



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA**

**KANDIR GENÉSIO INNOCENTI DINHANE**

**EFEITOS DO CORTICOSTEROIDE INJETADO NO TENDÃO  
CALCÂNEO DE COELHOS - ANÁLISE HISTOLÓGICA,  
BIOMECÂNICA E DAS EXPRESSÕES DE METALOPROTEINASES  
E INTERLEUCINAS.**

Dissertação apresentada à Faculdade  
de Medicina, Universidade Estadual  
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,  
Campus de Botucatu, para obtenção  
do título de Mestre em Bases Gerais  
da Cirurgia

**Orientador : Prof. Dr. Winston Bonetti Yoshida**  
**Coorientador : Prof. Dr. Alexandre Leme Godoy dos Santos**

**Botucatu  
2015**

**Kandir Genésio Innocenti Dinhane**

**EFEITOS DO CORTICOSTEROIDE INJETADO NO TENDÃO  
CALCÂNEO DE COELHOS - ANÁLISE HISTOLÓGICA,  
BIOMECÂNICA E DAS EXPRESSÕES DE METALOPROTEINASES  
E INTERLEUCINAS.**

Dissertação apresentada à Faculdade  
de Medicina, Universidade Estadual  
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,  
Campus de Botucatu, para obtenção  
do título de Mestre em Bases Gerais  
da Cirurgia

**Orientador : Prof. Dr. Winston Bonetti Yoshida**

**Coorientador : Prof. Dr. Alexandre Leme Godoy dos Santos**

**Botucatu**

**2015**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Dinhane, Kandir Genésio Innocenti.

Efeitos do corticosteroide injetado no tendão calcâneo de coelhos : análise histológica, biomecânica e das expressões de metaloproteinases e interleucinas / Kandir Genésio Innocenti Dinhane. - Botucatu, 2015

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Winston Bonetti Yoshida

Coorientador: Alexandre Leme Godoy dos Santos

Capes: 40000001

1. Corticosteroides. 2. Metaloproteinases. 3. Tendões.  
4. Interleucinas. 5. Injeções.

Palavras-chave: Corticosteroide; Interleucinas;  
Metaloproteinases; Resistência; Tendão.

*Dedicatória*

---

*Ao Prof. Dr. Hamilton da Rosa Pereira, com gratidão por ter me escolhido, entre outros, da sexta turma da FCMBB, no direcionamento à melhor residência médica em Ortopedia e Traumatologia da época (HC-FMUSP)*

## *Agradecimentos Especiais*

---

*À minha esposa, **Ema Amélia Dorico Dinhane**, extensivo a meus pais **Genésio Dinhane** (in memoriam) e **Rosa Aparecida Innocenti Dinhane** (in memoriam); à minha irmã **Rosamara Innocenti Dinhane Vicente**; aos meus filhos **Dra. Luciana Innocenti Dinhane** e **Dr. Daniel Innocenti Dinhane**; ao meu genro **Dr. Silas Otero Reis Salum**; à minha nora **Dra. Juliana Gonzalez Luvizutto Dinhane** e aos meus netos **Júlia**, **Arthur**, **Lucas** e **Isabela**.*

*Ao Prof. Dr. Winston Bonetti Yoshida, Professor Titular da  
Disciplina de Cirurgia Vascular do Departamento de Cirurgia e  
Ortopedia da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP,  
orientador;*



*Agradecimientos*

---

*Ao Prof. Dr. Alexandre Leme Godoy dos Santos, Professor do Departamento de Ortopedia da Faculdade de Medicina – USP, coorientador;*

*A Profa. Adj. Regina Helena Garcia Martins, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Bases Gerais da Cirurgia da Faculdade de Medicina de Botucatu –UNESP;*

*A Profa. Dra. Érika Veruska de Paiva Ortolan, Chefe do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP;*

*Ao Prof. Dr. Trajano Sardenberg, Professor do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Medicina de Botucatu -UNESP, pelo auxílio na elaboração da Dissertação;*

*Ao Prof. Dr. Paulo Roberto de Almeida Silveiras, representando professores e médicos do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP;*

*Ao Prof. Dr. Sérgio Swain Müller, Professor do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Medicina de Botucatu -UNESP, pelo auxílio na elaboração da Dissertação;*

*Ao Prof. Dr. Alexandre Todorovic Fabro, Médico Patologista e Diretor da Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX) da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP;*

*A Profa. Dra. Adriana Lucia Mendes do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu -UNESP, pelo auxílio na elaboração da Dissertação;*

*A Profa. Dra. Beatriz Funayama Alvarenga Freire do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu -UNESP, pelo auxílio na elaboração da Dissertação;*

*À Márcia Fonseca Piagentini Cruz, representando os demais funcionários da Seção Técnica de Pós Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu- UNESP;*

*Ao Prof. Hélio Rubens de Carvalho Nunes, Estatístico do Escritório de Apoio à Pesquisa –EAP;*

*À Diva Aparecida Luvizutto Gasperini Rodrigues e Marlucci Betini, extensivo aos demais funcionários da Biblioteca do Campus de Botucatu- UNESP;*

*Ao José Rafael Franco e ao Paulo Sérgio dos Santos Teixeira, do Biotério Central do Campus da UNESP;*

*Ao Luis Carlos Edevalter Bardella, à Maria Cecília Salgado Mercadante e ao Dr. Diego Generoso , do Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental “Prof. William Saad Hossne”, da Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX) da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP;*

*À Dra. Luciana Innocenti Dinhane, pelo auxílio na elaboração da dissertação;*

*Ao Dr. Daniel Innocenti Dinhane, pelo auxílio na elaboração da dissertação;*

*À Andressa Aparecida dos Santos e à Amanda Luisa dos Santos, alunas do curso de aprimoramento de Fisioterapia;*

*À Ana Paula Dória, Márcia Tenório Del Neri, Renata Campos Capela, Biólogas da Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX) da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP;*

*À Maria Regina Moretto, Bióloga da Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX) da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP;*

*Ao Igor Deprá, Biólogo da Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX) da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP;*

*À Marta Regina Russo Sarzi e ao Florian José Fontana, da Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX) da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP;*

*Ao Prof. Dr. Sérgio Luis Felisbino e ao Prof. Dr. Luis Antônio Justulin Junior, Professores do Instituto de Biociências - UNESP;*

*Ao Carlos Luís Miguel e ao Douglas de Jesus, Técnicos de informática do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP;*

*Ao Marcos Eduardo Barreiros Aloise, Desenhista científico do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP;*

*À Solange Aparecida de Albuquerque Clara e à Marinede Ribeiro Jorge, Secretárias do Departamento e Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Medicina DE Botucatu– UNESP;*

*Ao Alberto Santos Capelluppi, Secretário da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA;*

*À Profa. Heleina Torres, Professora de informática, do Colégio Anglo de São Manuel;*

*À Profa. Cacilda Langoni Cannepele e à Prof. Maria Aparecida Caetano Callegari, Professoras de língua Portuguesa.*

*Epígrafe*

---

*Os tendões são estruturas surpreendentes!*

*Kandir Dinhane, 2015*

*Os tendões não gostam de inatividade e nem de mudanças bruscas.*

*Alex Scott, 2013*

*Resumo*

---



## RESUMO

**Introdução:** A injeção de corticosteroide (CE) para tratamento de tendinopatias é recurso terapêutico muito utilizado na prática ortopédica; contudo há controvérsias clínicas e experimentais a respeito dos benefícios e complicações desse procedimento. **Objetivo:** Avaliar os efeitos histológico, biomecânico, a expressão das metaloproteinases (MMP-1 e MMP-2) e das interleucinas (IL-1 e IL-6) nos tendões calcâneos de coelhos submetidos a injeção de CE. **Métodos:** Setenta e três coelhos New Zealand foram randomizados e divididos em dois Grupos: Grupo Teste composto por trinta e sete animais submetidos a injeção intratendinosa de CE (0,2 ml de solução com 1,4 mg de betametasona) no tendão calcâneo do membro pélvico direito, e Grupo Controle composto por trinta e seis animais, no qual o mesmo animal possibilitou dois espécimes de tendão calcâneo (direito e esquerdo); o tendão do membro pélvico direito foi submetido a injeção de soro fisiológico (0,2 ml de solução de cloreto de sódio a 0,9 %) e recebeu denominação de Controle Placebo (CP); o tendão calcâneo do membro pélvico esquerdo, sem nenhum procedimento, foi utilizado como Controle Normal (CN). Quarenta e oito horas após o procedimento foi realizada eutanásia e os tendões foram dissecados e retirados em uma extensão de quatro centímetros de suas inserções nos ossos calcâneos. As análises histológicas, de resistência mecânica e as expressões das metaloproteinases e interleucinas foram realizadas por avaliador sem conhecimento dos grupos. **Resultados:** O Grupo Teste apresentou menor expressão da MMP-2 em relação aos espécimes do Grupo Controle ( $p=0,027$ ). No grupo Controle, os espécimes de tendão calcâneo dos membros pélvicos direitos (CP) mostraram maior quantidade de fibras colágenas grossas em relação aos de tendão calcâneo dos membros pélvicos esquerdos (CN) ( $p=0,041$ ). Nas comparações entre os grupos nas demais variáveis não houve diferenças estatisticamente significantes. **Conclusões:** Quarenta e oito horas após a injeção intratendinosa de 0,2 ml de solução com 1,4 mg de betametasona em tendões calcâneos normais de coelhos, ocorreu diminuição da expressão de metaloproteinase 2, sugerindo menor degradação do colágeno. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos nas alterações das características histológicas, biomecânicas, na expressão de metaloproteinase 1 e das interleucinas 1 e 6.

**Palavras-chave:** Tendão, Corticosteroide, Resistência, Metaloproteinases, Interleucinas.

*Abstract*

---

## ABSTRACT

**Introduction:** The injection of corticosteroids (CE) for the treatment of tendinopathies is a therapeutic resource often used in orthopedic practice; however, there are clinical and experimental controversies regarding the benefits and complications of such practice. **Objective:** Is to evaluate the histological, biomechanical effects, and also the expression of metalloproteinases (MMP-1 and MMP-2) and interleukins (IL-1 and IL-6) on Achilles tendons of rabbits treated with CE injections. **Methods:** Seventy three New Zealand rabbits were randomly divided into two groups: The Test Group was comprised of thirty seven animals which underwent intratendineous injections of CE (0.2 ml of solution with 1.4 mg of betamethasone) in the Achilles tendon of the right pelvic limb, and the Control Group was comprised of thirty six animals, which provided two specimens of Achilles tendon (right and left); the Achilles tendon of the right pelvic limb underwent injections of saline solution (0.2 ml of 0.9% sodium chloride solution) and was called Placebo Control (CP); the Achilles tendon of the left pelvic limb received no medical procedure and was used as Normal Control (CN). Forty eight hours after the procedure, the animals were euthanized and the tendons were dissected and extracted at an extension of four centimeters (1.6 in) of its insertions in the calcaneus bones. The expressions of metalloproteinases and interleukins, mechanical resistance and histological analysis were all performed by an observer unaware of the groups **Results:** The Test Group has shown a smaller MMP-2 expression compared to those in Control Group ( $p= 0.027$ ). In the Control Group, the Achilles tendon of the right pelvic limb (CP) has shown a greater amount of thick collagen fibers in comparison to those in left pelvic limb (CN) ( $p= 0.041$ ). There were no other significant statistical difference between the groups when comparing other variables. **Conclusions:** Forty eight hours after the intratendinous injection of 0.2 ml of solution with 1.4 mg of betamethasone in the normal Aquilles Tendon of rabbits, there was a decrease of metalloproteinases 2 expression, suggesting a minor collagen degradation. Statistical differences in the change of histological characteristics, biomechanics, and in the expression of metalloproteinases 1 and in interleukins 1 and 6 were not observed between the groups.

**Keywords:** Tendons, Corticosteroids, Resistance, Metalloproteinases, Interleukins.

## *Lista de Ilustrações*

---

**Lista de Ilustrações**

<b>Figura 1</b> - Fluxograma dos procedimentos .....	39
<b>Figura 2</b> - Medida padronizada com paquímetro do ponto onde foram feitas as injeções, a 2 cm da inserção do tendão calcâneo do coelho, mantendo o tornozelo em flexão dorsal.....	42
<b>Figura 3</b> - Agulha com a ponta semidobrada.....	42
<b>Figura 4</b> - Injeção no tendão calcâneo do coelho, em local previamente marcado .....	42
<b>Figura 5</b> - Tendão calcâneo de coelho dissecado (seta branca) e que foi retirado íntegro, desde a junção miotendínea (seta escura grande) até a inserção no osso calcâneo (seta escura pequena) .....	44
<b>Figura 6</b> - Máquina de ensaio biomecânico, EMIC .....	45
<b>Figura 7</b> - Tendão roto após teste .....	45
<b>Figura 8</b> - Exemplo do gráfico Força x Deformação com resultados de um dos espécimes (A105) submetido ao ensaio de tração, que mostra valores das variáveis de resistência mecânica.....	46
<b>Figura 9</b> - Imagem histológica do tendão calcâneo do coelho sem ruptura do colágeno (HE; 400xx).....	47
<b>Figura 10</b> - Imagem histológica do tendão calcâneo do coelho com ruptura do colágeno (seta escura) (HE; 400xx).....	47
<b>Figura 11</b> - Imagem histológica do tendão calcâneo do coelho com celularidade aumentada (HE; 400xx) .....	47
<b>Figura 12</b> - Imagem histológica do tendão calcâneo do coelho com celularidade habitual (HE; 400xx).....	47
<b>Figura 13</b> - Imagem histológica do tendão calcâneo do coelho com presença de células inflamatórias: macrófagos (setas escuras) (HE; 400xx) .....	48
<b>Figura 14</b> - Imagem histológica do tendão calcâneo do coelho com presença de células inflamatórias: Linfócitos (seta vermelha e tracejado) (HE; 400 xx) .....	48

<b>Figura15</b> - Imagem histológica do tendão calcâneo do coelho mostrando fibras colágenas finas (verdes) ( <i>Picrosirius red</i> ; 400 xx) .....	48
<b>Figura16</b> - Imagem histológica do tendão calcâneo do coelho com Fibras colágenas espessas (vermelhas) ( <i>Picrosirius red</i> ; 400xx) ....	48
<b>Figura 17</b> - Imagem do retículo de <i>Weibel</i> extraído do monitor do computador: setas brancas indicando células que cruzaram traços do retículo (400xx) .....	49
<b>Figura 18</b> - Equipamento <i>Bio Rad</i> para leitura colorimétrica usado no estudo das MMPs.....	51
<b>Figura 19</b> - Equipamento de eletroforese usado nos estudos das MMPs .....	51
<b>Figura 20</b> - Bandas de degradação em gel <i>cromassie blue</i> eletroforese de MMP, forma ativa (seta amarela) e forma inativa, (seta vermelha) .....	51
<b>Figura 21</b> - Montagem da placa do teste ELISA com as amostras. Uma amostra por alvéolo.....	53
<b>Figura 22</b> - Lavadora de placas do teste ELISA .....	53
<b>Figura 23</b> - Placa do teste ELISA pronta para ser lida.....	53
<b>Figura 24</b> - Equipamento e monitor para leitura de placas de teste ELISA .....	53
<b>Figura 25</b> - Os gráficos A, B, C, D, E, F mostram as médias e os desvios padrões dos valores das variáveis de resistência mecânica.57	
<b>Figura 26</b> - Mostra os gráficos A, B, C, D, E, F, G, H, e I, referentes às medianas dos valores das variáveis histológicas, comparadas entre os grupos Teste e Controle .....	59
<b>Figura 27</b> - Gráfico mostra mediana dos valores das formas ativas das MMP2s do grupo Teste em relação a mediana dos valores das formas ativas das MMP2s do grupo controle .....	60
<b>Figura 28</b> - Os gráficos A e B mostram medianas dos grupos Teste e Controle; não houve alteração da expressão de IL1 e IL6 na comparação entre os grupos.....	61

## *Lista de Tabelas*

---

**Lista de Tabelas**

Tabela 1 - Diferenças mínimas detectáveis com o tamanho amostral determinado .....	41
Tabela 2 - Comparação entre grupos em relação às variáveis de resistência mecânica.....	56
Tabela 3 - Comparação entre os grupos em relação a variáveis histológicas.....	58
Tabela 4 - Comparação entre os grupos em relação às MMPs .....	60
Tabela 5 - Comparação entre os grupos em relação a ILs.....	61
Tabela 6 - Comparação dos resultados sobre resistência mecânica de diversos autores ao longo do tempo, após injeções intratendinosas de CE .....	65
Tabela 7 - Comparação dos resultados das variáveis histológicas de diversos autores ao longo do tempo, após injeção intratendinosa de CE.....	68
Tabela 8 - Comparação dos resultados das variáveis histológicas de diversos autores ao longo do tempo, após injeção peritendinosa de CE.....	71
Tabela 9 - Resultados comparativos de estudos envolvendo avaliação da expressão de MMPs após uso de CE em tendões.....	72
Tabela 10 - Demonstrativo de estudos com Interleucinas.....	74
Tabela 11 - Demonstrativo de estudos <i>in vitro</i> sobre efeitos de CE, adicionados a placas de cultura em relação a alterações celulares (proliferação, diferenciação, migração e apoptose) e de expressão do colágeno e proteoglicanas .....	77
Tabela A - Tabela Piloto dos Procedimentos.....	90
Tabela B - Dados Brutos das Variáveis de Resistência mecânica .....	92
Tabela C - Dados Brutos das Variáveis Histológicas do Tendão.....	93
Tabela D - Dados Brutos das Variáveis Histológicas do Paratendão .....	94
Tabela E - Dados Brutos das Variáveis de Expressão das MMPs .....	95
Tabela F - Dados Brutos das Variáveis de Expressão das Interleucinas .....	96



## *Lista de Abreviaturas e Siglas*

---

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

Beta:	Betametasona
CE:	Corticosteroide
Cm:	centímetro
CEUA:	Comitê de ética no uso de animais
CP:	Controle Placebo
CN:	Controle Normal
°C:	Grau Celsius
ELISA	Enzyme – Linked Immuno Sorbent Assay
EV:	Endovenoso
G:	Gauge: Unidade de medida de diâmetro
HE:	Tipo de coloração histológica: Hematoxilina-Eosina
HISTO:	Histologia
IL:	Interleucina
ILs:	Interleucinas
Intra:	Intratendinosa
Kg:	Quilograma
kDa:	KiloDaltons (unidade de massa atômica )
Peri:	Peritendinosa
mg:	Miligrama
ml:	Mililitros
mm:	Milímetros
MPa:	MegaPascal
MPD:	Membro pélvico direito
MPE:	Membro pélvico esquerdo
MMP:	Metaloproteinase da matriz
MMPs:	Metaloproteinases da matriz
µg:	Micrograma
N:	Newton
n:	Número de animais

nM:	Nanomoles
ng:	Nanograma
pg:	Picograma
picro:	Tipo de coloração histológica- picrosirius red
RES:	Resistência mecânica
TIMPs:	Inibidores Teciduais de Metaloproteinases
TNF:	Fator de necrose tumoral
UNESP:	Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
UNIPEX:	Unidade de pesquisa experimental da Faculdade de Medicina de Botucatu da UNESP

## *Sumário*

---

## SUMÁRIO

### RESUMO

### ABSTRACT

### LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### LISTA DE TABELAS

### LISTA DE ABREVIATURAS

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	30
<b>2. OBJETIVO</b> .....	36
<b>3. MÉTODOS</b> .....	38
3.1 - Aspectos éticos.....	38
3.2 - Locais de realização do estudo .....	38
3.3 - Desenho do estudo.....	38
3.4 - Critérios de inclusão e não inclusão .....	40
3.5 - Randomização.....	40
3.6 - Cálculo do tamanho da amostra .....	40
3.7 - Procedimento anestésico e método de injeção do medicamento e soro.....	41
3.8 - Manutenção .....	43
3.9 - Eutanásia e coleta dos espécimes .....	43
3.10 - Cegagem .....	44
3.11 - Estudo da resistência mecânica .....	44
3.12 - Estudo das variáveis histológicas .....	46
3.13 - Estudo das Metaloproteinases e Interleucinas .....	50
3.13.1 Metaloproteinases 1 e 2 .....	50
3.13.2 Interleucinas 1 e 6 .....	52
3.14 - Análise estatística dos resultados.....	54
<b>4. RESULTADOS</b> .....	56
4.1 - Resistência Mecânica .....	56
4.2 - Variáveis Histológicas.....	58
4.3 - Expressões de Metaloproteinases.....	60

4.4 - Expressões de interleucinas .....	61
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>63</b>
5.1 - Metodologia .....	63
5.2 - Resistência Mecânica .....	65
5.2.1 Injeções intratendinosas .....	65
5.2.2 Injeções peritendinosas .....	67
5.2.3 Comentários .....	67
5.3 - Variáveis Histológicas .....	68
5.3.1 Injeções intratendinosas .....	68
5.3.2 Comentários .....	70
5.3.3 Injeções peritendinosas .....	70
5.3.4 Comentários .....	72
5.4 - Expressões de MMPs .....	72
5.5 - Interleucinas .....	74
5.6 - Estudos <i>in vitro</i> .....	76
5.7 - Revisões Sistemáticas .....	78
5.8 - Considerações Finais .....	79
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>81</b>
<b>7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>83</b>
<b>8. APÊNDICE .....</b>	<b>90</b>

# *Introdução*

---

## 1. INTRODUÇÃO

Tendões são definidos como estruturas que conectam um músculo ou grupamento muscular ao osso. Originam-se no ventre muscular, mais precisamente na junção musculotendínea e se inserem no osso formando a êntese ou junção osteotendínea.

A arquitetura do tendão é composta hierarquicamente por moléculas de colágenos, que se unem em fibrilas, que formam as fibras, que se reúnem e formam os feixes ou fascículos primários e secundários, envoltos por tecido conjuntivo frouxo contendo células, vasos sanguíneos e nervos. Todo esse conjunto é envolvido externamente por uma bainha de tecido conjuntivo denso, dividida em duas camadas: uma presa ao tendão e outra ligada às estruturas adjacentes; entre essas duas camadas, forma-se uma cavidade revestida por células mesenquimais banhadas por líquido viscoso semelhante ao líquido sinovial, com água, proteínas, glicosaminoglicanas, glicoproteínas e íons<sup>1</sup>.

Os tendões têm a função de transmitir as forças geradas pelas contrações musculares, produzir o movimento e auxiliar a estabilização articular. Apresentam a capacidade de adaptar sua composição e estrutura em resposta aos diversos estímulos mecânicos e bioquímicos. As lesões dos tendões são uma parte significativa das doenças do aparelho locomotor. Alguns tendões são particularmente vulneráveis e mostram alterações degenerativas primárias, como o manguito rotador, patelar, calcâneo e o tendão tibial posterior.

Tendinopatia é um termo amplo usado para um grupo de afecções, de etiologia multifatorial, que acometem essas estruturas e que resultam em dor e vários graus de perda funcional. São fatores etiológicos extrínsecos: carga, anatomia local, postura, atividades ocupacionais e esportivas; sendo os intrínsecos: alterações metabólicas, autoimunes e fatores genéticos, como associação com genes do sistema ABO, e



polimorfismos que afetam expressões de componentes da matriz, destacando-se dentre elas as metaloproteinases<sup>2-5</sup>.

O tecido tendíneo é composto por uma pequena quantidade de células embebidas por uma matriz extracelular (MEC) abundante. O principal componente celular é o tenoblasto, em associação a outros tipos celulares, como os condrócitos, células sinoviais e epiteliais<sup>6</sup>.

Os tenoblastos representam linhagem celular imatura, de morfologia celular mais arredondada, citoplasma rico em organelas e alta atividade metabólica. Alinham-se em colunas ao longo do eixo longitudinal do tendão e de suas fibras colágenas. Os tenócitos, a forma amadurecida dos tenoblastos, possuem morfologia mais alongada. Esses dois tipos celulares representam 90-95% dos elementos celulares tendíneos, produzem colágeno, equilibram a composição da matriz extracelular, e assim, preservam a integridade do tendão. Devido à baixa celularidade e reduzida atividade mitótica destas células, a capacidade cicatricial do tendão é limitada<sup>6</sup>.

A matriz extracelular é dividida em dois componentes principais, denominados fibrilar e fundamental. O primeiro é composto principalmente pelas fibras de colágeno e elastina. Já o fundamental, pelas proteoglicanas e glicosaminoglicanas, água de solvatação, minerais, além de proteínas especializadas, tais como as glicoproteínas adesivas fibronectina e a tenascina-C, ácido hialurônico, metaloproteinases da matriz (MMPs) e seus inibidores (TIMPs)<sup>7</sup>. Estas moléculas interagem entre si e com as células tendíneas, de maneira bidirecional. Portanto, alterações celulares podem levar a consequências estruturais na MEC, bem como modificações na última podem desencadear o recrutamento, proliferação, apoptose e diferenciação celular<sup>8</sup>.

Até a década de 1990, as alterações dos tendões eram referidas como “Tendinites”, nas quais o componente inflamatório seria o principal responsável por essas afecções. Esse ponto de vista era

amplamente aceito nas estratégias de tratamento, acarretando terapêuticas baseadas em anti-inflamatórios esteroides e não esteroides.

Nas décadas de 1990 a 2000, houve uma série de mudanças na conceituação dessas alterações, direcionadas para alterações não inflamatórias e degenerativas, referidas como “Tendinopatias”, sendo o tratamento direcionado para as áreas de fisioterapia, terapia por ondas de choque, e para outros tipos de medicamentos como agentes esclerosantes, dextrose, toxina botulínica, como também injeções locais com células tronco, plasma rico em plaquetas.

Nos últimos anos, as considerações sobre tendinopatia como totalmente não inflamatória parece ser uma simplificação, e não é totalmente aceita por todos especialistas, surgindo assim estudos que buscam mostrar componentes do processo inflamatório presentes nas alterações dos tendões<sup>9</sup>.

Na fisiopatogenia, em estágio precoce, como resposta à compressão e ou sobrecarga, ocorre aumento do volume do tendão, por aumento das proteoglicanas e de suas ligações com água; no estágio seguinte, predomina degradação da matriz tecidual, separação do colágeno, proliferação de tenócitos anormais, e alguma neovascularização no tendão. Nestes dois estágios, pode haver certo grau de reversibilidade, mas no estágio avançado ocorre principalmente rompimento do colágeno, morte celular generalizada e ingresso mais intenso de neovascularização e inervação dentro da substância do tendão<sup>10</sup>. A dor na tendinopatia, tem várias explicações, sendo uma delas esse ingresso tanto de neo vasos quanto da inervação na substância do tendão, visto que, na arquitetura normal dos tendões, os vasos e nervos encontram-se entre os fascículos de colágenos e não na substância do tendão<sup>24</sup>.

As tendinopatias são doenças comuns, que afetam indistintamente tanto atletas quanto a população em geral. A prevalência, de transtornos dos tecidos moles (maioria em tendões), no Reino Unido, é

de 18 casos por 1000 pessoas<sup>11</sup>. Nos EUA, ocorrem, anualmente, 16,4 milhões de lesões em tendões e ligamentos, dos quais pelo menos 100.000 envolvem o tendão calcâneo<sup>12</sup>. A prevalência é maior em jovens entre 20 e 30 anos, e em pessoas de meia idade dos 40 aos 60 anos<sup>13</sup>. Nas lesões do manguito rotador do ombro, a prevalência aumenta com a idade, ultrapassando 50% aos 60 anos<sup>14</sup>. Outra alteração denominada de dedo em gatilho tem prevalência de 2 % na população geral, e de 20 % em pacientes com diabetes<sup>15</sup>.

Não existe uma diretriz única para o tratamento das tendinopatias. Embora sem evidências protocoladas, várias modalidades de tratamento são recomendadas: repouso, fisioterapia e medicamentos anti-inflamatórios não esteróides ou CE (via sistêmica, ou injeção local). Associadamente, terapêuticas específicas para fatores predisponentes e cirurgias, podem estar indicadas dependendo da região anatômica acometida e da gravidade da lesão.

Embora as alterações inflamatórias histológicas nas tendinopatias sejam discretas, o uso de injeções locais de CE persiste como prática entre ortopedistas, principalmente nos membros superiores<sup>9</sup>. Na verdade, os CE, além das conhecidas ações anti-inflamatórias, possuem outras atividades importantes que ampliam suas indicações. Uma destas atividades, com ação genômica, envolve a ativação de receptores citoplasmáticos, os quais migram para o núcleo das células, que atuam na transcrição e codificação de vários genes, entre outros, os que codificam as ILs. Outra propriedade reside no mecanismo de ação (tipo proteína-proteína) sem interação com o DNA, que leva à transcrição de vários genes codificantes de ILs, ciclooxygenases e colagenases<sup>16</sup>. Existe outra atividade, chamada ação não genômica, de ação muito rápida, com mecanismos não totalmente esclarecidos, na qual os CE são utilizados em atendimentos de emergências clínicas<sup>17</sup>.

Os CE, para uso em injeções locais são formulados em

soluções com sais que formam ésteres solúveis de liberação rápida (fosfatos mono e dissódico, succinatos, e outros) ou ésteres menos solúveis de liberação lenta (acetato, dipropionato, entre outros)<sup>18</sup>

O desenho de estudos sobre efeitos dos CE em tendões não são simples de se desenharem, pois dependem de muitas variáveis. O tipo de droga, dose, local e modo de administração devem ser considerados<sup>19</sup>. Estas e outras dificuldades metodológicas explicam as poucas evidências observadas na literatura a respeito dos benefícios ou efeitos deletérios dos CE no tratamento das tendinopatias<sup>20</sup>. Estudos clínicos que avaliaram injeções de CE em tendões, em grande parte, eram relatos de casos ou amostras reduzidas de pacientes, especialmente em tendões calcâneos e patelares nos quais os resultados eram, em geral, contraditórios e controversos<sup>20,21</sup>.

Entretanto, estudos recentes confirmaram a presença de células inflamatórias<sup>22</sup>, como também que as sobrecargas mecânicas podem causar respostas inflamatórias<sup>23</sup>. Tais fatos estimularam pesquisas sobre a expressão das ILs no início da cicatrização dos tendões<sup>9</sup>. Há limitação de conhecimentos a respeito da participação das ILs e de outros mediadores inflamatórios no reparo de tendões<sup>24, 25</sup>.

Há carência de estudos experimentais sobre os efeitos de injeção intratendinosa de CE que possibilite a correlação, em um mesmo momento experimental, de aspectos morfológicos, biomecânicos de resistência, envolvimento de mediadores inflamatórios (ILs) e da expressão das MMPs.

A hipótese do presente estudo foi que, no tempo de observação de quarenta e oito horas após as injeções de CE em tendões normais de coelhos não ocorram alterações na resistência mecânica, histologia e nas expressões de metaloproteinases e interleucinas.

*Objetivo*

---

## **2. OBJETIVO**

Comparar os desfechos histológicos, de resistência mecânica, a expressão das metaloproteinases (MMP-1 e MMP-2) e das interleucinas (IL-1 e IL-6) nos tendões calcâneos normais de coelhos 48 horas após terem sido submetidos à injeção de corticosteroide, soro ou nenhum procedimento.

*Métodos*

---

### 3. MÉTODOS

#### 3.1 - Aspectos éticos

O protocolo experimental deste estudo (Certificado CEUA, número 1047-2013) foi conduzido em conformidade com os princípios éticos na experimentação animal, aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

#### 3.2 - Locais de realização do estudo

O estudo foi realizado no Laboratório de Ensino, Pesquisa e Cirurgia Experimental “Prof. William Saad Hossne” e nos laboratórios de Ensaio Biomecânicos localizados na Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX) da Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP).

#### 3.3 - Desenho do Estudo

Ensaio experimental randomizado controlado com avaliador sem conhecimento dos grupos.

Foram selecionados setenta e três coelhos da raça New Zealand clinicamente saudáveis examinados por Médico Veterinário da UNIPEX, fornecidos pelo Biotério Central da UNESP - Campus de Botucatu.

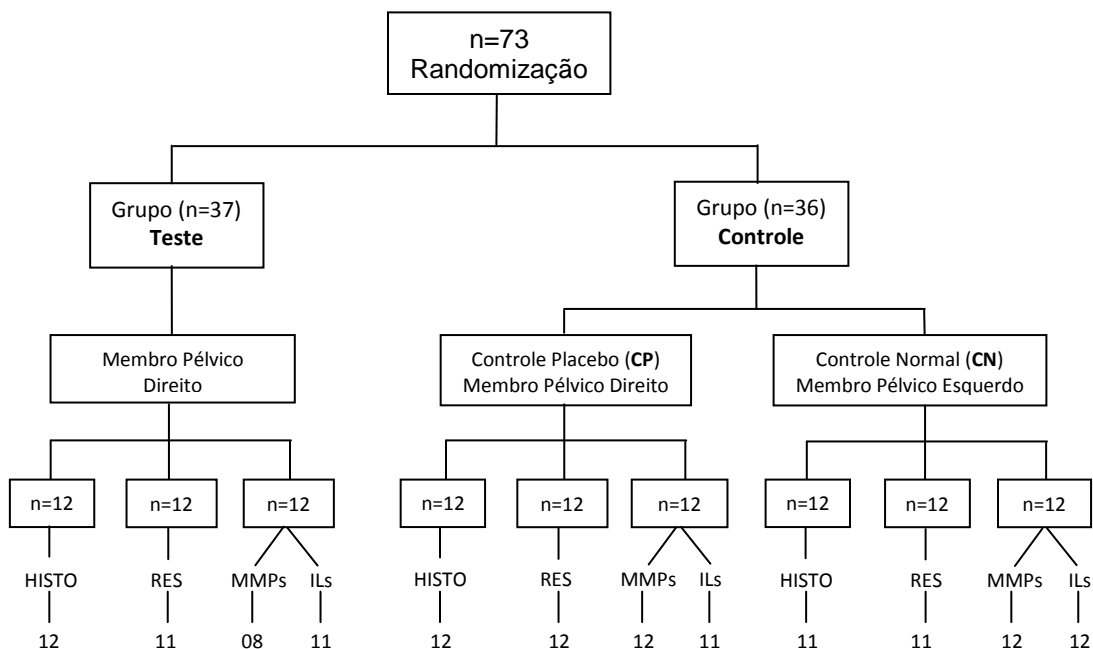
Os animais foram randomizados, submetidos ao fluxograma ilustrado (Figura 1) e divididos por aleatorização em dois grupos:

**Grupo Teste:** trinta e sete coelhos da raça New Zealand foram submetidos a injeção intratendinosa no tendão calcâneo do membro pélvico direito de CE: 0,2 ml da suspensão de dipropionato de betametasona e fosfato dissódico de betametasona (Diprospan®, Mantecorp – Hipermarcas S.A.). O volume da suspensão de 0,2 ml,



com 1,4 mg de Betametasona, para efeito anti-inflamatório, foi calculado de acordo com valores e equivalências recomendados para coelhos, em livro texto de Medicina Veterinária<sup>26</sup>.

**Grupo Controle:** trinta e seis coelhos da raça New Zealand, no qual o mesmo animal permitiu dois espécimes: um do tendão calcâneo direito e outro do tendão calcâneo esquerdo. O tendão calcâneo do membro pélvico direito foi submetido a injeção intratendinosa de 0,2 ml de solução de Cloreto de Sódio a 0.9% (Farmace®, Farmace Indústria Químico Farmacêutica Cearense Ltda) e foi denominado de Controle Placebo; o tendão calcâneo do membro pélvico esquerdo, sem nenhum procedimento, foi utilizado como Controle Normal.



n, número de animais ; CP, Controle Placebo; CN, Controle Normal  
 HISTO, Histologia; RES, Resistência Mecânica; MMPs, Metaloproteinases; ILs, Interleucinas

Figura 01 – Fluxograma dos procedimentos

### **3.4 - Critérios de Inclusão e não Inclusão**

#### **Inclusão**

- ✓ Coelhos machos
- ✓ Peso corporal entre dois e três quilogramas
- ✓ Com membros pélvicos normais.

#### **Não inclusão**

Qualquer tipo de alteração no exame clínico, verificado pelo médico veterinário da Unipex

### **3.5 - Randomização**

A sequência aleatória foi gerada pela função “*runif*”, do *software* R v 2.11.0. Essa função permitiu gerar uma sequência de “0” (zeros) e “1” (uns), ambos equiprováveis. O código “0” representou o Grupo Controle e o código “1” representou o Grupo Teste. O modo de chegada dos coelhos definiu como a sequência aleatória gerada foi aplicada. Com todos os coelhos disponíveis, eles foram enumerados de um a setenta e três. Assim, o coelho número um representou a posição número um da sequência aleatória, o coelho número dois representou a posição número dois da sequência e assim por diante também definindo os códigos. Como os coelhos chegaram sequencialmente, então a ordem de chegada foi igual a posição na sequência aleatória. Ou seja, o primeiro coelho disponível foi para o grupo Controle ou para o grupo Teste dependendo do código associado à primeira posição da sequência aleatória e assim por diante (Tabela A – Apêndice).

### **3.6 - Cálculo do tamanho da amostra**

Para se determinar o tamanho dos grupos a serem estudados, a fim de se obter poder estatístico de 80 %, com nível de significância de

0,05 e supondo amostragem aleatória simples com distribuição normal dos desfechos, elaborou-se uma tabela (Tabela 1), que permite detectar diferenças mínimas iguais às apresentadas na tabela. O número das amostras para o Grupo Teste foi de trinta e sete animais e para o Grupo Controle, de trinta e seis animais.

Tabela 1 – Diferenças mínimas detectáveis com o tamanho amostral determinado

Desfechos									
Histologia	TEN_TD	RUP_TD	C_INF_TD	FG_TD	FF_TD	TEM_PD	C_INF_PD	FG_PD	FF_PD
DMS	1.1	0.06	0.05	12	10	0.08	3	14	7
Interleucinas	IL6	IL1							
DMS	60	290							
Metaloproteinase	MMP2_INAT	MMP2_AT	MMP1_INAT	MMP1_AT					
DMS	0.3	1.5	0.3	0.4					
Resistência	DEFMAX	FCMAX	EFMAX	EAFMAX	TFMAX	MODEL			
DMS	2300	120	400	3200	14	60			

TEN\_TD, Tenócitos HE Tendão; RUP\_TD, Ruptura do colágeno HE Tendão; C. INF\_TD, Células Inflamatórias HE Tendão; FG\_TD, Fibras grossas picro Tendão; FF\_TD, Fibras finas picro tendão; TEN\_PD, Tenócitos HE Peritendão; C\_INF\_PD, Células Inflamatórias HE Peritendão; FG\_PD, Fibras grossas peritendão; FF\_PD, Fibras finas peritendão; DEFMAX, Deformação máxima, FCMAX, Força ou carga máxima; EFMAX  
DMS= Diferença mínima detectável

### 3.7 - Procedimento anestésico e método de injeção do medicamento e soro

Todos os coelhos foram submetidos a anestesia geral EV com 50 mg/kg de cloridrato de quetamina e 1 mg/kg de cloridrato de xilazina, seguido de tricotomia e antissepsia. A injeção dos medicamentos foi feita sempre a dois cm (medida com paquímetro) proximais da inserção do tendão calcâneo, sem incisão cirúrgica (Figura 2) com volume de 0,2 ml, por meio de punção com agulha BD-(Becton Dickinson Ind. Cirug. Ltda- Curitiba-PR) de 0,45x 13mm (26 G x 1/2"), com a ponta da agulha semi dobrada (Figura 3 e 4) e seringa de 1 ml, BD-Becton Dickinson Indústria Cirúrgica. Ltda- Curitiba-PR.



Figura 2 - Medida padronizada com paquímetro do ponto onde foram feitas as injeções, a 2 cm da inserção do tendão calcâneo do coelho, mantendo o tornozelo em flexão dorsal.

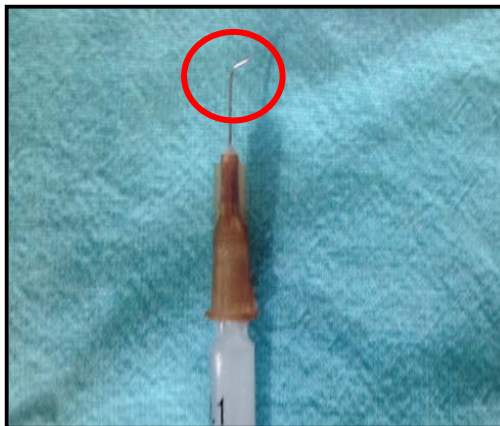


Figura 3 - Agulha com a ponta semidobrada.



Figura 4 - Injeção no tendão calcâneo do coelho, em local previamente marcado, com aplicação feita com a seringa na horizontal e não na perpendicular ao tendão.

### **3.8 Manutenção**

Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura, iluminação e ventilação adequadas, em jaulas individuais e foram alimentados com ração e água potável.

### **3.9. Eutanásia e coleta dos espécimes**

Quarenta e oito horas após o procedimento, foi realizada eutanásia com dose letal de anestésico. O tendão foi dissecado, exposto e retirado integralmente a quatro cm proximais de sua inserção no osso calcâneo (Figura 5). Os espécimes foram identificados em recipientes com letras e números sem citação a quais grupos pertenciam e seguiram para conservação conforme o tipo de exame:

Os trinta e sete espécimes dos testes de resistência mecânica foram congelados em freezer a -20° C.

Os trinta e seis espécimes dos exames histológicos foram conservados em formalina neutra a 10% antes do processamento.

Para a realização dos exames das MMPs e ILs, os trinta e seis espécimes foram divididos em duas partes iguais, resultando em setenta e dois espécimes: metade para MMPs e metade para ILs. Os setenta e dois espécimes foram congelados imediatamente em nitrogênio líquido e depois conservados em Freezer a -80°C. O total de espécimes obtidos foi de cento e quarenta e quatro. Por problemas técnicos nos equipamentos de conservação, desprezamos nove espécimes, e portanto os estudos foram realizados em cento e trinta e cinco espécimes.

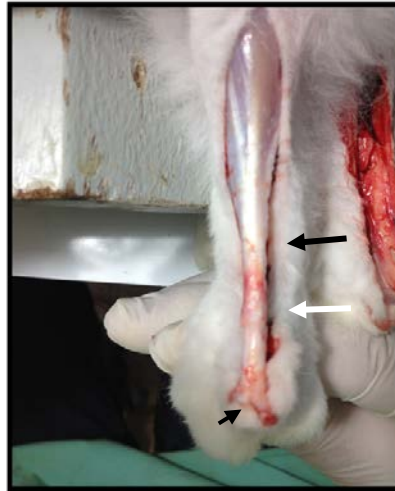


Figura 5 - Tendão calcâneo de coelho dissecado (seta branca) a ser retirado íntegro, desde a junção miotendínea (seta escura grande) até a inserção no osso calcâneo (seta escura pequena).

### 3.10. Cegagem

Os avaliadores de todos os desfechos, não tinham conhecimento sobre qual grupo os espécimes pertenciam. Ao final das avaliações, os dados foram organizados em planilhas *Excel* e encaminhados para análise estatística (Tabelas B a F - Apêndice).

### 3.11 - Estudo da Resistência mecânica

Os espécimes foram submetidos a ensaio biomecânico de tração.

No momento do ensaio, todos os espécimes foram descongelados à temperatura ambiente e presos pelas extremidades em presilhas especiais para tendões. Foi determinada a área de secção do tendão a partir da medida da circunferência e pela aplicação das fórmulas  $R=C/2\pi$ , e  $A=\pi.R^2$ , na qual R, era o raio, C, a circunferência, e A, área de secção. Em seguida, as presilhas com o tendão fixado, foram montadas axialmente em máquina universal de ensaio mecânico (EMIC-DL<sup>®</sup>10.000 Equipamentos e Sistemas de Ensaio Ltda, Curitiba), (Figura 6 e 7), com

célula de carga de 1000 N e velocidade de aplicação de 30 mm/min. O valor da área de secção foi incorporado ao *software* M-teste que forneceu os gráficos força x deformação (Figura 8) e valores das seguintes variáveis das propriedades mecânicas: Força Máxima (força em N= Newtons, suportada até a ruptura); Deformação (alongamento, em milímetros); Energia na Força Máxima (N.mm); Energia por área na Força máxima (N.mm/mm<sup>2</sup>); Tensão na Força Máxima (MPa); Módulo de Elasticidade (MPa)<sup>27-29</sup>.



Figura 6 - Máquina de ensaio biomecânico, EMIC.

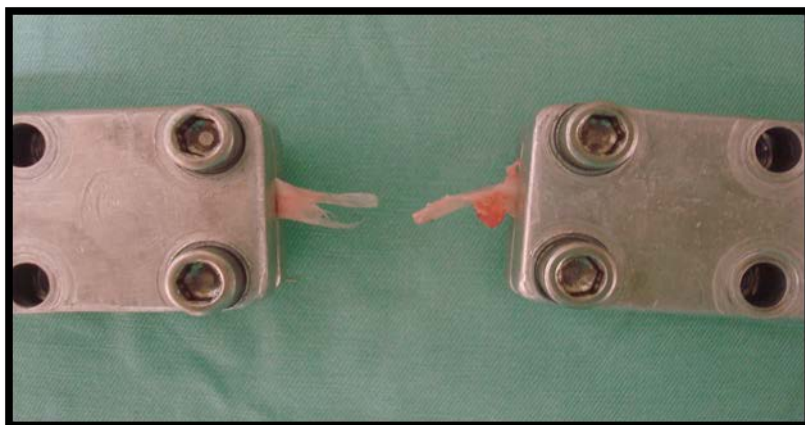


Figura 7 - Tendão roto após teste.





O método utilizado foi o histomorfométrico.

O sistema de imagens foi composto por uma Câmera Leica (DFC 295), conectada a um microscópio Leica (DM 4000 B LED, USA). As imagens foram transmitidas a um monitor (Analisador Leica DM 4000) e carregadas em um computador (*Pentium 1330 MHz, Intel, Santa Clara, CA, USA*). O software *Image Pro Plus 6.0* (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA) foi usado para identificar e quantificar as variáveis (Figuras 9 a 16).

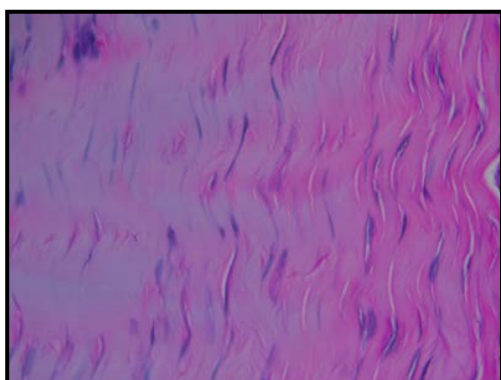


Figura 9 - Imagem histológica do tendão calcâneo do coelho sem ruptura do colágeno ( HE: 400xx).

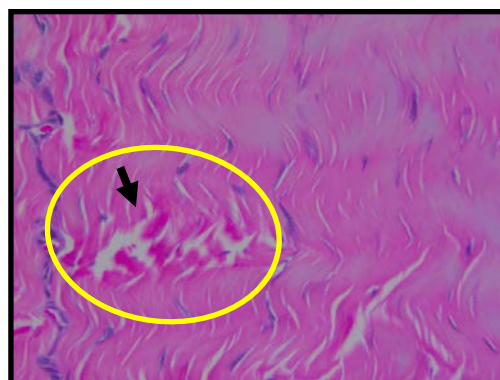


Figura 10 - Imagem histológica do tendão calcâneo do coelho com ruptura do colágeno (seta escura) (HE; 400xx).

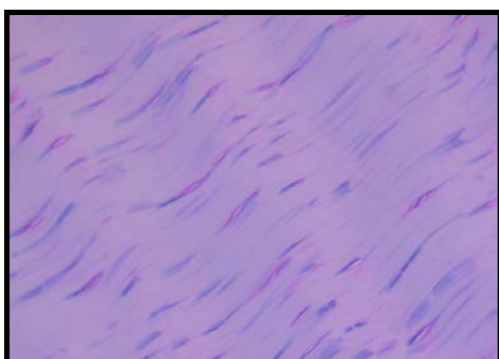


Figura 11 - Imagem histológica do tendão calcâneo do coelho com celularidade aumentada (HE; 400xx).

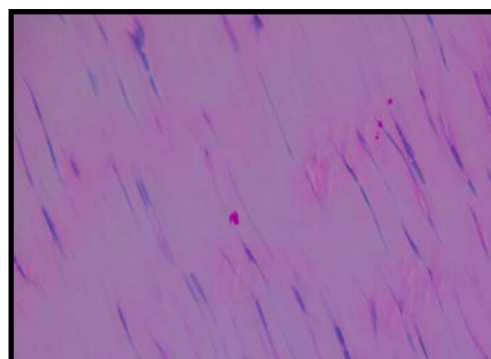


Figura 12 - Imagem histológica do tendão calcâneo do coelho com celularidade habitual (HE; 400xx).

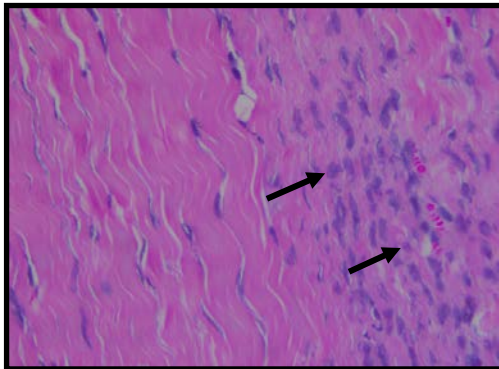


Figura13 - Imagem histológica do tendão calcâneo do coelho com presença de células inflamatórias: macrófagos (setas escuras) (HE: 400xx).

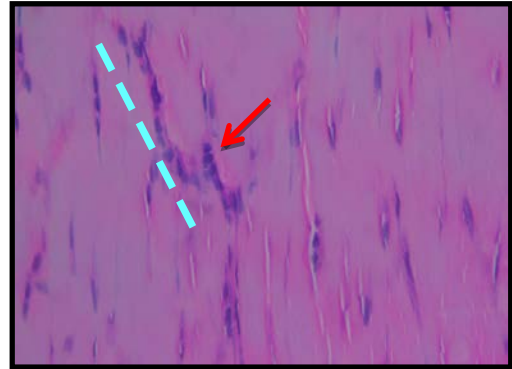


Figura 14 - Imagem histológica do tendão calcâneo do coelho com presença de células inflamatórias: Linfócitos (seta vermelha e tracejado) (HE; 400 xx).

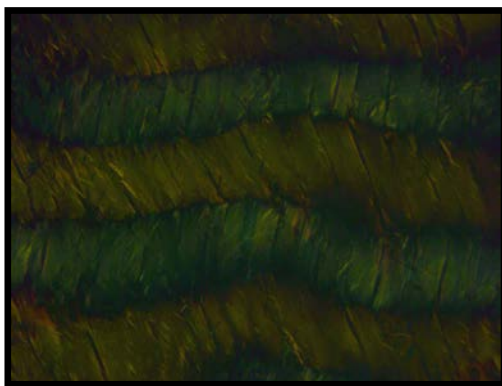


Figura15 - Imagem histológica do tendão calcâneo do coelho mostrando fibras colágenas finas (verdes) (Picrosirius red; 400 xx).

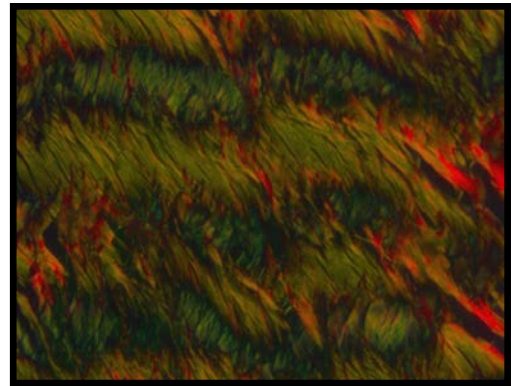


Figura16 - Imagem histológica do tendão calcâneo do coelho com Fibras colágenas espessas (vermelhas) (Picrosirius red; 400xx).

Cada lâmina corada, tanto com Hematoxilina Eosina quanto com *Picrosirius red*, geraram vinte fotografias, sendo dez do tendão e dez do peritendão.

As lâminas coradas com *Picrosirius red* foram usadas para avaliar e quantificar as fibras grossas e as fibras finas no tendão e peritendão. Por meio do *Image pro plus*, a fração de área das fibras colágenas foi medida pela área delimitada pelas fibras dos tendões e peritendões observadas em campos com grande aumento (400xx). O

limiar para colágeno espesso (amarelo e vermelho) e fino (verde) foi estabelecido em todas as lâminas histológicas coradas pelo aumento do contraste e alteração da cor dos colágenos em questão, tornando-os facilmente identificáveis. A fração de área do colágeno foi expressa pela taxa da área de colágeno medido dividido pela área total do campo histológico. Essa medida, expressa em porcentagem, foi realizada em dez campos histológicos, selecionados randomicamente conforme aleatorização de todos os campos. O resultado final foi expresso como média dos campos quantificados.

As lâminas coradas com Hematoxilina e Eosina foram usadas para quantificar ruptura do colágeno, presença de células inflamatórias e celularidade (quantificação de tenócitos), usando 10 campos de grande aumento, selecionados randomicamente, pelo método estereológico de *point-counting*. O método utilizado de morfometria pelo retículo de Weibel (Figura 17) foi por meio de um sistema de cinquenta traços em área conhecida (62,500 mm<sup>2</sup> em 400x), na qual cada célula, ou imagem de ruptura do colágeno ao cruzarem traços do retículo eram contados; sendo que esse número de células ou rupturas contados, foi dividido por cinquenta (número total de traços) fornecendo resultados quantitativos<sup>30,31</sup>.

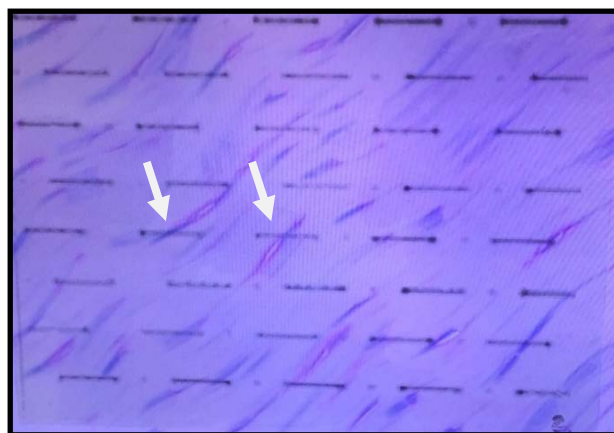


Figura 17 - Imagem do retículo de *Weibel* extraído do monitor do computador: setas brancas indicando células que cruzaram traços do retículo (400xx).

### 3.13 - Estudo das Metaloproteinases e Interleucinas

Os espécimes inteiros foram cortados ao meio transversalmente a dois cm proximais da extremidade de inserção, sendo uma metade para análises de expressão MMPs e outra metade para estudos da expressão das ILs. Os estudos foram direcionados para exames das formas ativas e inativas das MMPs 1 e 2, e das ILs 1 e 6.

#### 3.13.1 Metaloproteinases 1 e 2

O método utilizado foi o da Zimografia.

As metades dos espécimes foram trituradas em homogeneizador ultra-turrax (IKA), com tampão de extração (Tris-HCl 50mM, NaCl 0,2M, CaCl<sub>2</sub> 10mM, Triton X-100 2,5%, inibidores de protease 1%). Após duas horas a 4°C, foram centrifugadas a 4000 Rpm, por vinte minutos, para eliminar resíduos sólidos. A quantificação da concentração proteica nas amostras foi feita pelo ensaio de *Bradford*, por leitura colorimétrica, usando o reagente *Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad)* (Figura 18) e a albumina sérica bovina como padrão. Foram feitas alíquotas das amostras com concentrações iguais para aplicação no gel de eletroforese. Os géis de poliacrilamida foram preparados com 1 mg/mL de gelatina, para detecção de gelatinases, e aproximadamente 0,5 mg/mL de colágeno bovino tipo I (código: C9791, Sigma), para detecção de collagenases. As amostras foram aplicadas em gel com tampão de amostra (Tris-HCl 62,5mM, glicerol 30%, azul de bromofenol 1:1000 m/v), na proporção 2:1, sendo 35µg para detecção de gelatinases e 20µg para collagenases. Após a corrida de eletroforese (Figura 19) para separação por peso molecular, os géis foram lavados em Triton X-100 para retirada do decil sulfato de sódio e em Tris-HCl 50 mM, pH 8,4, para retirar o Triton X-100 e assim possibilitar a verificação da atividade enzimática; após o que, foram incubados por dezesseis horas em solução de incubação (Tris-

HCl 50mM, pH 8,4, CaCl<sub>2</sub> 50μM). As bandas de degradação (Figura 20) foram observadas por marcação em *Cromassie Blue* e os géis foram fotografados usando o sistema *Image Quant LAS 4000*.

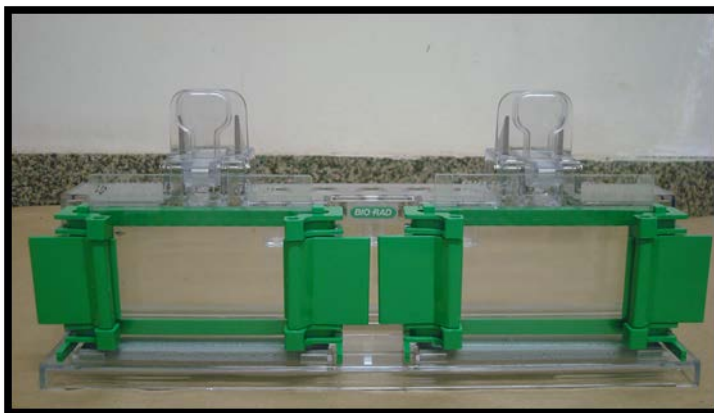


Figura 18 - Equipamento *Bio Rad* para leitura colorimétrica usado no estudo das MMPs.



Figura 19 - Equipamento de eletroforese usado nos estudos das MMPs.

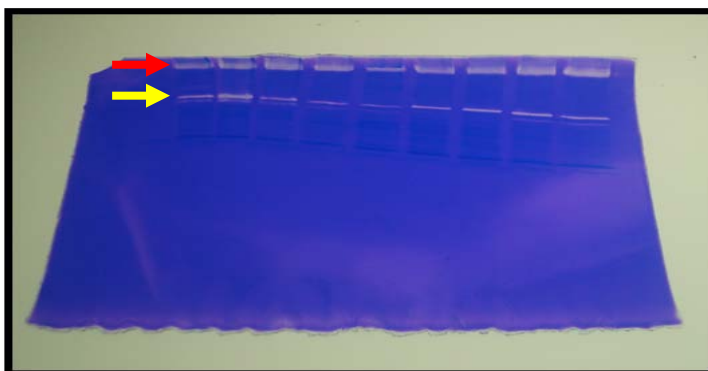


Figura 20 - Bandas de degradação em gel *cromassie blue* eletroforese de MMP, forma ativa (seta amarela) e forma inativa (seta vermelha).

A quantificação da degradação foi feita por densitometria em analisador de imagens *White Darkhon, Software Image Quant TL*, normalizando os volumes das bandas com parâmetros de uma amostra que foi incluída em todos os géis. As collagenases ou gelatinases foram analisadas pelas bandas claras. A MMP-2 foi observada como duas bandas com tamanhos de 72 e 62 kDa (formas inativa e ativa)<sup>32</sup>. A MMP-1 foi identificada nos géis com colágeno, como uma forma inativa de 60 kDa e uma forma ativa de 54 kDa.

### 3.13.2 Interleucinas 1 e 6

O método utilizado foi o do imunoensaio enzimático.

Utilizou-se o método *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*, ELISA, no qual ocorre identificação de anticorpos e ou antígenos por anticorpos marcados com uma determinada enzima.

Uma das metades dos espécimes (a outra metade foi usada para exame das MMPs) foi homogeneizada no Turrax, passada no Sonicador, depois no gelo (para que a membrana celular se rompa), e centrifugada a 5000 g /4° C, 5', (g = equivalente a rotações por minuto indicando velocidade de centrifugação) e com separação do sobrenadante em alíquotas e, por fim, armazenadas a - 80 ° C. Realização do preparo dos tampões PBS e DPBS, dos anticorpos de captura, dos anticorpos de detecção, da Streptavidin e dos kits, com padrões para *Recombinant Rabbit IL-1alfa* (RPO346U-005, marca Kingfisher Biotech, Inc, U.S.A.) e para *Recombinant Rabbit IL-6* (SEA a79 Rb, marca Cloud-Clone Corp., U.S.A.). Um dia anterior ao ensaio, foi feita sensibilização da placa, diluição e pipetagem de 100 microlitros na placa; no dia do ensaio, esvaziou-se a placa, adicionou-se PBS à temperatura ambiente, pipetagens, lavagens da *Streptavidin-HRP*, do substrato TMB, e da solução *Stop*, finalizando leitura, com parâmetros a 450 nm, unidade ng/ml e curva log log, e quantificação em pg/ml<sup>33,34</sup>. (Figuras 21 a 24)

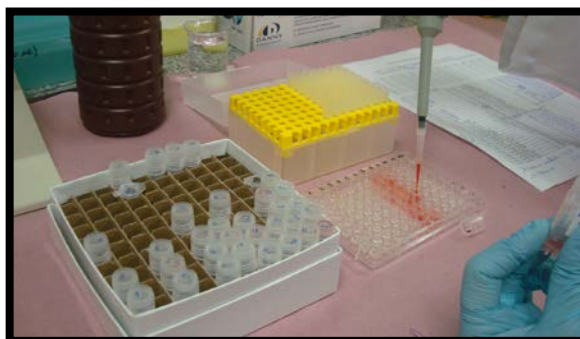


Figura 21 - Montagem da placa do teste ELISA com as amostras. Uma amostra por alvéolo.

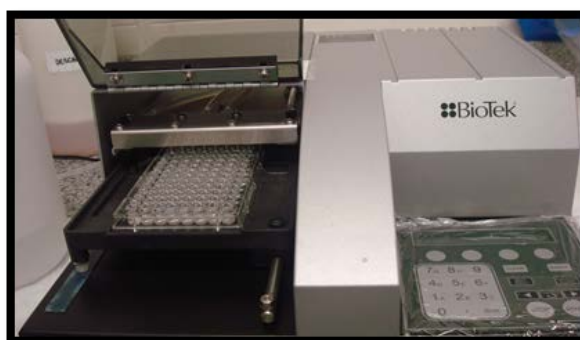


Figura 22 - Lavadora de placas do teste ELISA.

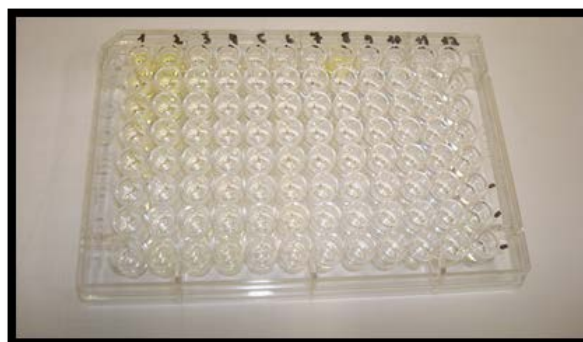


Figura 23 - Placa do teste ELISA pronta para ser lida.



Figura 24 - Equipamento com monitor para leitura de placas de teste ELISA.

### **3.14 - Análise estatística dos resultados**

A comparação entre os grupos em relação às variáveis histológicas e de expressão de MMPs e de ILs foram feitas pelos testes não-paramétricos de Kruskal-Wallis e pelos testes de Dunn para comparações múltiplas.

A comparação entre os grupos em relação às variáveis de resistência mecânica foram feitas pelo teste paramétrico ANOVA, após verificação dos pressupostos de simetria das variáveis e igualdade de variâncias.

As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas se  $p < 0,05$  com análise estatística feita com o *software* SPSS v 21.0.



*Resultados*

---

## 4. RESULTADOS

### 4.1 - Resistência Mecânica

Os resultados obtidos na avaliação da resistência mecânica estão expressos na tabela 2. Não houve diferença significativa entre os grupos estudados.

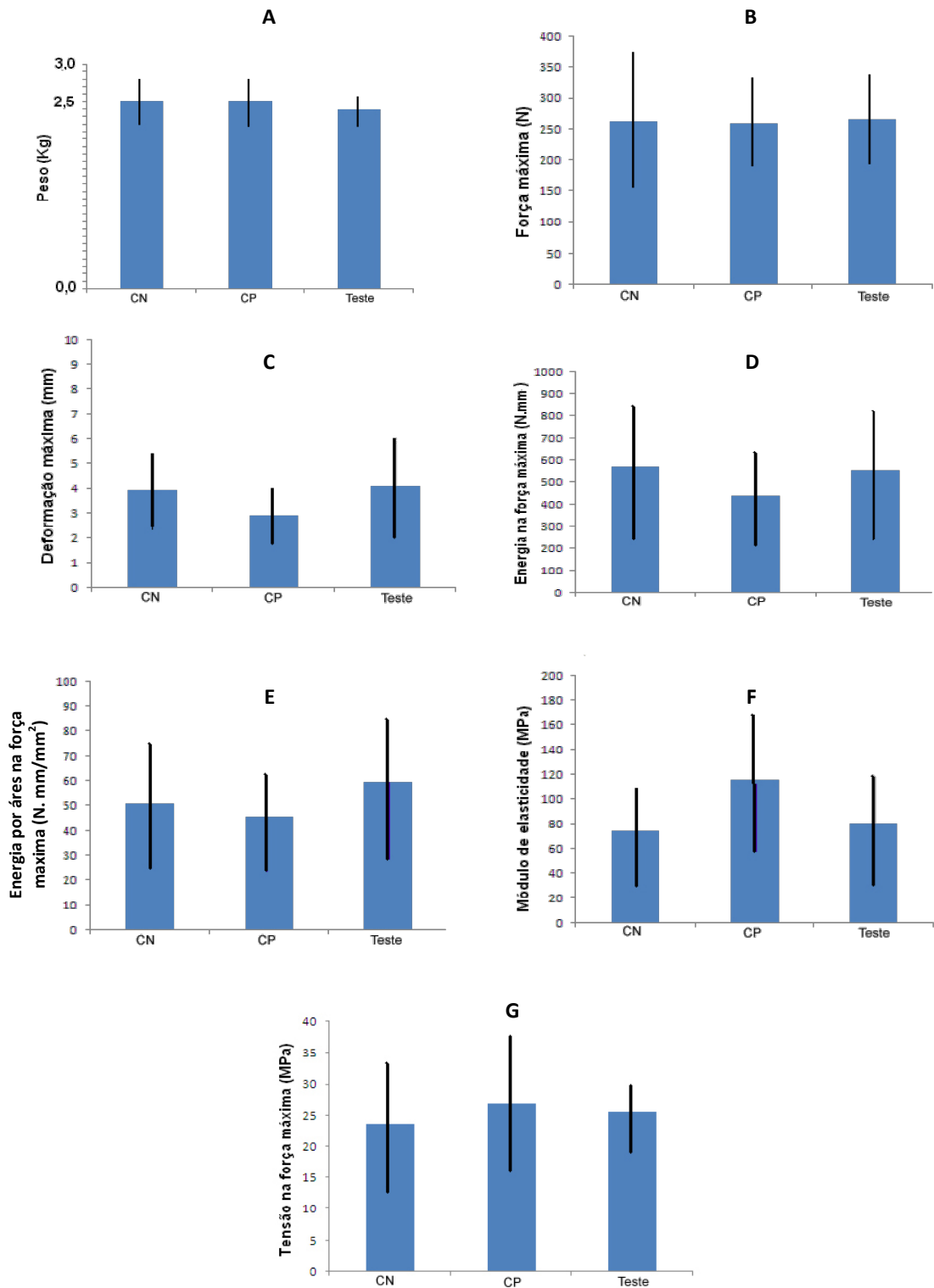
Tabela 2 – Comparação entre grupos em relação às variáveis de resistência mecânica.

Variável	CN (n=11)		CP (n=12)		Teste (n=11)		P*
	Média	dp	Média	dp	Média	dp	
Peso (g)	2.5	0.3	2.5	0.3	2.4	0.2	0.571
Força máxima (N)	261.7	109.8	258.8	68	265.6	70.6	0.982
Deformação máxima (mm)	3.9	1.6	2.9	1.1	4.1	1.9	0.167
Energia na força máxima (N. mm)	569.1	309.2	440.4	207.1	555.7	286.9	0.457
Energia por área na força máxima (N. mm/mm <sup>2</sup> )	50.8	27	45.3	22.4	59.7	28	0.419
Módulo de elasticidade (Mpa)	73.9	42.3	115.6	56.6	79.7	42.8	0.092
Tensão na força máxima (Mpa)	23.6	10.8	26.8	10.7	25.5	6.3	0.715

ANOVA\*

CN, Controle normal; CP, Controle placebo.

Os gráficos mostram as médias e os desvios padrões dos valores das variáveis de resistência mecânica (Figura 25). Não houve diferença significativa entre os grupos estudados.



CN, Controle normal; CP, Controle placebo.

Figura 25 - Os gráficos A, B, C, D, E, F e G mostram as médias e os desvios padrões dos valores das variáveis de resistência mecânica.

## 4.2 - Variáveis Histológicas

Os resultados das variáveis histológicas, com as comparações entre os grupos Teste e Controle estão dispostos na tabela 3.

Tabela 3 – Comparação entre os grupos em relação a variáveis histológicas.

	Grupos												p <sup>(1)</sup>
	CN			CP				Teste					
	n	Med	Min	Max	n	Med	Min	Max	n	Med	Min	Max	
Peso (Kg)	11	2.39	2.15	2.73	12	2.43	2.15	2.81	12	2.23	2.00	2.99	0.478
Tenócitos HE													
Tendão	10	2.80	0.44	3.50	12	2.16	0.98	5.40	12	2.49	1.50	3.50	0.610
Ruptura do colágeno HE													
Tendão	11	0.02	0.00	0.12	12	0.04	0.00	0.12	12	0.04	0.00	0.14	0.841
C. Infl. HE													
Tendão	11	0.00	0.00	0.12	12	0.00	0.00	0.04	12	0.00	0.00	0.06	0.956
<b>Fibras grossas</b>													
<b>picro Tendão</b>	11	<b>50.60</b>	33.10	63.70	12	<b>63.00</b>	40.70	82.00	11	59.80	41.00	68.90	<b>0.041<sup>(2)</sup></b>
Fibras finas picro													
tendão	11	6.40	0.00	12.50	12	3.80	0.00	11.70	11	4.50	0.30	24.00	0.799
Tenócitos HE													
Peritendão	11	0.05	0.02	0.22	12	0.06	0.00	0.18	12	0.07	0.01	0.12	0.682
C. Infl. HE													
Peritendão	11	2.00	0.00	9.00	12	1.00	0.00	4.00	11	2.00	0.00	3.00	0.083
Fibras grossas													
Peritendão	11	38.50	19.10	54.00	12	33.15	23.10	49.10	12	39.60	17.60	52.00	0.265
Fibras finas													
Peritendão	11	11.00	0.80	16.80	12	11.35	0.80	15.30	12	11.40	2.10	17.00	0.982

(1) Teste de Kruskal – Wallis

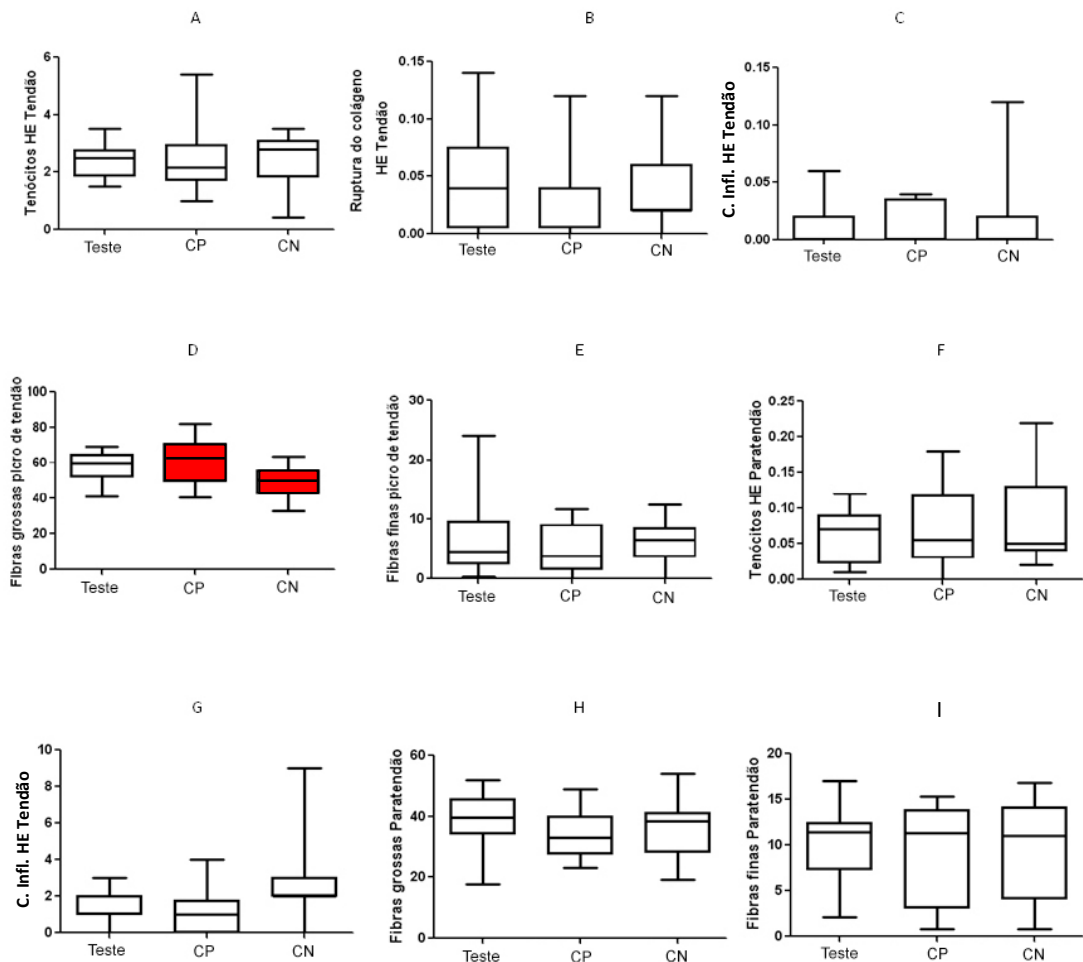
(2) Controle normal < Controle placebo pelo teste de Dunn para comparações múltiplas (p<0,05)

Resumo descritivo em mediana (Mínimo-Máximo)

CN, Controle normal; CP, Controle placebo, C. Infl., Células inflamatórias.

As variáveis histológicas analisadas estão mostradas na tabela 3. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos Teste e Controle. A análise comparativa entre o Controle Placebo e o Controle Normal revela diferença estatística (destaque em negrito), para a variável “Fibras grossas picro tendão”, através do teste de Dunn, para comparações múltiplas (p=0,041).

A figura 26 mostra os gráficos referentes às medianas dos valores das variáveis histológicas, comparadas entre os grupos Teste e Controle.



CP, Controle placebo; CN, Controle normal; C. Infl., Células inflamatórias.

Figura 26 – Mostra os gráficos A, B, C, D, E, F, G, H, e I, referentes às medianas dos valores das variáveis histológicas, comparadas entre os grupos Teste e Controle.

As variáveis histológicas analisadas estão mostradas na figura 26. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos Teste e Controle. A análise comparativa entre o Controle Placebo e o Controle Normal revela diferença estatística, (no gráfico D) para a variável “Fibras grossas picro tendão”, através do teste de Dunn, para comparações múltiplas (p=0,041).

### 4.3 - Expressões de Metaloproteínases

Na tabela 4 estão as comparações entre os grupos Teste e Controle em relação às MMPs.

Tabela 4 – Comparação entre os grupos em relação às MMPs.

	Grupos												p <sup>(1)</sup>
	CN			CP			Teste						
	n	Med	Min	Max	n	Med	Min	Max	n		Med	Min	
Peso (Kg)	12	2.47	2.12	2.93	12	2.47	2.12	2.93	12	2.35	2.19	2.58	0.218
MMP2 inativa	12	1.07	0.89	1.71	12	1.07	0.75	1.51	8	1.19	0.58	1.48	0.593
<b>MMP2 ativa</b>	<b>12</b>	<b>1.44</b>	<b>0.33</b>	<b>4.33</b>	<b>12</b>	<b>1.38</b>	<b>0.90</b>	<b>5.00</b>	<b>8</b>	<b>0.47</b>	<b>0.30</b>	<b>1.67</b>	<b>0.027</b> <sup>(2)</sup>
MMP1 inativa	12	1.15	0.62	1.59	12	1.13	0.70	1.47	8	1.19	0.94	1.34	0.958
MMP1 ativa	12	0.91	0.35	1.35	12	0.90	0.38	1.45	8	0.49	0.28	1.05	0.080

(1) Teste de Kruskal - Wallis

(2) Teste < Controle (p<0,05; teste de Dunns para comparações múltiplas entre os grupos)

Resumo descritivo em mediana (Mínimo-Máximo)

CN, Controle normal; CP, Controle placebo.

Os grupos Teste e Controle revelam diferença significativa (valores expressos em negrito) em relação a MMP-2 ativa, valores menores no grupo Teste.

A figura 27 mostra o gráfico com a comparação entre as medianas dos grupos Teste e Controle.

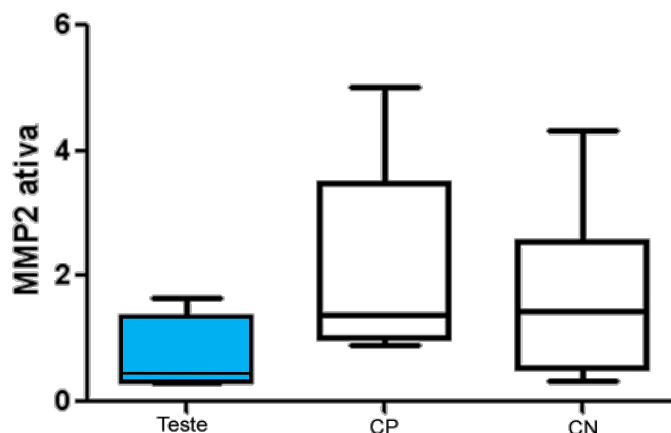


Figura 27 - Gráfico mostra mediana dos valores das formas ativas das MMP2s do grupo Teste em relação a mediana dos valores das formas ativas das MMP2s do grupo controle.

O grupo Teste revela no gráfico da figura 27, valores menores que os do grupo Controle.

#### 4.4 - Expressões de Interleucinas

A tabela 5 mostra a comparação entre os grupos Teste e Controle, em relação à expressão das ILs e, indica que não houve diferenças significantes entre os grupos.

Tabela 5 – Comparação entre os grupos em relação a ILs.

	Grupo												p <sup>(1)</sup>
	CN				CP				Teste				
	N	Med	Min	Max	n	Med	Min	Max	n	Med	Min	Max	
PESO (Kg)	12	2.467	2.122	2.925	11	2.454	2.122	2.925	11	2.348	2.189	2.583	0.356
IL6	12	92	37	182	11	83	36	194	11	106	26	157	0.938
IL1	12	275.5	145	463	11	321	109	629	11	311	91	1145	0.638

(1) Teste de Kruskal - Wallis  
Resumo descritivo em mediana (Mínimo-Máximo)  
CN, Controle normal; CP, Controle placebo.

A figura 28 mostra os gráficos A e B, referentes às medianas dos valores das ILs, dos grupos Teste e controle.

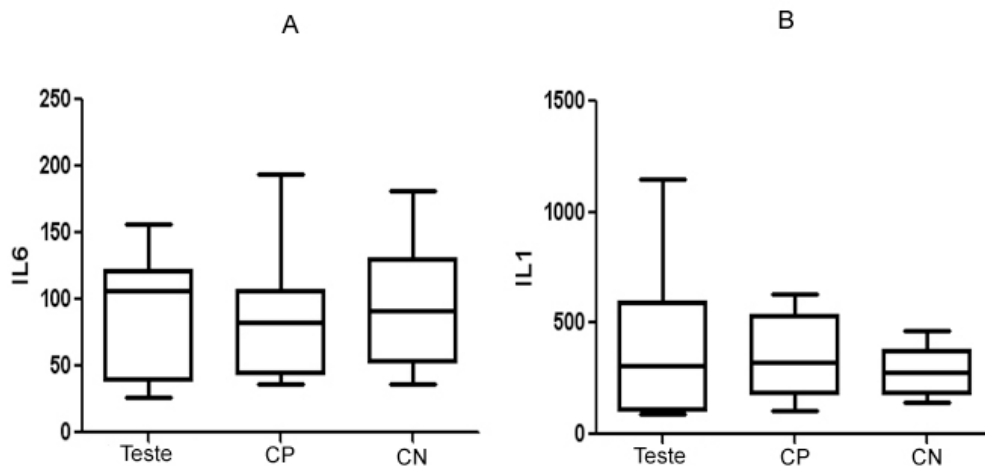


Figura 28 – Os gráficos A e B mostram medianas dos grupos Teste e Controle; não houve alteração da expressão de IL1 e IL6 na comparação entre os grupos.

*Discussão*

---



## **5. DISCUSSÃO**

### **5.1 - Metodologia**

A opção para o presente estudo usando modelo de experimentação em animal, ao invés de em humanos, foi devido a restrições éticas na obtenção de biópsias e dificuldade de obtenção de uma amostra homogênea. Em estudos prévios, as biópsias, em geral, são extraídas da população mais idosa com lesões crônicas e os controles, em geral, de população jovem, portanto com viés importante<sup>22</sup>. Nos ensaios com animais, há possibilidade de melhor controle das variáveis e homogeneidade dos resultados.

A escolha do coelho como animal de experimentação foi pelo tamanho relativamente grande do tendão calcâneo, com características anatômicas e fisiológicas semelhantes ao tendão calcâneo dos humanos<sup>35</sup>.

Os CE e outras drogas podem ser injetados diretamente nos tendões (intratendão ou no peritendão), pois são estruturas com anatomia e localização superficiais, e as doses usadas podem ser menores que as sistêmicas<sup>23</sup>.

A opção de realizar o estudo em tendões normais de coelhos, com tempo de observação de 48 horas, utilizando uma única aplicação do CE, e o modo de aplicação intratendinosa, foi baseado em artigos de Balassubramanian e Prathap<sup>36</sup> e Kennedy e Willis<sup>37</sup>, que mostraram “necrose” do colágeno e diminuição da resistência dos tendões. Os achados destes autores causaram impacto entre os especialistas e contribuíram para a controvérsia a respeito de injeções de CE em tendões. No presente estudo usamos também injeção única, intratendinosa e dose (usada por Kennedy e Willis), semelhantes aos estudos de Balassubramanian e Prathap<sup>36</sup> e Kennedy e Willis<sup>37</sup>, para comparações de resultados.

No presente estudo, os membros contralaterais não foram usados como controles nos animais submetidos à injeção de CE, uma vez que estudos com injeções de CE em tendões bilaterais de coelhos mostraram efeitos aditivos nos desfechos estudados.

A opção de estudo em tendões normais foi escolhida porque modelos experimentais de lesão em tendões, por traumas ou por injeções de outras substâncias<sup>38,39</sup>, já foram usados, mas ainda carecem de validação.

O método de histomorfometria foi escolhido pela possibilidade de quantificação com maior objetividade nos resultados das variáveis histológicas, além da pesquisa não só focal, e, sim ao redor da área de injeção do CE ou do soro. As variáveis de fibras grossas e finas representam a quantidade de colágenos I e III, respectivamente, e foram incluídas no estudo para verificação de alteração da relação entre elas, sendo o normal existir maiores quantidades de fibras grossas.

A escolha das MMPs1 e as MMPs2 foi feita, pois essas enzimas clivam colágenos fibrilares I, II, e III, sendo que as MMPs2, também degradam colágeno amorfo<sup>7</sup>. Após as injeções de CE, poderíamos ter a degradação de uma ou de várias formas de colágeno, fato que motivou a opção, de verificar as expressões dessas duas MMPs.

Uma das atividades dos macrófagos, na fase inicial da inflamação aguda, seria a produção de IL1, IL6, e TNF, as quais agem na indução da adesão endotelial dos leucócitos que com o aumento da permeabilidade vascular, chegariam em maior número ao local agredido<sup>7</sup>. No presente estudo, o tempo de observação de quarenta e oito horas (considerado como fase inicial de eventual inflamação) nos levou a pesquisar as expressões de IL1 e IL6, eventualmente relacionadas às respostas ao CE.

## 5.2 - Resistência Mecânica

### 5.2.1 Injeções intratendinosas

Os resumos de alguns estudos sobre os efeitos de injeção de CE na resistência mecânica estão dispostos na tabela 6.

Tabela 6 – Comparação dos resultados sobre resistência mecânica de diversos autores ao longo do tempo, após injeções intratendinosas de CE.

Autores Ano	Animal (n) Tipo de CE	Tendão Injetado	Número de injeções (Tempo de observação)	Resultados do grupo injetado em relação aos controles (Equipamento)	Conclusões
Kennedy & Willis 1976	Coelhos (4) Betameta sona	Calcâneo	1 aplicação (2 dias)	Força de ruptura 35% menor (Instron)	Enfraquecimento do tendão com CE
Hugate et al 2004	Coelhos (18) Trianci- nolona	Calcâneo	3 aplicações (21 dias)	Diminuição da força de ruptura, da energia na força máxima, da tensão; do módulo de elasticidade, e aumento da deformação (Interlaken)	CE com efeito deletério nos tendões. Injeções bilaterais com efeito aditivo.
Martins et al 2011	Ratos (30) Betame tasona	Calcâneo	3 aplicações (15 dias)	Sem alterações da Força de ruptura, e da Energia absorvida (Emic)	Sem efeitos deletérios nesse período de tempo e na concentração usada de CE.

Kennedy e Willis<sup>37</sup> mostraram, em tendão normal de calcâneo de coelhos, após 48 horas de uma única injeção intratendinosa de CE, que a força de ruptura foi 35 % menor que nos controles. Contudo, este estudo apresenta algumas limitações importantes: os dados foram obtidos de máquina de ensaio Instron (na opinião de outros pesquisadores, com

esse equipamento os resultados podem não ser confiáveis, visto que os dados eram gravados em osciloscópio, sem registro em tempo real de variáveis utilizadas para medir resistência mecânica<sup>40</sup>); além disso os resultados representaram a somatória dos dados de testes em separado para cada um dos componentes do tendão calcâneo (gastrocnêmio, solear e plantar delgado), fato que poderia interferir com as avaliações; o número da amostra foi pequeno, quatro animais, para exame desse desfecho em particular; e somente foi avaliada a força de ruptura.

Hugate et al.<sup>41</sup>, usaram tendões calcâneos de coelhos, após injeções de CE, intratendinosas, repetidas (uma dose cada sete dias, com tempo de observação de 21 dias), usando máquina de ensaio Interlaken. Observaram diminuição da força de ruptura, do módulo de elasticidade, da tensão de ruptura, da energia absorvida, e aumento da deformação total, concluindo que os tendões ficaram enfraquecidos. Demonstraram que animais submetidos a injeções bilaterais tinham efeitos aditivos, isto é, o CE injetado no tendão de um membro de determinado lado, pode interferir no resultado quando o CE é injetado no outro membro no mesmo animal, em relação ao enfraquecimento dos tendões. Esse estudo apresentou tamanho de amostra adequado e houve randomização, porém sem cegamento dos avaliadores e ausência de grupo controle sem intervenção. Os autores revelaram limitação do estudo no sentido de que usaram modelo tendão - osso, ao invés de tendão - tendão, isto é, os exames foram realizados com uma das extremidades do tendão fixa no osso calcâneo, fato que poderia alterar os resultados sobre as propriedades mecânicas.

Martins et al.<sup>42</sup>, mostraram que em tendões calcâneos de ratos, com injeções de CE intratendinosas, repetidas, a cada cinco dias e com tempo de observação de 15 dias, usando equipamento para estudo de resistência mecânica EMIC-DL® 10.000, não se verificou diferenças significantes, quanto a resistência mecânica, entre o grupo injetado com

CE e os controles. O estudo utilizou somente dois parâmetros das propriedades mecânicas (força de ruptura e energia absorvida). Houve alta frequência de rupturas dos corpos de prova na junção miotendínea, talvez pela característica de ter sido realizado em tendões calcâneos de ratos, mais finos, com eventual problema técnico nas presilhas que fixavam as extremidades dos tendões no equipamento utilizado.

No presente estudo, diferentemente de Kennedy e Willis<sup>37</sup>, não se observou diferenças estatisticamente significantes das variáveis de resistência mecânica no grupo injetado com CE em relação aos controles. A amostra foi expressivamente maior, os grupos foram randomizados ao acaso, com procedimento de aleatorização adequado e cego, o modo de aplicação das drogas foi padronizado. Os testes foram feitos com o tendão íntegro e não subdividido, e com presilhas especiais que fixam as extremidades dos espécimes no aparelho evitando rupturas tanto na junção miotendínea quanto na inserção do tendão ao osso, e realizadas em equipamento, com validação comprovada em vários estudos prévios feitos com o mesmo<sup>27-29</sup>.

### **5.2.2 Injeções peritendinosas**

Shapiro et al.<sup>43</sup>, mostraram que em estudo com injeções peritendinosas de CE, repetidas, um grupo submetido a três aplicações e tempo de observação de 42 dias e outro grupo, com três aplicações e tempo de observação de 105 dias, nos quais ocorreram aumento da força de ruptura e da energia absorvida, o que indicaria fortalecimento dos tendões, explicada por aderências entre o peritendão e o tendão, provocadas pelo CE.

### **5.2.3 Comentários**

Os estudos sobre alterações nas propriedades mecânicas dos tendões após injeções de CE proporcionaram resultados controversos. É

possível que o tipo de animal, tipo de equipamento usado e o tamanho da amostra, modo de aplicação, interferiram na disparidade dos resultados.

### 5.3 - Variáveis Histológicas

#### 5.3.1 Injeções intratendinosas

Os estudos histológicos envolvendo injeções intratendinosas de CE são apresentados na tabela 7.

Tabela 7 - Comparação dos resultados das variáveis histológicas de diversos autores ao longo do tempo, após injeção intratendinosa de CE.

Autores Ano	Modelo (n) Dose CE	Tendão Injetado	Número de Injeções (Tempo de observação)	Resultados dos grupos injetados em relação aos controles	Conclusões
Balassu bramanian &Prathap, 1972	Coelho (3) Dose: 5mg Hidro cortisona	Calcâneo	1 aplicação (2 dias)	Necrose do colágeno	Pacientes submetidos a injeções locais de CE podem sofrer rupturas dos tendões
Kennedy &Willis, 1976	Coelho (4) Dose: 1,5mg 3,0 mg Betametasona	Calcâneo	1 aplicação (2 dias)	Necrose do colágeno	Relaciona essa necrose com enfraquecimento do tendão
Tatari et al, 2001	Ratos (26) Dose: 0,7 mg Betametasona	Calcâneo	4 aplicações (28 dias) 10 aplicações (28 dias)	Espessamento do tendão, aderências peritendinosas, Infiltrado de mononucleares	As injeções foram prejudiciais. Sugerem que a injeção de CE poderia até servir de modelo experimental de tendinopatia
Martins et al, 2011	Ratos(45) Dose:0,7 mg Betametasona	Calcâneo	3 aplicações (15 dias)	Infiltrado de linfócitos; colágeno imaturo, perda de paralelismo das fibras colágenas; sem diferenças significantes	Após injeções houve perda do paralelismo das fibras, provavelmente por lesão das agulhas. Não se confirmou efeito deletério das injeções de CE.

Balassubramanian e Pathrap<sup>36</sup> por meio de estudos em tendões calcâneos normais de coelhos, quarenta e oito horas após uma única injeção intratendinosa de CE, relataram área de “necrose” do colágeno. Concluíram, com base nesses achados, que estas alterações poderiam causar ruptura espontânea dos tendões em pacientes após injeção intratendinosa de CE. Devido ao tamanho reduzido da amostra para o desfecho estudado (três animais), e de que o exame histológico foi focal e qualitativo, houve possibilidade de viés nesse estudo, que poderia gerar conclusões enganosas.

Kennedy e Willis<sup>37</sup> realizaram, com tamanho reduzido de amostra para o desfecho estudado (quatro animais) em tendões calcâneos normais de coelhos com única injeção intratendinosa de CE. Os autores relataram “necrose” do colágeno nos tendões do grupo injetado e áreas císticas no colágeno dos tendões dos grupos controles, concluindo que ambas as alterações poderiam enfraquecer o tendão. Contudo, o reduzido tamanho amostral (quatro animais) poderia ser considerado inadequado.

Tatari et al.<sup>39</sup>, em modelo experimental de injeções intratendinosas repetidas de CE em tendões calcâneos normais de ratos e, utilizando como controles, tendões contralaterais lesados por meio de compressões realizadas com pinça cirúrgica “*Halstead*”, mostraram espessamentos dos tendões e aderências peritendinosas, concluindo que as injeções de CE foram prejudiciais. Sugeriram que a injeção de CE poderia servir como modelo experimental de tendinopatia. O estudo utilizou número exagerado de injeções (dez aplicações) em intervalo de tempo pequeno de trinta dias, no qual a somatória dos traumas das agulhas nos tendões injetados poderiam ser a razão dos efeitos encontrados.

Contrariando conclusões do estudo de Tatari et al.<sup>39</sup>, após injeções repetidas de CE, intratendinosas, em tendões calcâneos normais

de ratos, Martins et al.<sup>42</sup> mostraram resultados com poucas alterações, como infiltrado de linfócitos e presença de colágeno imaturo. Verificaram também perda do paralelismo das fibras colágenas, mas que ocorreram tanto nos tendões injetados quanto nos controles, atribuindo que estas alterações poderiam ser devido ao trauma provocado pela agulha de punção.

### **5.3.2 Comentários**

Assim, devemos pensar em alterações devidas às agressões geradas pelas agulhas, não só devido repetição das aplicações, mas também devido ao diâmetro interno das agulhas ( medidas em *Gauges*), que poderiam alterar os resultados e suas interpretações.

Diferentemente dos estudos de Balassubramanian & Prathap<sup>36</sup> e Kennedy & Willis<sup>37</sup>, nos quais os cortes histológicos foram focalizados na região de penetração da agulha, no presente estudo, houve um rastreamento mais amplo, englobando dez campos, aleatorizados, na região da punção e arredores, além do uso de tecnologia com digitalização de imagens e, principalmente, histomorfometria. As análises com cegamento dos grupos e rigorosa randomização dos animais constituíram diferencial importante em relação aos estudos prévios que relataram alterações prejudiciais de injeção de CE em tendões. O presente estudo não rotulou como necrose a desorganização ou mesmo ruptura de fibras colágenas, visto que habitualmente o termo necrose deveria ser usado para morte de células ou tecidos vivos.

### **5.3.3 Injeções peritendinosas**

A tabela 8 mostra resumos de estudos histológicos após injeções peritendinosas de CE.



Tabela 8 - Comparação dos resultados das variáveis histológicas de diversos autores ao longo do tempo, após injeções peritendinosas de CE.

Autores Ano	Modelo (n) Tipo de CE	Tendão Injetado (modo de aplicação)	Número de Injeções (Tempo de observação)	Resultados dos grupos injetados em relação aos controles	Conclusões
Tillander et al, 1999	Ratos (31) Triancinolona	Manguito Rotador (espaço Subacromial)	3 aplicações (21 dias)  5 aplicações (35 dias)	Não causaram necrose do colágeno  Causaram necrose do colágeno	Houve mudanças nas estruturas do tendão e recomenda uso cauteloso
Akipnar et al, 2002	Ratos (16) Metilprednisolona e Betametasona	Manguito Rotador (espaço Subacromial)	4 aplicações (56 dias)	Até 71% de Fragmentação do colágeno, Infiltrado de linfócitos	Podem causar mudanças prejudiciais nas estruturas dos tendões
Shapiro et al, 2007	Coelhos (20) Metilprednisolona	Calcâneo (peri- tendinosa)	3 aplicações (42 dias)  3 aplicações (105 dias)	Macroscopia: aderências peritendinosas  Microscopia: Sem diferenças significantes	Injeções peritendinosas podem não ser prejudiciais

Os estudos de Tillander et al., e Akpinar et al., encontraram espessamentos, aderências tendinosas, infiltrado de células inflamatórias e necrose do colágeno, concluindo por recomendarem uso cauteloso do CE, uma vez que poderia haver mudanças estruturais prejudiciais aos tendões<sup>44,45</sup>. Shapiro et al.<sup>43</sup>, não encontraram alterações histológicas significantes, concluindo que injeções peritendinosas poderiam não ser prejudiciais.

### 5.3.4 Comentários

Os resultados controversos destes estudos poderiam estar relacionados às diversas metodologias utilizadas, como tipo de animal, tamanho amostral e técnica do exame histológico.

## 5.4 – Expressões de MMPs

A tabela 9 mostra resumos de alguns estudos sobre injeções de CE e as MMPs.

Tabela 9 - Resultados comparativos de estudos envolvendo avaliação da expressão de MMPs após uso de CE em tendões.

Autores Ano	Modelo Tipo de Estudo	Tendão Estudado (Modo de Aplicação)	Resultados dos grupos em que se usou CE, em relação aos controles	Conclusões
Tempfer et al 2009	Material humano <i>In vitro</i>	Biópsia Manguito rotador (adição ao meio de cultura)	Diminuíram: MMP 2,8,9,13; Diminuíram: Síntese de colágeno Diminuíram: Migração celular Aumentaram: TIMP ; adipócitos	Recomenda aplicação cautelosa de CE
Sendzik et al 2010	Material Humano <i>In vitro</i>	Explante Flexor da mão (adição ao meio de cultura)	Aumentaram: MMP 1, 13 Diminuíram: síntese de colágeno Produz apoptose	Risco de tendinopatia aumentado na associação CE e quinolonas
Lee et al 2013	Ratos  <i>In vivo</i>	Manguito rotador Lesado (no espaço sub acromial sob visão direta)	Não alteração: MMPs Não alteração: TNF (efeito anti- inflamatório do GC; nos controles aumentaram) Aumentaram: TIMP1 e 3 e fibronectina em três dias Aumento: de quantidade de colágeno III, em relação ao I, em sete dias Normalização de todas variáveis em 42 dias.	Antes do tratamento cirúrgico, pode-se tentar injeções com CE, mesmo com provável efeito adverso na fase inicial, pois não afetaria o resultado a longo prazo.

As MMPs são enzimas produzidas principalmente pelos fibroblastos, leucócitos e agem na degradação da matriz extracelular. A secreção de MMPs é induzida por fatores de crescimento e, entre outros, pelas ILs e pela atividade de fagocitose dos macrófagos, mas é inibida pelos esteroides, entre outras substâncias

As MMPs têm papel importante nas alterações e na reparação das tendinopatias, por meio da ação de degradação e restauração dos componentes da matriz extracelular dos tendões<sup>45</sup>.

Tempfer et al.<sup>46</sup>, em estudo *in vitro*, por meio de biópsias de tendões do manguito rotador, obtidas de pacientes operados para estabilização do ombro, num seguimento de oito semanas, observaram que o CE adicionado ao meio de cultura obtido das biópsias, causou diminuição da expressão das MMP2s, da migração celular e da síntese de colágeno<sup>44</sup>. Sendzik et al.<sup>47</sup>, em estudo também *in vitro*, usando explantes de tendões flexores da mão obtidos de pacientes submetidos a cirurgias, adicionaram CE ao meio de cultura e observaram aumento da expressão de MMP 1 e 13, diminuição da síntese do colágeno, e alterações degenerativas tipo apoptose celular<sup>44</sup>. Tempfer et al.<sup>46</sup> e Sendzik et al.<sup>47</sup>, concluíram que com o uso do CE poderia haver enfraquecimento ou risco de tendinopatias, mas a transposição de dados obtidos *in vitro*, para *in vivo* são questionáveis.

Lee et al.<sup>21</sup> em estudo *in vivo* em ratos, avaliaram tendões do músculo infraespinhoso do manguito rotador, previamente lesados cirurgicamente tanto no grupo Teste, quanto no grupo Controle. No grupo Teste após uma única injeção de CE no espaço subacromial, os autores observaram que em três dias houve aumento da TNF no grupo controle, e não houve alteração nos tendões injetados, devido, provavelmente, ao efeito antiinflamatório do CE; no grupo Teste após sete dias houve aumento na quantidade de colágeno III, em relação ao colágeno I, sugerindo que o tendão reagiria à lesão, com produção de colágeno III, composto por fibras menores e com maior facilidade de produção do que as do colágeno I; a normalização ocorreu em 14 dias; não houve

alterações nas análises das expressões de MMPs e TIMPs. No grupo Teste, ocorreu aumento de fibronectina após três dias, que representaria o estado de degeneração dos tendões, e normalização entre sete a 42 dias. Nesse estudo, cujo objetivo foi encontrar expressão de mediadores inflamatórios, não houve randomização dos animais, nem cegagem dos avaliadores além de amostra reduzida de animais para cada desfecho (quatro animais).

As comparações dos resultados do presente estudo em relação às MMPs com dados observados na literatura encontram-se prejudicadas devido à grande variedade metodológica.

No presente estudo, foram feitas verificações quantitativas de expressão das metaloproteinases MMP1 e MMP2 por meio da Zimografia, encontrando-se diminuição estatisticamente significativa da expressão de MMP 2 no grupo que recebeu injeções de CE em relação aos controles. Essa diminuição de MMP2 poderia possibilitar menor degradação do colágeno.

### 5.5 – Interleucinas

A tabela 10 mostra resumos de estudos com ILs, embora não relacionados a injeção de CE.

Tabela 10 - Demonstrativo de estudos com Interleucinas.

Autor Ano	Modelo (n) Tipo de Estudo	Tendã	Tempo de Observação	Injeção ou adição de corticosteroides	Resultados
Millar et al 2010	Humano (20) <i>In vitro</i>	Manguito rotador (Biópsia)	14 dias	Não	Presença de células inflamatórias (macrófagos e mastócitos)
Legerhotz et al 2011	Humano (77) <i>In vitro</i>	Calcâneos e do Tibial posterior	28 dias	Não	As IL6 estão expressas na Tendinopatia, embora a sua presença não indique inflamação
Ackemann et al 2012	Humano (09) <i>In vivo</i>	Calcâneos (pós-rupturas)	14 dias	Não	Aumento das IL6 Diminuição das IL1

Avanços nos estudos por imunohistoquímica e análises de expressão gênica, em seres humanos e animais, tem mostrado presença de reação inflamatória, tanto na tendinopatia estabelecida quanto na resposta precoce à sobrecarga, com presença e envolvimento de macrófagos, interleucinas, ciclooxigenases<sup>9</sup>.

Millar et al.<sup>22</sup> em estudo *in vitro* utilizando biópsias do músculo subescapular, em pacientes submetidos a estabilização artroscópica, encontraram alterações imunohistoquímicas com infiltrado inflamatório de macrófagos e mastócitos, concluindo que haveria necessidade de mais estudos para melhor compreensão da participação dos mediadores inflamatórios nas tendinopatias.

Em 2012, Legerlotz et al.<sup>48</sup>, observaram *in vitro* que amostras de tendões de cadáveres, bem como de pacientes com tendinopatias, apresentaram aumento dos mediadores inflamatórios nas tendinopatias do calcâneo, por meio da expressão de IL6. Não encontraram alteração de IL6 no tendão do tibial posterior e, correlacionaram esse fato devido à solicitação mecânica do tendão calcâneo ser diferente do tendão do tibial posterior.

Ackermann et al.<sup>25</sup>, estudaram *in vivo*, a expressão de ILs, em pacientes com 14 dias de pós-operatório de cirurgia para correção de rupturas do tendão calcâneo, por meio de microdiálise intersticial entre o tendão e o peri-tendão. Nos tendões operados, comparados com os controles (que eram os tendões sadios contralaterais não operados) também submetidos a microdiálise encontraram diminuição da IL1 e aumento da IL6, sugerindo que o aumento de IL6 teria a função dupla, de aumento da síntese de colágeno e anti-inflamatória.

Nas condições do presente estudo, não houve diferença entre os grupos, e mostrou-se que o CE não altera a expressão de ILs, lembrando que normalmente os CE só agem na inibição de ILs na presença de inflamação.

## **5.6 – Estudos *in vitro***

Na tabela 11 estão reunidos resumos de estudos *in vitro*, com adição de CE às placas de cultura, em relação a alterações celulares (proliferação, diferenciação, migração e apoptose celular) e de expressão do colágeno e proteoglicanas.

Tabela 11 – Demonstrativo de estudos *in vitro* sobre efeitos de CE, adicionados a placas de cultura em relação a alterações celulares (proliferação, diferenciação, migração e apoptose) e de expressão do colágeno e proteoglicanas.

Autor Ano	Modelo Estudo	Tendão	Tipo de CE adicionado	Tempo de observação	Resultados	Conclusões
Tsai et al 2002 2003	Ratos <i>In vitro</i>	Células do Tendão .. Calcâneo	Dexametasona	7 dias	Diminuição da migração e crescimento das células do tendão	Cicatrização retardada
Scutt et al 2005	Ratos <i>In vitro</i>	Tenócitos da cauda do rato	Dexametasona	21 dias	Diminuição do número de células  Diminuição da síntese de colágeno	Os resultados dependeram da concentração do CE. Outros mecanismos desconhecidos, não genômicos, agiram na modulação de genes da proliferação celular.
Wong et al 2005	Humano <i>In vitro</i>	Células do Tendão Patelar	Triamcinolona Dexametasona	7 dias	Diminuição Proteoglicanas	Diminuição da propriedade elástica predispondo a ruptura
Wei et al 2006	Ratos <i>In vivo e In vitro</i>	Manguito rotador	Metil - Prednisolona	7 dias 21 dias 35 dias	Aumento em 4 vezes mais o Colágeno III	Efeito Deletério dos CE nas primeiras semanas
Haraldsson et al 2006  2008	Ratos <i>In vitro</i>  <i>In vivo</i>	Fascículos de colágenos  Injeções em tendão cauda do rato	Metil- prednisolona	3 dias  7 dias	Invitro: Diminuição em 45 % a resistência mecânica  Invivo: em 16% a resistência mecânica	O CE incubado em fascículos de tendão teria efeito deletério em 3 a 7 dias.  O CE injetado em tendão da cauda do rato teria efeito deletério em 3 dias
Zhang et al 2012	Humano e Ratos	Células do tendão patelar	Dexametasona	1 dia  21 dias	Aumento da proliferação celular se dose CE<1000nM Diminuição da proliferação celular se dose CE >1000nM, e indução da não diferenciação dos tenócitos	Com 21 dias, o CE causaria supressão da expressão de colágeno tipo I; também levaria a formação de tecidos adiposos, cartilagosos e ósseos, fazendo o tendão ficar susceptível a rupturas

Estudos *in vitro* são importantes nos testes iniciais, mas podem ter falsos resultados<sup>19</sup>. A magnitude destes efeitos observados *in vitro*, permanecem desconhecidos se extrapolados para *in vivo*<sup>49,50</sup>.

## 5.7 – Revisões Sistemáticas

Em revisão sistemática, Coombes et al., 2010<sup>13</sup> em 41 artigos randomizados, com inclusão de 2672 participantes, avaliaram a eficácia no tratamento de tendinopatias por meio de injeções de CE em comparação com placebo; e também com outros medicamentos ou tratamentos e intervenções não cirúrgicas. Foi verificado que a injeção de CE promoveu redução da dor na epicondiloalgia somente no curto prazo. Em outras tendinopatias, houve redução de dor com injeções de hialuronato de sódio (em períodos intermediários e longos), toxina botulínica (no curto prazo) e proloterapia (período intermediário). A ruptura de tendão foi verificada em somente 0,1%, dentre 991 casos estudados com injeção de CE. Os autores concluíram a necessidade de melhores estudos com metodologias, tais como alocação oculta, intenção de tratar, mascaramentos, recrutamento de grandes tamanhos de amostras, padronizações de intervenções.

Dean et al.<sup>51</sup>, em outra revisão sistemática, com 50 artigos sobre administração local de CE nos tendões, sendo 36 em animais (25 *in vivo* e 11 *in vitro*), 13 estudos em humanos (12 *in vivo* e 1 *in vitro*) e 1 humano e animal (*in vitro*). Os estudos *in vitro* mostraram efeito significativamente negativo na viabilidade celular e os estudos *in vivo* mostraram desorganização e necrose do colágeno após injeções de CE. Quanto às propriedades mecânicas, foram significativamente reduzidas, embora, os estudos apresentassem grande variabilidade de métodos. Em resumo, esta revisão sugeriu que o uso de CE estaria associado a prejuízos para os tendões a longo prazo. Porém, as conclusões não puderam ser efetivas, devido às limitações e qualidade questionável dos



estudos incluídos tais como heterogeneidade dos modelos usados (comparação de mesmos desfechos em humanos e em animais); avaliações em tendões diferentes; variação dos CE usados quanto ao tipo e doses; variabilidade no modo de avaliação dos desfechos, tempo de seguimento e variáveis de controle; tipos de resultados (comparações de dados semi-quantitativos com dados quantitativos); problemas com cegamento dos observadores.

As revisões sistemáticas apresentadas mostram que se mantêm as controvérsias sobre injeções de CE em tendões.

### **5.8 - Considerações Finais**

A literatura sobre CE injetados em tendões mostram lesões ou induções de degradação de seus constituintes celulares e extracelulares. Porém são conclusões alicerçadas em estudos com amostras pequenas ou heterogêneas, com grande variabilidade de metodologias criticáveis, que geraram controvérsias.

Seria importante que no futuro se desenvolvam estudos controlados, com amostras adequadas, randomizados e com cegagem dos examinadores, que verifiquem os efeitos dos CE injetados no tendões, com tempos de seguimento maiores que quarenta e oito horas e em tendões lesados, e que associem em um mesmo desenho experimental, desfechos de imunohistoquímica e expressão gênica às variáveis de resistência mecânica e histológicas, bem como se busquem evidências em ensaios clínicos.

*Conclusões*

---

## **6. CONCLUSÕES**

Quarenta e oito horas após a injeção intratendinosa de 0,2 ml de solução com 1,4 mg de betametasona em tendões calcâneos normais de coelhos, ocorreu diminuição da expressão de metaloproteinase 2, sugerindo menor degradação do colágeno.

Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos nas alterações histológicas, biomecânicas, na expressão de metaloproteinase 1 e das interleucinas 1 e 6.

## *Referências*

---

## 7. REFERÊNCIAS

1. Junqueira LC, Carneiro J. Tecido conjuntivo. In: Histologia básica. 12a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2013. p. 90-118.
2. Magra M, Maffulli N. Genetic aspects of tendinopathy. J Sci Med Sport. 2008;11:243-7.
3. Godoy-Santos A, Cunha MV, Ortiz RT, Fernandes TD, Mattar Jr R, Santos MC. MMP-1 promoter polymorphism is associated with primary tendinopathy of the posterior tibial tendon. J Orthop Res. 2013;31:1103-7.
4. Pasternak B, Schepull T, Eliasson P, Aspenberg P. Elevation of systemic matrix metalloproteinases 2 and 7 and tissue inhibitor of metalloproteinase 2 in patients with a history of Achilles tendon rupture: pilot study. Br J Sports Med. 2010;44:669-72.
5. Godoy-Santos A, Ortiz RT, Mattar Junior R, Fernandes TD, Santos MC. MMP-8 polymorphism is genetic marker to tendinopathy primary posterior tibial tendon. Scand J Med Sci Sports. 2014;24:220-3.
6. Kannus P. Structure of the tendon connective tissue. Scand J Med Sci Sports. 2000;10:312-20.
7. Kumar V, Fausto N, Aster JC. Inflamação aguda e crônica. In: Bases patológicas das doenças. 8a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2010. p. 43-77.
8. Franchi M, Trire A, Quaranta M, Orsini E, Ottani V. Collagen structure of tendon relates to function. Scient World J. 2007;7:404-20.
9. Rees JD, Stride M, Scott A. Tendons--time to revisit inflammation. Br J Sports Med. 2014;48:1553-7.
10. McCreesh K, Lewis J. Continuum model of tendon pathology - where are we now? Int J Exp Pathol. 2013;94:242-7.
11. Riley G. Tendinopathy- from basic science to treatment. Nat Clin Pract Rheumatol. 2008;4:82-9.

12. Shepherd JH, Screen HR. Fatigue loading of tendon. *Int J Exp Pathol*. 2013;94:260-70.
13. Coombes BK, Bisset L, Vicenzino B. Efficacy and safety of corticosteroid injections and other injections for management of tendinopathy: a systematic review of randomised controlled trials. *Lancet*. 2010;376:1751-67.
14. Seitz AL, McClure PW, Finucane S, Boardman ND 3rd, Michener LA. Mechanisms of rotator cuff tendinopathy: intrinsic, extrinsic, or both? *Clin Biomech (Bristol, Avon)*. 2011;26:1-12.
15. McAuliffe JA. Tendon disorders of the hand and wrist. *J Hand Surg Am*. 2010;35:846-53;853.
16. Lannan EA, Galliher-Beckley AJ, Scoltock AB, Cidlowski JA. Proinflammatory actions of glucocorticoids: glucocorticoids and TNFalpha coregulate gene expression in vitro and in vivo. *Endocrinology*. 2012;153:3701-12.
17. Damiani DKH, Dichtchekenian V, Della Manna T, Setian N. Repercussions of corticotherapy: the cost-benefit ratio. *Pediatrics (São Paulo)*. 2001;1:71-82.
18. Schimmer BPFJ. ACTH, esteróides suprarrenais e farmacologia do córtex suprarrenal. In: Brunton LL, organizador. *As bases farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman*. 12a ed. Porto Alegre: AMGH; 2012. p.1209-36.
19. Scutt N, Rolf CG, Scutt A. Glucocorticoids inhibit tenocyte proliferation and Tendon progenitor cell recruitment. *J Orthop Res*. 2006;24:173-82.
20. Wei AS, Callaci JJ, Juknelis D, Marra G, Tonino P, Freedman KB, et al. The effect of corticosteroid on collagen expression in injured rotator cuff tendon. *J Bone Joint Surg Am*. 2006;88:1331-8.

21. Lee HJ, Kim YS, Ok JH, Lee YK, Ha MY. Effect of a single subacromial prednisolone injection in acute rotator cuff tears in a rat model. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2015;23:555-61.
22. Millar NL, Hueber AJ, Reilly JH, Xu Y, Fazzi UG, Murrell GA, et al. Inflammation is present in early human tendinopathy. *Am J Sports Med.* 2010;38:2085-91.
23. 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;47:536-44.
24. Ackermann PW. Neuronal regulation of tendon homeostasis. *Int J Exp Pathol.* 2013;94:271-86.
25. Ackermann PW, Domeij-Arverud E, Leclerc P, Amoudrouz P, Nader GA. Anti-inflammatory cytokine profile in early human tendon repair. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2013;21:1801-6.
26. Varga M. Therapeutics. In: *Text book of rabbit medicine.* 2<sup>th</sup> ed. Canada: Elsevier; 2013. p.137-77.
27. Yoshida WB, Müller SS, Carvalho I, Fabris VE, Naresse LE, Maffei FHA. Tensile strength and histological changes of abdominal aorta of malnourished rats. *Cardiovasc Surg.* 1995;3:437-9.
28. Müller SS, Silveiras PRA, Pereira HR, Silva MAM, Sardenberg T, Leivas TP. Comparative analysis of the mechanical properties of the patellar ligament and calcaneus tendon. *Acta Ortop Bras.* 2004;12:134-40.
29. Curcelli EC, Müller SS, Ueda AK, Padovani CR, Maffei FHA, Hossne WS. Efeito da heparina sódica e da enoxaparina na consolidação de fratura da tíbia no rato: avaliação clínica e anatomopatológica e biomecânica. *Acta Ortop Bras.* 2005;13:13-6.

30. Martin P, Teodoro WR, Velosa AP, Morais J, Carrasco S, Christmann RB, et al. Abnormal collagen V deposition in dermis correlates with skin thickening and disease activity in systemic sclerosis. *Autoimmun Rev.* 2012;11:827-35.
31. Muhlfeld C, Hegermann J, Wrede C, Ochs M. A review of recent developments and applications of morphometry/stereology in lung research. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2015;309:L526-36.
32. Yeh MW, Rougier J-P, Park J-W, Duh QY, Wong M, Werb Z, et al. Differentiated thyroid cancer cell invasion is regulated through epidermal growth factor receptor-dependent activation of matrix metalloproteinase (MMP)-2/gelatinase A. *Endocr Relat Cancer.* 2006;13:1173-83.
33. Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay, Elisa. 3. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J Immunol.* 1972;109:129-35.
34. Lequin RM. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin Chem* 2005;51:2415-8.
35. Nisbet NW. Anatomy of the calcaneal tendon of the rabbit. *J Bone Joint Surg Br.* 1960;42-B:360-6.
36. Balasubramaniam P, Prathap K. The effect of injection of hydrocortisone into rabbit calcaneal tendons. *J Bone Joint Surg Br.* 1972;54:729-34.
37. Kennedy JC, Willis RB. The effects of local steroid injections on tendons: a biomechanical and microscopic correlative study. *Am J Sports Med.* 1976;4:11-21.
- 38 Pires D, Xavier M, Araujo T, Silva Jr JA, Aimbire F, Albertini R. Low-level laser therapy (LLLT; 780 nm) acts differently on mRNA expression of anti- and pro-inflammatory mediators in an experimental model of collagenase-induced tendinitis in rat. *Lasers Med Sci.* 2011;26:85-94.



39. Tatari H, Kosay C, Baran O, Ozcan O, Ozer E. Deleterious effects of local corticosteroid injections on the Achilles tendon of rats. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2001;121:333-7.
40. Matthews LS, Sonstegard DA, Phelps DB. A biomechanical study of rabbit patellar tendon: effects of steroid injection. *Am J Sports Med.* 1974;2:349-57.
41. Hugate R, Pennypacker J, Saunders M, Juliano P. The effects of intratendinous and retrocalcaneal intrabursal injections of corticosteroid on the biomechanical properties of rabbit Achilles tendons. *J Bone Joint Surg Am.* 2004;86-A:794-801.
42. Martins CAQ, Bertuzzi RT, Tisot RA, Michelin AF, do Prado JM, Stroher A, et al. Dextrose prothorapy and corticosteroide injection into rat Achilles tendon. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2012;20:1895-900.
43. Shapiro PS, Rohde RS, Froimson MI, Lash LH, Postak P, Greenwald AS. The effect of local corticosteroid or ketorolac exposure on histologic and biomechanical properties of rabbit tendon and cartilage. *Hand.* 2007;2:165-72.
44. Tillander B, Franzen LE, Karlsson MH, Norlin R. Effect of steroid injections on the rotator cuff: an experimental study in rats. *J Shoulder Elbow Surg.* 1999;8:271-4.
45. Akpınar S, Hersekli MA, Demirors H, Tandogan RN, Kayaselcuk F. Effects of methylprednisolone and betamethasone injections on the rotator cuff: an experimental study in rats. *Ado Ther.* 2002;19(4):194-201.
46. Tempfer H, Gehwolf R, Lehner C, Wagner A, Mtsariashvili M, Bauer HC, et al. Effects of crystalline glucocorticoid triamcinolone acetone on cultered human supraspinatus tendon cells. *Acta Orthop.* 2009;80:357-62.

47. Sendzik J, Shakibaei M, Schäfer-Korting M, Lode H, Stahlmann R. Synergistic effects of dexamethasone and quinolones on human-derived tendon cells. *Int J Antimicrob Agents*. 2010;35:366-74.
48. Legerlotz K, Jones ER, Scren HRC, Riley GP. Increased expression of IL-6 family members in tendon pathology. *Rheumatology*. 2012;51:1161-5.
49. Haraldsson BT, Langberg H, Aagaard P, Zuurmond AM, van El B, Degroot J, et al. Corticosteroids reduce the tensile strength of isolated collagen fascicles. *Am J Sports Med*. 2006;34:1992-7.
50. Haraldsson BT, Aagaard P, Crafoord-Larsen D, Kjaer M, Magnusson SP. Corticosteroid administration alters the mechanical properties of isolated collagen fascicles in rat-tail tendon. *Scand J Med Sci Sports*. 2009;19:621-6.
51. Dean BJ, Lostis E, Oakley T, Rombach I, Morrey ME, Carr AJ. The risks and benefits of glucocorticoid treatment for tendinopathy: a systematic review of the effects of local glucocorticoid on tendon. *Semin Arthritis Rheum*. 2014;43:570-6.

*Apêndice*

---

## 8. APÊNDICE

Tabela A - Tabela Piloto dos Procedimentos

A tabela A, mostra que, de acordo com a randomização, o animal foi numerado em ordem de realização do procedimento, e a coleta dos espécimes direcionada para grupo Teste ou Controle.

	Número do animal	GRUPO	DESFECHO
0,133656405	1	CONTROLE	HISTO
0,360114351	2	CONTROLE	HISTO
0,507301632	3	TESTE	MMP E IL
0,819874523	4	TESTE	MMP E IL
0,888312783	5	TESTE	RESISTÊNCIA
0,907274963	6	TESTE	RESISTÊNCIA
0,203611	7	CONTROLE	HISTO
0,458301995	8	CONTROLE	MMP E IL
0,183645	9	CONTROLE	MMP E IL
0,391117703	10	CONTROLE	RESISTÊNCIA
0,883263687	11	TESTE	MMP E IL
0,478351027	12	CONTROLE	HISTO
0,096027092	13	CONTROLE	RESISTÊNCIA
0,261542076	14	CONTROLE	HISTO
0,017409086	15	CONTROLE	RESISTÊNCIA
0,985639404	16	TESTE	RESISTÊNCIA
0,477185112	17	CONTROLE	RESISTENCIA
0,881159601	18	TESTE	HISTO
0,588104238	19	TESTE	RESISTÊNCIA
0,998441927	20	TESTE	MMP E IL
0,553702725	21	TESTE	HISTO
0,628801473	22	TESTE	HISTO
0,060017673	23	CONTROLE	MMP E IL
0,586840593	24	TESTE	MMP E IL
0,93208497	25	TESTE	HISTO
0,438994514	26	CONTROLES	MMP E IL
0,993310629	27	TESTE	MMP E IL
0,305536038	28	CONTROLE	HISTO
0,03551176	29	CONTROLE	RESISTÊNCIA
0,886486011	30	TESTE	RESISTÊNCIA
0,033759443	31	CONTROLE	HISTO
0,541513029	32	TESTE	HISTO
0,427773331	33	CONTROLE	RESISTÊNCIA
0,196821394	34	CONTROLE	HISTO
0,853807034	35	TESTE	MMPD E CITO
0,359866615	36	CONTROLE	MMPD E CITO
0,943236706	37	TESTE	MMPD E CITO
0,21279118	38	CONTROLE	RESISTÊNCIA
0,973238836	39	TESTE	MMPD E CITO
0,347689187	40	CONTROLE	MMPD E CITO
0,752582108	41	TESTE	MMPD E CITO
0,374185625	42	CONTROLE	RESISTÊNCIA
0,984935351	43	TESTE	RESISTÊNCIA
0,013967594	44	CONTROLE	HISTO
0,667629566	45	TESTE	MMP E IL
0,687985439	46	TESTE	HISTO

0,701569352	47	TESTE	HISTO
0,458326817	48	CONTROLE	RESISTÊNCIA
0,708319756	49	TESTE	RESISTÊNCIA
0,973755267	50	TESTE	HISTO
0,893500429	51	TESTE	MMP E IL
0,897762203	52	TESTE	RESISTÊNCIA
0,722062855	53	TESTE	RESISTÊNCIA
0,551144612	54	TESTE	HISTO
0,300936553	55	CONTROLE	HISTO
0,143447105	56	CONTROLE	HISTO
0,253958266	57	CONTROLE	MMP E IL
0,955063413	58	TESTE	HISTO
0,501073009	59	TESTE	RESISTÊNCIA
0,399573883	60	CONTROLE	MMP E IL
0,142316916	61	CONTROLE	MMP E IL
0,733881715	62	TESTE	HISTO
0,081489584	63	CONTROLE	MMP E IL
0,039848866	64	CONTROLE	RESISTÊNCIA
0,97928154	65	TESTE	HISTO
0,092295438	66	CONTROLE	RESISTÊNCIA
0,437965246	67	CONTROLE	MMP E IL
0,302686129	68	CONTROLE	MMP E IL
0,517371027	69	TESTE	RESISTÊNCIA
0,189351628	70	CONTROLE	HISTO
0,333074669	71	CONTROLE	RESISTÊNCIA
0,649564196	72	TESTE	RESISTÊNCIA
0,092295439	73	TESTE	RESISTÊNCIA

Tabela B - Dados Brutos das Variáveis de Resistência mecânica.

Nº animal	Grupo	Peso	Amostra	Deformação (mm)	Força Máxima (N)	Energia na Força máxima (N.mm)	Energia por área na força máxima (N.mm/mm <sup>2</sup> )	Tensão na Força Máxima (Mpa)	Módulo Elasticidade (Mpa)
16	Teste	2,72	A20	2.806	321.6	514.5	47.37	29.62	114.2
19	Teste	2,61	A34	1.812	219.8	255.4	19.65	16.91	100.1
30	Teste	2,37	A42	2.254	283.4	363.8	37.74	29.40	154.8
43	Teste	2,16	A62	4.397	212.4	655.2	83.46	27.05	120.8
49	Teste	2,14	A68	2.232	375.3	481.6	39.48	30.77	115.9
52	Teste	2,15	A79	4.286	119.4	273.3	31.42	13.72	43.85
53	Teste	2,65	A80	4.441	318.2	795.8	71.69	28.66	61.68
59	Teste	2,25	A83	5.016	248.4	548.0	49.28	22.34	52.57
69	Teste	2,32	A100	4.507	295.7	746.8	82.29	32.58	32.74
72	Teste	2,68	A105	8.661	218.4	1207	108.8	19.68	26.05
73	Teste	2,25	A106	5.060	308.9	271.4	85.30	30.24	54.50
10	CP	2,11	A21	2.828	160.9	305.7	35.80	18.84	87.16
13	CP	2,34	A17	1.502	206.1	180.7	18.74	21.38	161.0
15	CP	2,53	A30	2.541	237.5	352.8	26.07	17.55	90.47
17	CP	2,79	A32	2.099	198.6	243.0	17.05	13.94	87.63
29	CP	2,73	A40	2.298	185.4	268.2	29.28	20.23	126.3
33	CP	2,45	A46	2.563	263.2	324.0	28.75	23.35	143.7
38	CP	3,33	A54	2.298	403.1	515.9	65.72	51.35	227.2
42	CP	2,36	A60	3.292	256.0	507.4	62.56	31.56	124.9
48	CP	2,19	A71	4.927	296.8	713.7	59.27	24.65	21.85
64	CP	2,48	A91	5.303	265.2	887.5	84.93	25.38	36.90
66	CP	2,30	A94	2.806	309.5	438.9	46.79	33.0	114.8
71	CP	2,48	A103	2.850	323.4	547.1	69.08	40.83	165.6
10	CN	2,11	A22	3.602	146.7	358.7	52.51	21.48	95.22
13	CN	2,34	A18	2.298	179.6	286.6	26.74	16.75	111.2
15	CN	2,53	A31	1.613	128.5	120.9	9.452	10.05	68.70
17	CN	2,79	A33	3.381	230.8	481.6	28.52	13.67	60.55
29	CN	2,73	A41	2.430	315.3	448.1	49.79	35.03	166.0
38	CN	3,33	A55	4.242	516.2	1147	103.6	46.59	94.66
42	CN	2,36	A61	5.590	215.5	457.5	33.01	15.55	24.12
48	CN	2,19	A72	2.983	283.0	520.1	42.63	23.19	84.25
64	CN	2,48	A92	4.640	361.5	896.7	80.78	32.57	37.68
66	CN	2,30	A95	5.237	223.9	583.2	65.90	25.30	34.96
71	CN	2,48	A104	6.938	278.2	959.3	65.76	19.07	35.19

CP, Controle Placebo; CN, Controle Normal

Tabela C - Dados Brutos das Variáveis Histológicas do Tendão.

Nº Animal	Grupo	Peso	Amos- tra	Tenócitos HE	Ruptura colágeno HE	Células Inflama- torias HE	Fibras Grossas Picro	Fibras Finas Picro
18	Teste	2,939	A5	2,4	0	0,06	41	0,3
21	Teste	2,222	A1	3,5	0	0		
22	Teste	2,986	A36	2,86	0,02	0,02	42,7	1
25	Teste	2,573	A37	2,74	0,02	0	60,8	4,5
32	Teste	2,215	A45	1,5	0,02	0,04	68,9	2,4
46	Teste	2,230	A66	1,92	0,08	0,02	53,7	19,1
47	Teste	2,191	A67	2,78	0,06	0	53,4	24
50	Teste	2,011	A69	2,68	0,06	0	61,3	4,5
54	Teste	2,215	A81	2,18	0	0	59,8	4,9
58	Teste	2,000	A82	2,58	0,14	0	52,2	2,6
62	Teste	2,24	A88	1,86	0,12	0	64,6	3,9
65	Teste	2,24	A93	1,72	0,06	0	67,7	9,7
1	CP	2,725	A2	2,26	0	0,04	60,6	0
2	CP	2,814	A4	2,06	0	0	54,9	1,1
7	CP	2,365	A24	3,06	0,04	0	70,3	0,7
12	CP	2,470	A26	3,1	0	0	66,4	3,3
14	CP	2,484	A28	1,66	0,02	0	47,8	9,2
28	CP	2,170	A38	2,62	0,04	0,02	65,4	11,7
31	CP	2,309	A43	0,98	0,12	0,04	56,7	4,3
34	CP	2,664	A48	1,38	0,06	0,04	82	2,8
44	CP	2,206	A63	2,6	0,02	0	40,7	7,2
55	CP	2,145	A73	5,4	0,04	0	70,8	8,7
56	CP	2,485	A75	1,94	0,04	0	74,3	3,1
70	CP	2,39	A101	1,82	0,04	0	45,2	9,4
1	CN	2,725	A3	1,94	0,02	0	42,7	0
7	CN	2,365	A25		0,02	0	55,4	3,6
12	CN	2,470	A27	0,44	0	0,12	38,5	0,2
14	CN	2,484	A29	2,24	0,02	0	45,3	8,4
28	CN	2,170	A39	3,08	0,04	0	63,7	12,5
31	CN	2,309	A44	1,5	0,12	0,1	33,1	6,4
34	CN	2,664	A49	3,06	0,06	0,02	54	6,4
44	CN	2,206	A64	2,86	0	0	58,2	4,5
55	CN	2,145	A74	3,5	0,06	0,02	50,6	8,4
56	CN	2,485	A76	3,2	0,08	0	51,3	11,4
70	CN	2,39	A102	2,74	0,02	0	45,6	8,4

CP, Controle Placebo; CN, Controle Normal

Tabela D - Dados Brutos Variáveis Histológicas do Paratendão.

Nº Animal	Grupo	Peso	Amostra	Tenócito HE	Células Inflamatórias HE	Fibras Grossas Picro	Fibras Finas Picro
18	Teste	2,939	A5	0,03		34,1	2,1
21	Teste	2,222	A1	0,07	0	17,6	2,6
22	Teste	2,986	A36	0,04	3	31,1	17
25	Teste	2,573	A37	0,07	1	35,1	6,6
32	Teste	2,215	A45	0,02	1	46	11,5
46	Teste	2,230	A66	0,02	1	44,1	11,3
47	Teste	2,191	A67	0,09	3	51,3	11,1
50	Teste	2,011	A69	0,09	2	52	9,5
54	Teste	2,215	A81	0,08	2	40,1	15,1
58	Teste	2,000	A82	0,09	2	37,6	12,1
62	Teste	2,24	A88	0,12	0	39,1	12,5
65	Teste	2,24	A93	0,01	2	44,8	11,9
1	CP	2,725	A2	0,07	3	25,5	0,8
2	CP	2,814	A4	0	0	23,1	1,8
7	CP	2,365	A24	0,03	1	27,6	3,3
12	CP	2,470	A26	0,02	1	27,8	3,1
14	CP	2,484	A28	0,03	4	37	11,6
28	CP	2,170	A38	0,11	2	30	14,8
31	CP	2,309	A43	0,12	0	41,1	12,3
34	CP	2,664	A48	0,04	1	37,1	15,3
44	CP	2,206	A63	0,11	0	49,1	9,8
55	CP	2,145	A73	0,12	0	29,5	14
56	CP	2,485	A75	0,18	1	36,3	13,3
70	CP	2,39	A101	0,04	0	44,8	11,1
1	CN	2,725	A3	0,13	2	19,1	0,8
7	CN	2,365	A25	0,08	3	33	2
12	CN	2,470	A27	0,02	3	29,3	4,1
14	CN	2,484	A29	0,05	2	28,1	14,1
28	CN	2,170	A39	0,04	2	38,5	14,3
31	CN	2,309	A44	0,05	2	41,1	13
34	CN	2,664	A49	0,08	0	49,8	9,6
44	CN	2,206	A64	0,13	2	25,5	16,8
55	CN	2,145	A74	0,22	2	54	9,8
56	CN	2,485	A76	0,04	1	38,6	13,8
70	CN	2,39	A102	0,05	9	41,1	11

CP, Controle Placebo; CN, Controle Normal



Tabela E - Dados Brutos das Variáveis de Expressão das MMPs.

Nº Animal	Grupo	Peso	Amostra	MMP2 Inativa	MMP2 Ativa	MMP1 Inativa	MMP1 Ativa
3	Teste	2,583	A8	-	-	-	-
4	Teste	2,348	A23	1,15	1,67	0,95	1,04
11	Teste	2,364	A15 <sup>1</sup>	-	-	-	-
20	Teste	2,470	A35	1,40	0,44	0,98	0,56
24	Teste	2,342	A10	1,19	0,38	0,94	0,28
27	Teste	2,348	A14 <sup>1</sup>	-	-	-	-
35	Teste	2,519	A50	1,39	0,60	1,23	0,36
37	Teste	2,211	A53	-	-	-	-
39	Teste	2,310	A58	1,48	1,60	1,30	1,05
41	Teste	2,510	A59	0,58	0,30	1,34	0,28
45	Teste	2,250	A65	1,14	0,30	1,16	0,61
51	Teste	2,189	A70	1,19	0,50	1,24	0,41
8	CP	2,819	A6	1,00	1,00	1,00	1,00
9	CP	2,425	A7	0,75	1,02	0,70	0,75
23	CP	2,925	A9	1,42	1,25	1,32	1,45
26	CP	2,912	A12	1,44	0,92	1,17	0,38
36	CP	2,515	A51	1,51	1,81	1,14	1,30
40	CP	2,454	A56	0,88	2,92	1,12	0,93
57	CP	2,413	A77	0,87	0,90	1,01	0,86
60	CP	2,187	A84	1,11	1,00	1,45	0,50
61	CP	2,578	A86	1,02	3,67	1,27	1,08
63	CP	2,122	A89	0,85	5,00	0,94	1,11
67	CP	2,39	A96	1,43	3,67	0,98	0,68
68	CP	2,48	A98	1,12	1,50	1,47	0,78
8	CN	2,819	A14 <sup>0</sup>	0,89	2,17	0,62	0,86
9	CN	2,425	A15 <sup>0</sup>	0,98	1,65	0,97	0,59
23	CN	2,925	A11	1,71	1,38	1,08	1,35
26	CN	2,912	A13	1,54	0,50	1,42	0,64
36	CN	2,515	A52	1,33	0,50	1,42	0,56
40	CN	2,454	A57	1,10	0,90	1,16	0,93
57	CN	2,413	A78	1,03	0,50	1,04	0,92
60	CN	2,187	A85	0,91	0,33	1,14	0,35
61	CN	2,578	A87	0,89	2,67	1,18	0,93
63	CN	2,122	A90	1,32	4,33	0,90	1,05
67	CN	2,39	A97	1,22	3,67	1,44	1,24
68	CN	2,48	A99	1,03	1,50	1,59	0,90

CP, Controle Placebo; CN, Controle Normal

Tabela F - Dados Brutos das Variáveis de Expressão das Interleucinas.

<b>Nº</b> <b>Animal</b>	<b>Grupo</b>	<b>Peso</b>	<b>Amostra</b>	<b>IL-6 em pg</b>	<b>IL-1 em pg</b>
3	Teste	2,583	A8 +	109	118
4	Teste	2,348	A23 +	106	1023
20	Teste	2,470	A35 +	157	474
24	Teste	2,342	A10 +	124	592
27	Teste	2,348	A14 <sup>1</sup> +	78	311
35	Teste	2,519	A50 +	81	270
37	Teste	2,211	A53 +	39	521
39	Teste	2,310	A58 +	121	1145
41	Teste	2,510	A59 +	31	109
45	Teste	2,250	A65 +	107	109
51	Teste	2,189	A70 +	26	91
9	CP	2,425	A7 +	107	497
23	CP	2,925	A9 +	91	521
26	CP	2,912	A12 +	88	109
36	CP	2,515	A51 +	83	556
40	CP	2,454	A56 +	52	230
57	CP	2,413	A77 +	79	321
60	CP	2,187	A84 +	36	280
61	CP	2,578	A86 +	44	163
63	CP	2,122	A89 +	194	532
67	CP	2,39	A96 +	183	629
68	CP	2,48	A98 +	44	182
8	CN	2,819	A14 <sup>0</sup> +	104	463
9	CN	2,425	A15 <sup>0</sup> +	134	321
23	CN	2,925	A11 +	161	396
26	CN	2,912	A13 +	105	145
36	CN	2,515	A52 +	119	192
40	CN	2,454	A57 +	54	301
57	CN	2,413	A78 +	50	154
60	CN	2,187	A85 +	80	353
61	CN	2,578	A87 +	52	211
63	CN	2,122	A90 +	66	250
67	CN	2,39	A97 +	182	385
68	CN	2,48	A99 +	37	182

CP, Controle Placebo; CN, Controle Normal