon displacement in a dog. *J Am Vet Med Assoc.* 2005;227(9):1429-33, 1416.

Fredberg U, Stengaard-Pedersen K. Chronic tendinopathy tissue pathology, pain mechanisms, and etiology with a special focus on inflammation. *Scand J Med Sci Sports.* 2008;18(1):3-15.

Fredberg U. Local corticosteroid injection in sport: review of literature and guidelines for treatment. *Scand J Med Sci Sports*. 1997;7(3):131–9.

Frey C, Zamora J. The effects of obesity on orthopaedic foot and ankle pathology. *Foot Ankle Int*. 2007;28(9):996-9.

Fridén J. Muscle soreness after exercise: implications of morphological changes. *Int J Sports Med*. 1984;5(2):57-66.

Frost HM. Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU): 4. Mechanical influences on intact fibrous tissues. *Anat Rec*. 1990;226(4):433-9.

Fu SC, Chan BP, Wang W, Pau HM, Chan KM, Rolf CG. Increase expression of matrix metalloproteinase 1(MMP1) in 11 patients with patellar tendinosis. *Acta Orthop Scand*. 2002a;73(6):658-62.

Fu SC, Chan KM, Chan LS, Fong DT, Lui PY. The use of motion analysis to measure pain-related behaviour in a rat model of degenerative tendon injuries. *J Neurosci Methods*. 2009;179(2):309–18.

Fu SC, Wang W, Pau HM, Wong YP, Chan KM, Rolf CG. Increased expression of transforming growth factor-beta1 in patellar tendinosis. *Clin Orthop Relat Res*. 2002b;(400):174–83.

Fung DT, Wang VM, Andarawis-Puri N, Basta-Pljakic J, Li Y, Laudier DM, et al. Early response to tendon fatigue damage accumulation in a novel in vivo model. *J Biomech.* 2010;43(2):274–9.

Fyfe I, Stanish WD. The use of eccentric training and stretching in the treatment and prevention of tendon injuries. *Clin Sports Med.* 1992;11(3):601–24.

Gaida JE, Alfredson L, Kiss ZS, Wilson AM, Alfredson H, Cook JL. Dyslipidemia in Achilles tendinopathy is characteristic of insulin resistance. *Med Sci Sports Exerc.* 2009;41(6):1194–7.

Glazebrook MA, Wright JR Jr, Langman M, Stanish WD, Lee JM. Histological analysis of achilles tendons in an overuse rat model. *J Orthop Res.* 2008;26(6):840-6.

Godbout C, Ang O, Frenette J. Early voluntary exercise does not promote healing in a rat model of Achilles tendon injury. *J Appl Physiol.* 2006;101(6):1720–6.

Godoy-Santos A, Cunha MV, Ortiz RT, Fernandes TD, Mattar R Jr, Santos dos MCLG. MMP-1 promoter polymorphism is associated with primary tendinopathy of the posterior tibial tendon. *J Orthop Res.* 2013;31(7):1103–7.

Godoy-Santos A, Trevisan R, Fernandes TD, Santos MCLGD. Association of MMP-8 polymorphisms with tendinopathy of the primary posterior tibial tendon: a pilot study. *Clinics (Sao Paulo)*. 2011;66(9):1641-3.

Gottlieb NL, Riskin WG. Complications of local corticosteroid injections. *JAMA*. 1980;243(15):1547-8.

Guney A, Vatansever F, Karaman I, Kafadar IH, Oner M, Turk CY. Biomechanical properties of Achilles tendon in diabetic vs. non-diabetic patients. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2015;123(7):428-32.

Haglund P. Beitrag zur Klinik der Achilles tendon. *Zeitschr Orthop Chir*. 1928;49:49–58.

Harvie P, Ostlere SJ, Teh J, McNally EG, Clipsham K, Burston BJ, et al. Genetic influences in the aetiology of tears of the rotator cuff. Sibling risk of a full-thickness tear. *J Bone Joint Surg Br*. 2004;86(5):696-700.

Hashimoto T, Nobuhara K, Hamada T. Pathologic evidence of degeneration as a primary cause of rotator cuff tear. *Clin Orthop Relat Res*. 2003;(415):111–20.

Hast MW, Zuskov A, Soslowsky LJ. The role of animal models in tendon research. *Bone Joint Res*. 2014;3(6):193-202.

Heinemeier KM, Skovgaard D, Bayer ML, Qvortrup K, Kjaer A, Kjaer M, et al. Uphill running improves rat Achilles tendon tissue mechanical properties and alters gene expression without inducing pathological changes. *J Appl Physiol* (1985) 2012;113(5):827–36.

Herring SA, Nilson KL. Introduction to overuse injuries. *Clin Sports Med*. 1987;6(2):225–39.

Hodgson RJ, O'Connor PJ, Grainger AJ. Tendon and ligament imaging. *Br J Radiol*. 2012;85(1016):1157-72.

Hofmann GO, Weber T, Lob G. Tendon rupture in chronic kidney insufficiency- "uremic tendonopathy"? A literature-supported documentation of 3 cases. *Chirurg*. 1990;61(6):434-7.

Hoksrud A, Ohberg L, Alfredson H, Bahr R. Color Doppler ultrasound findings in patellar tendinopathy (jumper's knee). *Am J Sports Med*. 2008;36(9):1813-20.

Holmes GB, Lin J. Etiologic factors associated with symptomatic Achilles tendinopathy. *Foot Ankle Int*. 2006;27(11):952–9.

Hsu RW, Hsu WH, Tai CL, Lee KF. Effect of hyperbaric oxygen therapy on patellar tendinopathy in a rabbit model. *J Trauma*. 2004;57(5):1060-4.

Huang T-F, Perry SM, Soslowsky LJ. The effect of overuse activity on Achilles tendon in an animal model: a biomechanical study. *Ann Biomed Eng.* 2004;32(3):336–41.

Hutchison AM, Evans R, Bodger O, Pallister I, Topliss C, Williams P, Vannet N, Morris V, Beard D. What is the best clinical test for Achilles tendinopathy? *Foot Ankle Surg.* 2013;19(2):112-7.

Iannotti JP, Deutsch A, Green A, Rudicel S, Christensen J, Marraffino S, Rodeo S. Time to failure after rotator cuff repair: a prospective imaging study. *J Bone Joint Surg Am.* 2013;95(11):965-71.

Jafari L, Vachon P, Beaudry F, Langelier E. Histopathological, biomechanical, and behavioral pain findings of Achilles tendinopathy using an animal model of overuse injury. *Physiol Rep.* 2015;3(1). pii: e12265.

James SL, Bates BT, Osternig LR. Injuries to runners. *Am J Sports Med.* 1978;6(2):40–50.

Järvinen M, Józsa L, Kannus P, Järvinen TL, Kvist M, Leadbetter W. Histopathological findings in chronic tendon disorders. *Scand J Med Sci Sports.* 1997;7(2):86-95.

Järvinen TA, Kannus P, Paavola M, Järvinen TL, Józsa L, Järvinen M. Achilles tendon injuries. *Curr Opin Rheumatol.* 2001;13(2):150-5.

Jelinsky SA, Lake SP, Archambault JM, Soslowsky LJ. Gene expression in rat supraspinatus tendon recovers from overuse with rest. *Clin Orthop Relat Res.* 2008; 466(7):1612-7.

Józsa L, Balint JB, Kannus P, Reffy A, Barzo M. Distribution of blood groups in patients with tendon rupture. An analysis of 832 cases. *J Bone Joint Surg Br.* 1989;71(2):272-4.

Józsa L, Barzo M, Balint JB. Correlations between the ABO blood group system and tendon rupture. *Magy Traumatol Orthop Helyreallito Seb.* 1990;33(2):101-4.

Józsa LG, Kannus P. *Human tendons: anatomy, physiology, and pathology.* Champaign, IL: Human Kinetics; 1997.

Kachlik D, Baca V, Cepelik M, Hajek P, Mandys V, Musil V, et al. Clinical anatomy of the retrocalcaneal bursa. *Surg Radiol Anat.* 2008a;30(4):347–53.

Kachlik D, Baca V, Cepelik M, Hajek P, Mandys V, Musil V. Clinical anatomy of the calcaneal tuberosity. *Ann Anat.* 2008b;190(3):284–91.

Kager H. Zur klinik und diagnostik des achillessehnenrisses. *Der Chirurg.* 1939; 11:691-5.

Kamineni S, Butterfield T, Sinai A. Percutaneous ultrasonic debridement of tendinopathy-a pilot Achilles rabbit model. *J Orthop Surg Res.* 2015;10:70.

Kannus P, Józsa L. Histopathological changes preceding spontaneous ruptures of a tendon. A controlled study of 891 patients. *J Bone Joint Surg Am.* 1991;73(10):1507-25.

Kannus P. Etiology and pathophysiology of chronic tendon disorders in sports. *Scand J Med Sci Sports.* 1997;7(2):78-85.

Kannus P. Structure of the tendon connective tissue. *Scand J Med Sci Sports.* 2000;10(6):312-20.

Kashida Y, Kato M. Characterization of fluoroquinolone-induced Achilles tendon toxicity in rats: comparison of toxicities of 10 fluoroquinolones and effects of anti-inflammatory compounds. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41(11):2389-93.

Kato M, Takada S, Kashida Y, Nomura M. Histological examination on Achilles tendon lesions induced by quinolone antibacterial agents in juvenile rats. *Toxicol Pathol.* 1995;23(3):385-92.

Kaufman KR, Brodine SK, Shaffer RA, Johnson CW, Cullison TR. The effect of foot structure and range of motion on musculoskeletal overuse injuries. *Am J Sports Med.* 1999;27(5):585-93.

Kettunen JA, Kujala UM, Kaprio J, Sarna S. Health of master track and field athletes: a 16-year follow-up study. *Clin J Sport Med.* 2006;16(2):142-8.

Khan KM, Bonar F, Desmond PM, Cook JL, Young DA, Visentini PJ, et al. Patellar tendinosis (jumper's knee): findings at histopathologic examination, US, and MR imaging. Victorian Institute of Sport Tendon Study Group. *Radiology*. 1996;200(3):821-7.

Khan KM, Cook JL, Bonar F, Harcourt P, Astrom M. Histopathology of common tendinopathies. Update and implications for clinical management. *Sports Med*. 1999;27(6):393-408.

Khan MH, Li Z, Wang JH-C. Repeated exposure of tendon to prostaglandin-E2 leads to localized tendon degeneration. *Clin J Sport Med*. 2005;15(1):27-33.

Kjaer M, Langberg H, Magnusson P. Overuse injuries in tendon tissue: insight into adaptation mechanisms. *Ugeskr Laeger*. 2003;165(14):1438-43.

Kjaer M. The treatment of overuse injuries in sports. *Scand J Med Sci Sports*. 2001;11(4):195-6.

Koivunen-Niemelä T, Parkkola K. Anatomy of the Achilles tendon (tendo calcaneus) with respect to tendon thickness measurements. *Surg Radiol Anat*. 1995;17(3):263-8.

Kolodziej P, Glisson RR, Nunley JA. Risk of avulsion of the Achilles tendon after partial excision for treatment of insertional tendonitis and Haglund's deformity: a biomechanical study. *Foot Ankle Int*. 1999;20(7):433-7.

Komi PV, Fukashiro S, Järvinen M. Biomechanical loading of Achilles tendon during normal locomotion. *Clin Sports Med.* 1992;11(3):521-31.

Komi PV, Salonen M, Järvinen M, Kokko O. In vivo registration of Achilles tendon forces in man. I. Methodological development. *Int J Sports Med.* 1987;8(Suppl 1):3-8.

Komi PV, Salonen M, Järvinen M. In vivo measurements of Achilles tendon forces in man. *Med Sci Sports Exerc.* 1984;16(2):165.

Kraushaar B, Nirschl R. Tendinosis of the elbow (tennis elbow). Clinical features and findings of histological, immunohistochemical, and electron microscopy studies. *J Bone Joint Surg Am.* 1999;81(2):259-78.

Kubo K, Akima H, Ushiyama J, Tabata I, Fukuoka H, Kanehisa H, et al. Effects of resistance training during bed rest on the viscoelastic properties of tendon structures in the lower limb. *Scand J Med Sci Sports.* 2004;14(5):296-302.

Kubo K, Kanehisa H, Miyatani M, Tachi M, Fukunaga T. Effect of low-load resistance training on the tendon properties in middle- aged and elderly women. *Acta Physiol Scand.* 2003;178(1):25-32.

Kujala UM, Jarvinen M, Natri A, Lehto M, Nelimarkka O, Hurme M, Virta L, Finne J. ABO blood groups and musculoskeletal injuries. *Injury.* 1992;23(2):131-3.

Kujala UM, Sarna S, Kaprio J. Cumulative incidence of Achilles tendon rupture and tendinopathy in male former elite athletes. *Clin J Sport Med.* 2005;15(3):133-5.

Kvist M. Achilles tendon injuries in athletes. *Ann Chir Gynaecol.* 1991;80(2):188-201.

Kvist M. Achilles tendon injuries in athletes. *Sports Med.* 1994;18(3):173-201.

Lagergren C, Lindholm A. Vascular distribution in the Achilles tendon; an angiographic and microangiographic study. *Acta Chir Scand.* 1959;116(5-6):491-5.

Lake SP, Ansorge HL, Soslowsky LJ. Animal models of tendinopathy. *Disabil Rehabil.* 2008;30(20-22):1530-41.

Langberg H, Bülow J, Kjaer M. Blood flow in the peritendinous space of the human Achilles tendon during exercise. *Acta Physiol Scand.* 1998;163(2):149-53.

Langberg H, Olesen J, Skovgaard D, Kjaer M. Age related blood flow around the Achilles tendon during exercise in humans. *Eur J Appl Physiol.* 2001;84(3):246-8.

Langberg H, Skovgaard D, Karamouzis M, Bulow J, Kjaer M. Metabolism and inflammatory mediators in the peritendinous space measured by microdialysis during intermittent isometric exercise in humans. *J Physiol.* 1999;515(Pt 3):919-27.

Lee CC, Jacobs RL. Achilles (the man, the myth, the tendon). *Iowa Orthop J.* 2002;22:108-9.

Lee WT, Collins JF. Ciprofloxacin associated bilateral Achilles tendon rupture. *Aust N Z J Med.* 1992;22(5):500.

Li Z, Yang G, Khan M, Stone D, Woo SL, Wang JH. Inflammatory response of human tendon fibroblasts to cyclic mechanical stretching. *Am J Sports Med.* 2004;32(2):435-40.

Lian Ø, Dahl J, Ackermann PW, Frihagen F, Engebretsen I, Bahr R. Pronociceptive and antinociceptive neuromediators in patellar tendinopathy. *Am J Sports Med.* 2006;34(11):1801-8.

Lian Ø, Scott A, Engebretsen L, Bahr R, Duronio V, Khan K. Excessive apoptosis in patellar tendinopathy in athletes. *Am J Sports Med.* 2007;35(4):605-11.

Lindstedt SL, LaStayo PC, Reich TE. When active muscles lengthen: properties and consequences of eccentric contractions. *News Physiol Sci.* 2001;16:256-61.

Lohr JF, Uthoff HK. The microvascular pattern of the supraspinatus tendon. *Clin Orthop Relat Res.* 1990;(254):35-8.

Longo UG, Franceschi F, Ruzzini L, Rabitti C, Morini S, Maffulli N, et al. Histopathology of the supraspinatus tendon in rotator cuff tears. *Am J Sports Med.* 2008;36(3):533-8.

Longo UG, Ronga M, Maffulli N. Achilles tendinopathy. *Sports Med Arthrosc.* 2009;17(2):112–26.

Lu M, Johar S, Veenema K, Goldblatt J. Patellar tendon rupture with underlying systemic lupus erythematosus: a case report. *J Emerg Med.* 2012;43(1):e35–8.

Lui PP, Chan LS, Fu SC, Chan KM. Expression of sensory neuropeptides in tendon is associated with failed healing and activity-related tendon pain in collagenase-induced tendon injury. *Am J Sports Med.* 2010a;38(4):757-64.

Lui PP, Chan LS, Lee YW, Fu SC, Chan KM. Sustained expression of proteoglycans and collagen type III/type I ratio in a calcified tendinopathy model. *Rheumatology (Oxford).* 2010b;49(2):231-9.

Lui PP, Fu SC, Chan LS, Hung LK, Chan KM. Chondrocyte phenotype and ectopic ossification in collagenase-induced tendon degeneration. *J Histochem Cytochem.* 2009;57(2):91-100.

Lui PP, Maffulli N, Rolf C, Smith RKW. What are the validated animal models for tendinopathy? *Scand J Med Sci Sports.* 2011; 21(1):3–17.

Ly JQ, Bui-Mansfield LT. Anatomy of and abnormalities associated with Kager's fat Pad. *AJR Am J Roentgenol.* 2004;182(1):147-54.

Lysholm J, Wiklander J. Injuries in runners. *Am J Sports Med.* 1987;15(2):168-71.

Machova Urdzikova L, Sedlacek R, Suchy T, Amemori T, Ruzicka J, Lesny P, et al. Human multipotent mesenchymal stem cells improve healing after collagenase tendon injury in the rat. *Biomed Eng Online.* 2014;13:42.

Maffulli N, Ajis A, Longo UG, Denaro V. Chronic rupture of tendo Achillis. *Foot Ankle Clin.* 2007;12(4):583-96, vi.

Maffulli N, Barrass V, Ewen SW. Light microscopic histology of achilles tendon ruptures. A comparison with unruptured tendons. *Am J Sports Med.* 2000;28(6):857-63.

Maffulli N, Binfield PM, King JB. Tendon problems in athletic individuals. *J Bone Joint Surg Am.* 1998a;80(1):142-4.

Maffulli N, Khan KM, Puddu G. Overuse tendon conditions: time to change a confusing terminology. *Arthroscopy.* 1998b;14(8):840-3.

Maffulli N, Wong J, Almekinders LC. Types and epidemiology of tendinopathy. *Clin Sports Med.* 2003;22(4):675-92.

Maffulli N. Rupture of the Achilles tendon. *J Bone Joint Surg Am.* 1999;81(7):1019-36.

Magnusson SP, Narici MV, Maganaris CN, Kjaer M. Human tendon behaviour and adaptation, in vivo. *J Physiol.* 2008;586(1):71-81.

Magnusson SP, Qvortrup K, Larsen JO, Rosager S, Hanson P, Aagaard P, et al. Collagen fibril size and crimp morphology in ruptured and intact Achilles tendons. *Matrix Biol.* 2002;21(4):369-77.

Mahieu NN, Witvrouw E, Stevens V, Van Tiggelen D, Roget P. Intrinsic risk factors for the development of Achilles tendon overuse injury: a prospective study. *Am J Sports Med.* 2006;34(2):226-35.

Mahler F, Fritschy D. Partial and complete ruptures of the Achilles tendon and local corticosteroid injections. *Br J Sports Med.* 1992;26(1):7-14.

Malaguti M, Triolo L, Biagini M. Ciprofloxacin-associated Achilles tendon rupture in a hemodialysis patient. *J Nephrol.* 2001;14(5):431–2.

Marcos RL, Leal-Junior EC, Arnold G, Magnenet V, Rahouadj R, Wang X, et al. Low-level laser therapy in collagenase-induced Achilles tendinitis in rats: analyses of biochemical and biomechanical aspects. *J Orthop Res.* 2012;30(12):1945-51.

Marsolais D, Côté CH, Frenette J. Neutrophils and macrophages accumulate sequentially following Achilles tendon injury. *J Orthop Res.* 2001;19(6):1203-9.

McCreesh K, Lewis J. Continuum model of tendon pathology - where are we now? *Int J Exp Pathol.* 2013;94(4):242–7.

McEwan SR, Davey PG. Ciprofloxacin and tenosynovitis. *Lancet.* 1988; 2(8616):900.

McWhorter JW, Francis RS, Heckmann RA. Influence of local steroid injections on traumatized tendon properties. A biomechanical and histological study. *Am J Sports Med.* 1991;19(5):435-9.

Messner K, Wei Y, Andersson B, Gillquist J, Räsänen T. Rat model of Achilles tendon disorder. *A pilot study. Cells Tissues Organs.* 1999;165(1):30-9.

Milz S, Rufai A, Buettner A, Putz R, Ralphs JR, Benjamin M. Three-dimensional reconstructions of the Achilles tendon insertion in man. *J Anat.* 2002;200(Pt 2):145-52.

Mokdad AH, Ford ES, Bowman BA, Dietz WH, Vinicor F, Bales VS, et al. Prevalence of Obesity, Diabetes, and Obesity-Related Health Risk Factors, 2001. *JAMA.* 2003;289(1):76–9.

Mokone GG, Gajjar M, September AV, Schweltnus MP, Greenberg J, Noakes TD, et al. The guanine-thymine dinucleotide repeat polymorphism within the tenascin-C gene is associated with Achilles tendon injuries. *Am J Sports Med.* 2005;33(7):1016-21.

Mokone GG, Schweltnus MP, Noakes TD, Collins M. The COL5A1 gene and Achilles tendon pathology. *Scand J Med Sci Sports.* 2006;16(1):19–26.

Momose T, Amadio PC, Zobitz ME, Zhao C, An KN. Effect of paratenon and repetitive motion on the gliding resistance of tendon of extrasynovial origin. *Clin Anat.* 2002;15(3):199-205.

Movin T, Gad A, Güntner P, Földhazy Z, Rolf C. Pathology of the Achilles tendon in association with ciprofloxacin treatment. *Foot Ankle Int.* 1997a;18(5):297–9.

Movin T, Gad A, Reinholt FP, Rolf C. Tendon pathology in long-standing achillodynia. Biopsy findings in 40 patients. *Acta Orthop Scand*. 1997b;68(2):170–5.

Myerson MS, McGarvey W. Disorders of the Achilles tendon insertion and Achilles tendinitis. *Instr Course Lect*. 1999;48:211-8.

Nakagawa YY, Totsuka MM, Sato TT, Fukuda YY, Hirota KK. Effect of disuse on the ultrastructure of the Achilles tendon in rats. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1989;59(3):239–42

Nakama LH, King KB, Abrahamsson S, Rempel DM. Effect of repetition rate on the formation of microtears in tendon in an in vivo cyclical loading model. *J Orthop Res*. 2007;25(9):1176–84.

Nakama LH, King KB, Abrahamsson S, Rempel DM. Evidence of tendon microtears due to cyclical loading in an in vivo tendinopathy model. *J Orthop Res*. 2005;23(5):1199–205.

Nakama LH, King KB, Abrahamsson S, Rempel DM. VEGF, VEGFR-1, and CTGF cell densities in tendon are increased with cyclical loading: an in vivo tendinopathy model. *J Orthop Res*. 2006;24(3):393–400.

Newnham DMD, Douglas JGJ, Legge JSJ, Friend JAJ. Achilles tendon rupture: an underrated complication of corticosteroid treatment. *Thorax*. 1991;46(11):853–4.

Ng GY-F, Chung PY-M, Wang JS, Cheung RT-H. Enforced bipedal downhill running induces Achilles tendinosis in rats. *Connect Tissue Res*. 2011;52(6):466–71.

Nigg BM. The role of impact forces and foot pronation: a new paradigm. *Clin J Sport Med*. 2001;11(1):2–9.

Nisbet NW. Anatomy of the calcaneal tendon of the rabbit. *J Bone Joint Surg Br*. 1960;42(2):360–6.

Nunley JA (editor). *The Achilles tendon: treatment and rehabilitation*. New York: Springer-Verlag; 2009.

Ohberg L, Lorentzon R, Alfredson H. Eccentric training in patients with chronic Achilles tendinosis: normalised tendon structure and decreased thickness at follow up. *Br J Sports Med*. 2004;38(1):8-11; discussion 11.

Ohno K, Yasuda K, Yamamoto N, Kaneda K, Hayashi K. Effects of complete stress-shielding on the mechanical properties and histology of in situ frozen patellar tendon. *J Orthop Res*. 1993;11(4):592–602.

Orfei CP, Lovati AB, Viganò M, Stanco D, Bottagisio M, Di Giancamillo A, et al. Dose-related and time-dependent development of collagenase-induced tendinopathy in rats. *PLoS One*. 2016; 11(8): e0161590.

Ozgurtas T, Yildiz C, Serdar M, Atesalp S, Kutluay T. Is high concentration of serum lipids a risk factor for Achilles tendon rupture? *Clin Chim Acta*. 2003;331(1-2):25–8.

Paavola M, Kannus P, Järvinen TAH, Khan K, Józsa L, Järvinen M. Achilles tendinopathy. *J Bone Joint Surg Am*. 2002;84(11):2062–76.

Pavlov H, Heneghan MA, Hersh A, Goldman AB, Vigorita V. The Haglund syndrome: initial and differential diagnosis. *Radiology*. 1982;144(1):83–8.

Peers KH, Lysens RJ. Patellar tendinopathy in athletes: current diagnostic and therapeutic recommendations. *Sports Med*. 2005;35(1):71–87.

Peiró A, Ferrandis R, Garcia L, Alcazar E. Simultaneous and spontaneous bilateral rupture of the patellar tendon in rheumatoid arthritis. A case report. *Acta Orthop Scand*. 1975;46(4):700–3.

Perry SM, McIlhenny SE, Hoffman MC, Soslowsky LJ. Inflammatory and angiogenic mRNA levels are altered in a supraspinatus tendon overuse animal model. *J Shoulder Elbow Surg*. 2005;14(1 Suppl S):79S-83S.

Perugia L, Postacchini F, Ippolito E. *The tendons. Biology, pathology, clinical aspects*. Milano: Editrice Kurtis srl; 1986.

Petersen W, Hohmann G, Stein V, Tillmann B. The blood supply of the posterior tibial tendon. *J Bone Joint Surg Br*. 2002;84(1):141-4.

Prado MP, de Carvalho AE Jr, Rodrigues CJ, Fernandes TD, Mendes AA, Salomao O. Vascular density of the posterior tibial tendon: a cadaver study. *Foot Ankle Int*. 2006;27(8):628-31.

Prasad S, Lee A, Clarnette R, Faull R. Spontaneous, bilateral patellar tendon rupture in a woman with previous Achilles tendon rupture and systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)*. 2003;42(7):905-6.

Pritchard CH, Berney S. Patellar tendon rupture in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 1989;16(6):786-8.

Puddu G, Ippolito E, Postacchini F. A classification of Achilles tendon disease. *Am J Sports Med*. 1976;4(4):145-50.

Pufe T, Petersen W, Kurz B, Tsokos M, Tillmann B, Mentlein R. Mechanical factors influence the expression of endostatin - an inhibitor of angiogenesis - in tendons. *J Orthop Res*. 2003;21(4):610-6.

Pufe T, Petersen W, Tillmann B, Mentlein R. The angiogenic peptide vascular endothelial growth factor is expressed in foetal and ruptured tendons. *Virchows Arch.* 2001;439(4):579-85.

Renström PAHF, Woo SL-Y. *Tendinopathy: a major medical problem in sport.* In: Woo S, Renström P, Arnoczky S (editors). *Tendinopathy in athletes.* Oxford, UK: Blackwell Publishing; 2008. Chap.1,p.1-9.

Ribard P, Audisio F, Kahn MF, De Bandt M, Jorgensen C, Hayem G, et al. Seven Achilles tendinitis including 3 complicated by rupture during fluoroquinolone therapy. *J Rheumatol.* 1992;19(9):1479–81.

Richards PJ, Win T, Jones PW. The distribution of microvascular response in Achilles tendonopathy assessed by colour and power Doppler. *Skeletal Radiol.* 2005;34(6):336-42.

Riley G. The pathogenesis of tendinopathy. A molecular perspective. *Rheumatology (Oxford).* 2004;43(2):131–42.

Riley GP, Goddard MJ, Hazleman BL. Histopathological assessment and pathological significance of matrix degeneration in supraspinatus tendons. *Rheumatology (Oxford).* 2001;40(2):229-30.

Rio E, Moseley L, Purdam C, Samiric T, Kidgell D, Pearce AJ, Jaberzadeh S, Cook J. The pain of tendinopathy: physiological or pathophysiological? *Sports Med.* 2014; 44(1):9-23.

Ristolainen L, Kettunen JA, Waller B, Heinonen A, Kujala UM. Training-related risk factors in the etiology of overuse injuries in endurance sports. *J Sports Med Phys Fitness.* 2014;54(1):78-87.

Rolf C, Movin T. Etiology, histopathology, and outcome of surgery in achillodynia. *Foot Ankle Int.* 1997;18(9):565-9.

Rovere GD, Webb LX, Gristina AG, et al. Musculoskeletal injuries in theatrical dance students. *Am J Sports Med.* 1983;11(4):195-8.

Rufai A, Ralphs JR, Benjamin M. Structure and histopathology of the insertional region of the human Achilles tendon. *J Orthop Res.* 1995;13(4):585–93.

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;22(7):1076-85.

Russell JC, Epling WF, Pierce D, Amy RM, Boer DP. Induction of voluntary prolonged running by rats. *J Appl Physiol* (1985). 1987;63(6):2549–53.

Salomão O, Carvalho Jr E, Fernandes T, Traldi Filho IH, Carvalho Neto J. Lesões tendíneas no pé e no tornozelo do esportista. *Rev Bras Ortop.* 1993; 28(10):731-6.

Samiric T, Ilic MZ, Handley CJ. Characterisation of proteoglycans and their catabolic products in tendon and explant cultures of tendon. *Matrix Biol.* 2004;23(2):127-40.

Sanz-Hospital FJ, Martín CM, Escalera J, Llanos LF. Achilleo-calcaneal vascular network. *Foot Ankle Int.* 1997;18(8):506-9.

Sarrafian S. *Anatomy of the foot and ankle: descriptive, topographic, functional.* Philadelphia: JB Lippincott Company; 1993.

Schmidt-Rohlfing B, Graf J, Schneider U, Niethard FU. The blood supply of the Achilles tendon. *Int Orthop.* 1992;16(1):29-31.

Schubert TE, Weidler C, Lerch K, Hofstadter F, Straub RH. Achilles tendinosis is associated with sprouting of substance P positive nerve fibres. *Ann Rheum Dis.* 2005;64(7):1083-6.

Scott A, Ashe MC. Common tendinopathies in the upper and lower extremities. *Curr Sports Med Rep.* 2006;5(5):233-41.

Scott A, Cook JL, Hart DA, Walker DC, Duronio V, Khan KM. Tenocyte responses to mechanical loading in vivo: a role for local insulin-like growth factor 1 signaling in early tendinosis in rats. *Arthritis Rheum.* 2007;56(3):871-81.

Scott A, Docking S, Vicenzino B, Alfredson H, Murphy RJ, Carr AJ, et al. Sports and exercise-related tendinopathies: a review of selected topical issues by participants of the second International Scientific Tendinopathy Symposium (ISTS) Vancouver 2012. *Br J Sports Med.* 2013;47(9):536-44.

Selvanetti A, Cipolla M, Puddu G. Overuse tendon injuries: Basic science and classification. *Oper Tech Sports Med.* 1997;5(3):110-7.

Shah V, Bendele A, Dines JS, Kestler HK, Hollinger JO, Chahine NO, et al. Dose-response effect of an intra-tendon application of recombinant human platelet-derived growth factor-BB (rhPDGF-BB) in a rat Achilles tendinopathy model. *J Orthop Res.* 2013;31(3):413-20.

Sharma P, Maffulli N. Tendon injury and tendinopathy: healing and repair. *J Bone Joint Surg Am.* 2005;87(1):187-202.

Shaw HM, Vázquez OT, McGonagle D, Bydder G, Santer RM, Benjamin M. Development of the human Achilles tendon enthesis organ. *J Anat.* 2008;213(6):718-24.

Shrier I, Matheson GO, Kohl HW. Achilles tendonitis: are corticosteroid injections useful or harmful? *Clin J Sport Med*. 1996;6(4):245–50.

Silva RD, Glazebrook MA, Campos VC, Vasconcelos AC. Achilles tendinosis: a morphometrical study in a rat model. *Int J Clin Exp Pathol*. 2011;4(7):683-91.

Silver IA, Brown PN, Goodship AE, Lanyon LE, McCullagh KG, Perry GC, et al. A clinical and experimental study of tendon injury, healing and treatment in the horse. *Equine Vet J Suppl*. 1983;(1):1-43.

Silvestri E, Biggi E, Molfetta L, Avanzino C, La Paglia E, Garlaschi G. Power Doppler analysis of tendon vascularization. *Int J Tissue React*. 2003;25(4):149-58.

Snow SW, Bohne WH, DiCarlo E, Chang VK. Anatomy of the Achilles tendon and plantar fascia in relation to the calcaneus in various age groups. *Foot Ankle Int*. 1995;16(7):418-21.

Sobhani S, Dekker R, Postema K, Dijkstra PU. Epidemiology of ankle and foot overuse injuries in sports: A systematic review. *Scand J Med Sci Sports*. 2013;23(6):669-86.

Solchaga LA, Bendele A, Shah V, Snel LB, Kestler HK, Dines JS, et al. Comparison of the effect of intra-tendon applications of recombinant human platelet-derived growth factor-BB, platelet-rich plasma, steroids in a rat achilles tendon collagenase model. *J Orthop Res.* 2014;32(1):145-50.

Soslowsky LJ, Carpenter JE, DeBano CM, Banerji I, Moalli MR. Development and use of an animal model for investigations on rotator cuff disease. *J Shoulder Elbow Surg.* 1996;5(5):383–92.

Soslowsky LJ, Thomopoulos S, Tun S, Flanagan CL, Keefer CC, Mastaw J, et al. Neer Award 1999. Overuse activity injures the supraspinatus tendon in an animal model: a histologic and biomechanical study. *J Shoulder Elbow Surg.* 2000;9(2):79–84.

Souza SA. Ensaio mecânicos de materiais metálicos: fundamentos teóricos e práticos. 5ed. São Paulo: Editora Edgard Blücher; 1982.

Stanish WD, Curwin S, Rubinovich M. Tendinitis: the analysis and treatment for running. *Clin Sports Med.* 1985;4(4):593–609.

Stauber WT, Clarkson PM, Fritz VK, Evans WJ. Extracellular matrix disruption and pain after eccentric muscle action. *J Appl Physiol* (1985). 1990;69(3):868-74.

Stein V, Laprell H, Tinnemeyer S, Petersen W. Quantitative assessment of intravascular volume of the human Achilles tendon. *Acta Orthop Scand*. 2000;71(1):60-3.

Stilwell DL Jr. The innervation of tendons and aponeuroses. *Am J Anat*. 1957;100(3):289-317.

Stone D, Green C, Rao U, Aizawa H, Yamaji T, Niyibizi C, et al. Cytokine-induced tendinitis: a preliminary study in rabbits. *J Orthop Res*. 1999;17(2):168-77.

Strocchi R, De Pasquale V, Guizzardi S, Govoni P, Facchini A, Raspanti M, et al. Human Achilles tendon: morphological and morphometric variations as a function of age. *Foot Ankle*. 1991;12(2):100-4.

Sullo A, Maffulli N, Capasso G, Testa V. The effects of prolonged peritendinous administration of PGE1 to the rat Achilles tendon: a possible animal model of chronic Achilles tendinopathy. *J Orthop Sci*. 2001;6(4):349-57.

Sun HB, Li Y, Fung DT, Majeska RJ, Schaffler MB, Flatow EL. Coordinate regulation of IL-1beta and MMP-13 in rat tendons following subrupture fatigue damage. *Clin Orthop Relat Res*. 2008;466(7):1555-61.

Suy RR. Philip Verheyen (1648-1710) and his *Corporis Humani Anatomiae*. *Acta Chir Belg*. 2007;107(3):343-54.

Teitz CC, Garrett WE Jr, Miniaci A, Lee MH, Mann RA. Tendon problems in athletic individuals. *Instr Course Lect.* 1997;46:569-82.

Theobald P, Bydder G, Dent C, Nokes L, Pugh N, Benjamin M. The functional anatomy of Kager's fat pad in relation to retrocalcaneal problems and other hindfoot disorders. *J Anat.* 2006;208(1):91-7.

Thorpe CT, Riley GP, Birch HL, Clegg PD, Screen HR. Fascicles from energy-storing tendons show an age-specific response to cyclic fatigue loading. *J R Soc Interface.* 2014;11(92):20131058.

Torstensen ET, Bray RC, Wiley JP. Patellar tendinitis: a review of current concepts and treatment. *Clin J Sport Med.* 1994;4(2):77- 82.

Tsai YP, Chang CW, Lee JS, Liang JI, Hsieh TH, Yeh ML, et al. Direct radiofrequency application improves pain and gait in collagenase-induced acute Achilles tendon injury. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013; 2013:402692.

Uthoff HK, Sano H. Pathology of failure of the rotator cuff tendon. *Orthop Clin North Am.* 1997;28(1):31-41.

van der Linden PD, van Puijenbroek EP, Feenstra J, Veld BA, Sturkenboom MC, Herings RM, et al. Tendon disorders attributed to fluoroquinolones: a study on 42 spontaneous reports in the period 1988 to 1998. *Arthritis Rheum.* 2001;45(3):235–9.

Verheyen P. *Corporis humani anatomiae*. Leuven: Denique, 1693.

Waldecker U, Hofmann G, Drewitz S. Epidemiologic investigation of 1394 feet: coincidence of hindfoot malalignment and Achilles tendon disorders. *Foot Ankle Surg.* 2012;18(2):119-23.

Wang JH, Jia F, Yang G, Yang S, Campbell BH, Stone D, Woo SL. Cyclic mechanical stretching of human tendon fibroblasts increases the production of prostaglandin E2 and levels of cyclooxygenase expression: a novel in vitro model study. *Connect Tissue Res.* 2003;44(3-4):128-33.

Warden SJ, Kiss ZS, Malara FA, Ooi AB, Cook JL, Crossley KM. Comparative accuracy of magnetic resonance imaging and ultrasonography in confirming clinically diagnosed patellar tendinopathy. *Am J Sports Med.* 2007;35(3):427-36.

Warden SJ. Animal models for the study of tendinopathy. *Br J Sports Med.* 2007;41(4):232–40.

Waterston SW, Maffulli N, Ewen SW. Subcutaneous rupture of the Achilles tendon: Basic science and aspects of clinical practice. *Br J Sports Med* 1997;31(4):285-298.

Wiegerinck JI, Somford MP, Hoornenborg D, van Dijk CN. Eponyms of the Kager Triangle. *J Bone Joint Surg Am*. 2012;94(10):e67.

Wijsekera NT, Calder JD, Lee JC. Imaging in the assessment and management of Achilles tendinopathy and paratendinitis. *Semin Musculoskelet Radiol*. 2011;15(1):89–100.

Williams DS III, McClay IS, Hamill J. Arch structure and injury patterns in runners. *Clin Biomech (Bristol, Avon)*. 2001;16(4):341–7.

Williams IF, McCullagh KG, Goodship AE, Silver IA. Studies on the pathogenesis of equine tendonitis following collagenase injury. *Res Vet Sci*. 1984;36(3):326-38.

Winge S, Jorgensen U, Lassen Nielsen A. Epidemiology of injuries in Danish championship tennis. *Int J Sports Med*. 1989;10(5):368-71.

Wisløff U, Helgerud J, Kemi OJ, Ellingsen O. Intensity-controlled treadmill running in rats: VO₂ max) and cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280(3):H1301-10.

Yang G, Im HJ, Wang JH. Repetitive mechanical stretching modulates IL-1beta induced COX-2, MMP-1 expression, and PGE2 production in human patellar tendon fibroblasts. *Gene*. 2005;363:166-72.

Yoo SD, Choi S, Lee GJ, Chon J, Jeong YS, Park HK, et al. Effects of extracorporeal shockwave therapy on nanostructural and biomechanical responses in the collagenase-induced Achilles tendinitis animal model. *Lasers Med Sci*. 2012;27(6):1195-204.

Zantop T, Tillmann B, Petersen W. Quantitative assessment of blood vessels of the human Achilles tendon: an immunohistochemical cadaver study. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2003;123(9):501-4.

Zhang J, Wang JH-C. Production of PGE(2) increases in tendons subjected to repetitive mechanical loading and induces differentiation of tendon stem cells into non-tenocytes. *J Orthop Res*. 2010;28(2):198-203.