

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA VETERINÁRIA**

**TRATAMENTO COM GLICOSAMINOGLICANOS  
POLISSULFATADOS NO PROCESSO CICATRICAL  
TENDÍNEO EM EQÜINOS. ANÁLISE MORFOLÓGICA**

Gilberto Gonçalves Facco  
Médico Veterinário

**Dissertação apresentada à Faculdade  
de Ciências Agrárias e Veterinárias do  
Câmpus de Jaboticabal – UNESP, para  
obtenção do Título de Mestre em  
Medicina Veterinária – Área de  
Concentração em Patologia Animal.**

Jaboticabal - São Paulo - Brasil

Junho - 2003

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA VETERINÁRIA**

**TRATAMENTO COM GLICOSAMINOGLICANOS  
POLISSULFATADOS NO PROCESSO CICATRICAL  
TENDÍNEO EM EQÜINOS. ANÁLISE MORFOLÓGICA**

Gilberto Gonçalves Facco  
Médico Veterinário

**Orientadora:** Profa. Dra. Julieta Rodini Engrácia de Moraes

**Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Câmpus de Jaboticabal – UNESP, para obtenção do Título de Mestre em Medicina Veterinária – Área de Concentração em Patologia Animal.**

Jaboticabal - São Paulo – Brasil

Junho – 2003

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**GILBERTO GONÇALVES FACCO**, nascido em 18 de outubro de 1973, em São Pedro da Cipa, MT, é Médico Veterinário formado pela Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal – UNIDERP, em Campo Grande, MS, onde trabalha como docente desde março de 2002.

*OFEREÇO*

**AOS MEUS PAIS,  
VALDEMAR FACCO e MARIA NADIR GONÇALVES  
FACCO pelos ensinamentos adquiridos.**

## AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Julieta Rodini Engrácia de Moraes pela orientação, pela confiança depositada em mim, pelo apoio incondicional que me ofereceu em todos os momentos solicitados.

Ao Professor Dr. José Corrêa de Lacerda Neto, pela amizade e participação em todas as etapas deste trabalho.

As Professoras Dra. Laura Satiko O. Nagashi, Dra. Doroty Mesquita Dourado e Dra. Élia T. Caldini, pela participação e doação de seus conhecimentos.

Ao Professor Flávio Ruas de Moraes pelas sugestões e auxílio neste trabalho.

À Médica Veterinária Susanne Marxen, pelo material cedido para realização deste experimento.

À minha fiel companheira Ramona Gimenes pela solidariedade, paciência e confiança.

À Dra. Ilzia Doraci Lins Scapulatempo, Dr. Raphael Perez Scapulatempo e Dra. Sandra do Socorro Souza Poletti pelos incentivos.

Ao Professor Dr. Olímpio Crisóstomo Ribeiro por servir como modelo de Homem e Profissional.

Aos Professores Dr. Gener Tadeu Pereira e Dr. Sívio Fávelo, pela imediata atenção na análise estatística dos dados.

Aos meus familiares que nunca deixaram de acreditar na minha capacidade e em especial ao meu sobrinho Lucas Facco Silva pelo incentivo indireto.

À amiga Maria de Jesus Soares Veloso, pela amizade e confiança.

Aos meus amigos conquistados nesta maravilhosa cidade Percílio, Eduardo, Márcio, Leonardo, Beto, Rabelo, Frank, Toínho, Zinaldo, Marcelo, Gláucia e Gabriel.

À UNIDERP (Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal), pelo apoio.

Aos funcionários do Departamento de Patologia Moema, Tel e Edgar, as técnicas em Laboratório Francisca (Chica) e Maria Inês.

Aos Docentes, colegas do Curso de Pós-Graduação, cujos ensinamentos, troca de experiência e convívio tornaram o dia a dia nesta Universidade mais agradável.

Enfim, a todos que estiveram direta ou indiretamente envolvidos na elaboração deste, e a NOSSO PAI TODO PODEROSO, meus sinceros agradecimentos.

## SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	01
1 Referências.....	09
CAPÍTULO 2.....	15
Resumo.....	15
Abstract.....	16
Introdução.....	17
Material e Método.....	20
1. Animais.....	20
2. Indução da tendinite.....	20
3. Tratamentos preconizados e avaliações previamente realizadas.....	20
4. Avaliação histológica das secções tendíneas sob luz polarizada.....	21
5. Morfometria do tecido conectivo denso modelado dos animais tratados com GAGPS e com salina.....	21
6. Análise estatística.....	22
Resultados.....	23
1. Avaliação histológica das secções tendíneas dos TFDS normais sob luz polarizada.....	23
2. Avaliação histológica das secções tendíneas dos TFDS tratado com salina sob luz polarizada.....	23
3. Avaliação histológica das secções tendíneas dos TFDS tratados com glicosaminoglicanos polissulfatados sob luz polarizada.....	23
4. Avaliação morfológica dos feixes colagenosos organizados e desorganizados nos grupos tratados com GAGPS e salina.....	24

5. Avaliação estatística.....	24
Discussão.....	30
Conclusão .....	34
Referências.....	35
Apêndice.....	40



**INDICE DE TABELA**

Tabela	Página
1. Índice de feixes de colágeno organizados e desorganizados dos TFDS nos grupos tratados com GAGPS e com salina.....	29

## INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Aspecto histológico do TFDS de eqüino em corte longitudinal do grupo normal. Observar fascículos colagenosos com bandas de fibras colágenas organizadas e paralelas. Coloração de Picrossírius. Barra: 1,04µm.....	25
2. (A) Aspecto histológico do TFDS de eqüino em corte longitudinal do grupo tratado com GAGPS (GI). Observar fascículos colagenosos com bandas de fibras colágenas desorganizadas mostrando orientação em diferentes sentidos. Coloração de Picrossírius. Barra:1,04µm.....	26
(B) Aspecto histológico do TFDS de eqüino em corte longitudinal do grupo tratado com GAGPS (GI). Observar epitendíneo entre fascículos colagenosos com bandas de fibras colágenas desorganizadas (D) e organizadas (E). Coloração de Picrossírius. Barra: 1,04µm .....	26
3. (A) Aspecto histológico do TFDS de eqüino em corte longitudinal do grupo tratado com salina (GII). Observar transição entre fascículos colagenosos com bandas de fibras colágenas organizadas e desorganizadas mostrando orientação em diferentes sentidos corados em cor verde-escuro (Σ). Coloração de Picrossírius. Barra: 1,04µm.....	27
(B) Aspecto histológico do TFDS de eqüino em corte longitudinal do grupo tratado com salina (GII). Observar fascículos colagenosos com bandas de fibras colágenas desorganizadas mostrando orientação em diferentes sentidos e grande variabilidade na polarização. Coloração de Picrossírius. Barra: 1,04µm.....	27
4. (A) Aspecto histológico do TFDS de eqüino em corte longitudinal do grupo tratado com salina (GII). Observar fascículos colagenosos com banda de fibras colágenas desorganizadas mostrando orientação em diferentes sentidos e	

grande variabilidade na polarização. Coloração de Picrossírius. Barra: 1,04µm .....	28
(B) Aspecto histológico do TFDS de eqüino em corte longitudinal do grupo tratado com salina (GII). Observar fascículos colagenosos com bandas de fibras colágenas desorganizadas mostrando orientação em diferentes sentidos e grande variabilidade na polarização. Coloração de Picrossírius. Barra: 1,04µm .....	28
5. Porcentagem de feixes de colágeno organizados e desorganizdos, oriundos de tendões de eqüinos com tendinite induzida pela colagenase tratados com GAGPS e salina .....	29

## **CAPÍTULO 1. CONSIDERAÇÕES GERAIS**

As lesões tendíneas nos eqüinos são desencadeadas por diferentes mecanismos e estas se expressam no plano tecidual por fenômenos degenerativos e alterações inflamatórias em diferentes graus de intensidade.

As alterações envolvidas na cicatrização tendínea dos eqüinos são estudadas pela inoculação intratendínea de colagenase, que causa destruição das fibras colágenas tendíneas simulando tendinites de ocorrência natural (WILLIAMS, 1984; SPURLOCK et al., 1989; FOLAND et al., 1992; GIFT et al., 1992).

A colagenase secretada por bactérias atacam as moléculas de colágeno em múltiplos locais ao longo da cadeia causando a sua solubilização além de atuarem destruindo células e matriz não colagenosa. Os sinais clínicos, a aparência ultrasonográfica das lesões tissulares e a inflamação resultante são muito similares às provocadas por excesso de exercício (FOLAND et al., 1992).

O processo de reparação do tendão após uma lesão é semelhante aos demais tecidos do organismo (SILVER et al., 1983; ANDRADE, 1992; ROBBINS et al., 1994).

As forças que excedem o limite de resistência podem produzir deslocamento e ruptura das fibras tendíneas que resultam em ruptura de arteríolas e capilares locais com hemorragia, formação de hematoma no interior do tendão que pode estender-se para o paratendão. O resultado imediato é a deposição de fibrina e a migração de neutrófilos para a região. Além disso, congestão e acúmulo de fluídos ocorrem no local da agressão podendo haver isquemia e necrose de fibrócitos. A extensão da necrose na região está relacionada ao grau do comprometimento vascular (SILVER et al., 1983).

A tendinite na fase aguda leva a liberação de proteases e colagenases promovendo extensa degradação enzimática das fibras colágenas e da matriz interfibrilar. Estas enzimas atuam nas moléculas de colágeno em múltiplos locais ao longo da hélice e rapidamente causam sua solubilização, além de atuarem destruindo células e matriz não colagenosa. Imagens fotográficas obtidas por microscopia eletrônica demonstram que os fibroblastos apresentam aumento do retículo endoplasmático, dos ribossomos e de material denso. Essas

características permitem a distinção dos fibrócitos e fibroblastos de macrófagos e monócitos que migram constantemente para o local da lesão. Concomitantemente os fibroblastos proliferam-se e depositam-se ao longo do coágulo de fibrina (SILVER et al., 1983; PEACOCK, 1984; KRAUS-HANSEN et al., 1992).

Dentre os processos de cicatrização do tendão estão envolvidos vários componentes extrínsecos e intrínsecos. Os componentes extrínsecos são assim designados visto que a principal fonte de fibroblastos é precedente do tecido conectivo frouxo que envolve o tendão, denominado paratendão (SILVER et al., 1983; PEACOCK, 1984; KRAUS-HANSEN et al., 1992). Estudos recentes demonstraram a participação intrínseca das células do próprio tendão no processo de reparação. Células endotendíneas podem se transformar em fibroblastos ativos modeladoras do processo de cicatrização (SPURLOCK, 1989; GOODSHIP e BIRCH, 1996).

A medida que o espaço da lesão é preenchido por células reparadoras recém formadas, o exsudato inflamatório é reabsorvido. Após uma semana, as células inflamatórias constituídas por leucócitos e macrófagos são observados no local, com pequenos vasos neoformados, pouca área hemorrágica e depósitos de fibrina (SILVER et al., 1983). Tanto os leucócitos como as fibrinas são digeridos progressivamente pelos fagócitos e por enzimas, especialmente as proteases e catepsinas e pelo sistema fibrinolítico específico originado no paratendão e nos capilares que se formam no local. Nos capilares lesados as células endoteliais aumentam de tamanho e exibem atividade mitótica pronunciada. Pequenos brotos sólidos de células endoteliais em crescimento seguem o trajeto dos fibroblastos migrando ao longo das malhas de fibrina. Os cordões sólidos de células endoteliais canalizam-se permitindo o fluxo de sangue. Os canais linfáticos proliferam-se de modo semelhante, mas não se anastomosam como os vasos sangüíneos.

Ao passar de poucos dias, o coágulo é povoado pelo tecido conectivo altamente vascularizado e em crescimento ativo; sendo o processo designado "organização do coágulo". O tecido conectivo recém formado é intensamente vascularizado e contém elementos do exsudato inflamatório agudo denominado

tecido de granulação (PEACOCK, 1984). Este tecido, invade progressivamente o espaço lesado. A neovascularização ou angiogênese é máxima neste período, permitindo assim a migração dos fibroblastos para a região inflamada.

A proliferação de fibroblastos e a deposição de colágeno exercem pressão mecânica sobre as delicadas paredes dos capilares recém-formados. Muitas vezes, as fibras de colágeno enlaçam os vasos sanguíneos, o que, dependendo da compressão exercida, leva à diminuição da vascularização, sendo este fenômeno comum na evolução do processo cicatricial (STRÖMBERG, 1971). No meio extracelular, as moléculas de colágeno reúnem-se formando as fibrilas de colágeno. Os resíduos de lisina e hidroxilisina sofrem oxidação pela ação da enzima lisil-oxidase, originando aldeídos nas porções terminais e helicoidais da molécula. São estes aldeídos muito reativos que formam ligações covalentes intra e intermoleculares, permitindo as ligações múltiplas entre as moléculas de colágeno, designadas ligações cruzadas, responsáveis pela estabilidade estrutural das fibrilas.

Na segunda semana pós-lesão tendínea há um acúmulo contínuo de colágeno e proliferação de fibroblastos. O infiltrado leucocitário, o edema e o aumento de vascularização tendem a desaparecer, ocorrendo maturação progressiva do tecido de granulação. O alinhamento dos fibroblastos e a subsequente síntese de fibras colágenas é dependente da orientação das fibras depositadas na região (RENNARD et al., 1982).

O acúmulo de colágeno depende de sua síntese e degradação, pois parte do colágeno sintetizado pelos fibroblastos sofre degradação intracelular antes mesmo de ser secretado no meio extracelular. Calcula-se que em determinadas condições, 10 a 60% do colágeno pode ser degradado antes de ser secretado (RENNARD et al., 1982).

A degradação do colágeno e de outras proteínas da matriz extracelular é realizada pelas metaloproteinases que são enzimas dependentes de zinco para sua atividade biológica. Esta degradação auxilia no debridamento dos locais lesados do tendão e também na remodelação do tecido conectivo necessário para a reparação da lesão (RENNARD et al., 1982).

No tecido cicatricial neoformado, o colágeno inicialmente é imaturo e apresenta-se com arquitetura desorganizada. Contêm predominantemente colágeno tipo III com fibras de pequeno diâmetro. O processo de maturação ocorre com o tempo, quando o diâmetro das fibras e o número de ligações químicas e estáveis aumentam, associado ao aumento da proporção de fibras formadas por colágeno tipo I. O processo de maturação e remodelação da cicatriz tem um período variável de semanas a meses para se completar (GOODSHIP et al., 1983; GOODSHIP et al., 1994).

A regeneração tendínea evolui com contínua deposição das fibras colágenas junto ao local lesado em progressiva orientação longitudinal, facilmente visualizadas pelo microscópio de luz polarizada. As camadas de fibras colágenas orientadas longitudinalmente são agregadas em grandes feixes, circundadas por grandes vasos sanguíneos, nos septos endotendíneos. O tecido de reparação permanece em remodelamento por alguns meses após o início da lesão (PARRY & CRAIG, 1984).

Apesar da maturação e do remodelamento contínuo do tecido conectivo denso modelado neoformado ocorrerem na evolução do processo de reparação, alguns autores relatam que, embora o tecido cicatricial possa se remodelar e mimetizar a arquitetura de um tendão normal, a cicatriz resultante dificilmente irá reproduzir a conformação prévia ou retornará às atividades mecânicas originais (POOL, 1996).

Considerando as observações do processo de reparação dos tendões e na literatura existente, acredita-se que haja a possibilidade de se modelar este processo de reparação tecidual, visando restaurar a microanatomia do tendão e minimizar os efeitos restritivos do tecido cicatricial. A reparação cicatricial pode ser controlada por vários fatores endógenos, como: idade, sexo, especificidade tecidual e hormônios; bem como exógenos, ou seja: estado nutricional, atividade física, infecção e intervenções farmacológicas e cirúrgicas.

## **AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE REPARAÇÃO TENDÍNEA**

O processo cicatricial pode ser monitorizado por métodos não invasivos como a ultra-sonografia ou invasivos, como o exame histopatológico.

Dentre os métodos invasivos a avaliação microscópica do tecido cicatricial com a biópsia tendínea é um dos mais utilizados. Este exame é de importância fundamental para qualificar-se a composição colagenosa na reparação tendínea.

Numerosos métodos de coloração foram desenvolvidos a fim de permitir a diferenciação dos diversos tipos de fibras colágenas ao microscópio de luz polarizada sendo a maioria destas pertencentes à categoria das colorações tricrômicas. Embora as fibras colágenas apareçam geralmente bem coradas por estes métodos, outras estruturas que contém colágeno (como as fibras reticulares e as membranas basais) não são coradas seletivamente pelos métodos tricrômicos, uma vez que a densidade de cor resultante é insuficiente para dar resolução a essas estruturas delicadas. Desse modo, os vários tipos geneticamente distintos de colágeno não podem ser distinguidos em cortes histológicos por métodos usuais como a coloração de Van Gieson (HORTON, 1984).

O método de Mallory também não é especialmente útil para este propósito, embora tenha sido idealizado para a demonstração de colágeno (LUNA, 1992). Os métodos tricrômicos não apresentam resultados confiáveis mesmo nas próprias fibras colágenas, pois estas não se apresentam com cor uniforme num mesmo corte histológico (JUNQUEIRA et al., 1983).

Assim, a maioria das técnicas de coloração acima mencionadas não possibilita uma diferenciação precisa entre as fibras colágenas e reticulares. As técnicas de impregnação metálica apesar dos resultados variáveis, permitem o contraste entre estes dois tipos de fibras, embora não permitam distinguir as fibras colágenas de outros componentes (MONTES et al., 1980).

Entre os mamíferos, grande partes das moléculas de colágeno estão dispostas ordenadamente em orientação paralela. Assim, a birrefringência normal é uma das características clássicas das estruturas que contém moléculas de



colágeno agregadas formando estruturas visíveis à microscopia óptica e eletrônica.

A técnica de coloração pelo método de picrossírius faz com que grande quantidade de moléculas do Sirius Red, de caráter ácido e alongadas, disponham-se paralelamente às moléculas de colágeno, o que provoca um aumento considerável da birrefringência das fibras que contém colágeno quando observadas com microscópio de luz polarizada (CALDINI, 1992). Apesar do corante Sirius Red ligar-se inespecificamente aos componentes de caráter básico do tecido, o fenômeno do aumento de birrefringência ocorre exclusivamente com o colágeno. O método da coloração com picrossírius associado à microscopia de polarização é um método histoquímico específico para estudo da orientação de moléculas de colágeno (JUNQUEIRA et al., 1979; JUNQUEIRA et al., 1980; JUNQUEIRA et al., 1982 JUNQUEIRA et al., 1999; MONTES & JUNQUEIRA, 1991).

## **TRATAMENTO DAS TENDINITES NOS EQUÍNOS**

A elaboração e o constante aperfeiçoamento de protocolos científicos possibilitaram avanços efetivos no estudo comparativo de diversos métodos de tratamento das tendinites. O problema encontrado em se desenvolver um modelo de lesão tendínea a partir de ruptura mecânica ou estiramento do tendão intacto é que a força a ser aplicada seria tão grande que se tornaria impossível fazê-lo sem danificar os ossos associados ou esmagar o tendão (SILVER et al., 1983). Tomando-se por base que a degradação enzimática do tendão ocorre normalmente após a lesão mecânica espontânea como resultado da ação de proteases e colagenases do exsudato inflamatório, a reprodutibilidade da lesão foi então testada pela aplicação de pequenas quantidades de enzimas proteolíticas e colagenolíticas no tendão de Aquiles de coelhos, as quais resultaram em necrose e destruição de fibras em curto período de tempo (SILVER et al., 1983; WILLIAMS et al., 1984). O tratamento das tendinites agudas visa diminuir o processo

inflamatório, minimizar a formação de tecido cicatricial e promover a restauração da estrutura e funções tendíneas.

O uso do hialuronato de sódio (HA) intralesional ou peritendinoso no tratamento da injúria tendínea aguda nos eqüinos apresentam resultados conflitantes. Estudos iniciais relatam que o HA administrado no tendão restabelece-o parcialmente quando observado em avaliação ultra-sonográfica (SPURLOCK et al., 1989; GAUGHAN et al., 1991; GIFT et al., 1992). Redução significativa na extensão de formação de adesões pós-cirúrgica foi observada em tendões intrasinoviais (THOMAS et al., 1986; GAUGHAN et al., 1991). Outros investigadores relataram em estudos "in vitro" efeitos limitados nas propriedades biomecânicas do tecido colagenoso e cura dos tendões (OXLUND & ANDREASSEN, 1980; SALTI et al., 1993). O estudo do efeito do HA em tendinites induzidas pela colagenase em eqüinos não demonstrou qualquer benefício clínico (FOLAND et al., 1992). O HA intralesional não têm efeito benéfico significativo na recorrência da tendinite em eqüinos, quando comparada com outros casos não tratados (DYSON, 1997).

O Fumarato de Beta-Aminopropionitrila (FBAPN) é um agente tóxico encontrado em sementes da planta *Lathyrus odoratus* (ervilha doce). O FBAPN liga-se a enzima lisil oxidase inibindo a diaminação da lisina que constitui o primeiro passo na formação de ligações cruzadas covalentes entre as fibras colágenas inter e intramolecular (STRYER, 1988). Em virtude dessa ação, o FBAPN é recomendado para prevenir a formação excessiva de ligações cruzadas nos estágios iniciais do reparo tendíneo em eqüinos e promover a linearização das fibras do colágeno submetidas ao exercício controlado (GENOVESE, 1992). Resultados iniciais com avaliação ultra-sonográfica mostraram que 80% dos Tendões Flexores Digitais Superficiais (TFDS) de eqüinos tratados com FBAPN intralesional tem pelo menos 75% de recuperação (GENOVESE, 1992). Por outro lado esta recuperação é menos convincente quando o retorno às atividades físicas é tardio, com índice de recuperação entre 45 à 50% (REEF et al., 1996, 1997). O FBAPN deve provavelmente ser considerado apenas para casos de tendinites

severas. Requer um estreito e cuidadoso regime de exercícios controlados com regular acompanhamento ultra-sonográfico.

A utilização de drogas antiinflamatórias nas tendinites foi ampliada nos últimos tempos com a introdução dos glicosaminoglicanos polissulfatados (GAGPS). Inicialmente, esta droga teve sua utilização restrita em humanos, sendo posteriormente aprovada no mercado norte-americano em 1986 para o tratamento intra-articular de doenças articulares degenerativas em eqüinos (JONES & WHITE, 1996). A partir deste momento, os GAGPS tornaram-se alvo de inúmeros trabalhos científicos, sendo atualmente bem aceitos e utilizados principalmente nas doenças articulares de eqüinos (CARON et al., 1994, 1996).

Os GAGPS parecem retardar a manifestação clínica e radiográfica de displasia coxo-femural em cães em crescimento susceptíveis à doença (LUST et al., 1992). A utilização dos GAGPS na prevenção de osteoartrites avançadas é também indicada (TODHUNTER & LUST, 1994).

Os GAGPS têm a capacidade de inibir os lisossomos e diminuir o grau de inflamação (HENNINGER, 1994). Também são capazes de aplacar a atividade da colagenase e a ativação de macrófagos, melhorar a orientação das fibrilas de colágeno de tendões em recuperação (SMITH, 1992). Atribui-se aos GAGPS a capacidade de inibir a síntese de prostaglandina E<sub>2</sub> (FREAN & LEES, 2000); a atividade da cascata do complemento (RASHMIR-RAVEN et al., 1992); o influxo de leucócitos ao local de inflamação e a produção de radicais de superóxido e interleucina-1, além de possuir efeito dose-dependente no metabolismo de fibroblastos e fibrócitos, resultando em aumento na produção de colágeno, proteínas não colágenas e glicosaminoglicanos sulfatados. Os GAGPS ligam-se ao tecido conectivo por cargas negativas dos grupos sulfatados (TROTTER, 1996). Relatos de profissionais indicam resultados satisfatórios na recuperação clínica de tendinites agudas em eqüinos diagnosticadas na rotina, após a aplicação intramuscular de 500 mg de GAGPS a intervalos de quatro dias num total de sete aplicações (DOW et al., 1996).

Resultados aparentemente satisfatórios foram obtidos com a administração intramuscular de GAGPS em tendinite induzida experimentalmente por

colagenase (REDDING et al.,1999). A administração local de GAGPS melhorou as características morfológicas e as propriedades bioquímicas do tecido cicatricial de coelhos com lesões tendíneas experimentalmente induzidas (MARR et al., 1993). A aplicação única e intratendínea de GAGPS no tratamento de tendinite aguda em equino revelou parâmetros ultra-sonográficos satisfatórios 177 dias após a lesão, sem sinais de recidiva após retorno do animal às atividades atléticas (SMITH, 1992).

Por outro lado, DYSON (1997) não constatou diferença na ocorrência de recidivas de tendinite do tendão flexor digital superficial de equinos tratados conservativamente, comparados com equinos tratados com hialuronato de sódio e GAGPS intratendineamente e GAGPS sistêmico. Do mesmo modo, MARR et al., (1993) não observaram efeitos benéficos com a utilização de GAGPS intramuscular e intralesional no tratamento de tendinites agudas em equinos comparadas ao tratamento conservativo. Embora maior proporção de animais tratados com GAGPS tenha retornado ao trabalho após período de repouso menor, o índice de recidivas foi de 50% nos animais tratados e apenas 31% nos animais tratados conservativamente. Estes autores inferem que o índice de retorno às atividades atléticas esteja relacionado com a severidade das lesões e não com o tipo de tratamento preconizado.

## REFERÊNCIAS

ANDRADE, Z. Tecido conjuntivo, reparo, regeneração e cicatrização. In: MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. **Patologia processos gerais**. São Paulo: Atheneu, 1992. p. 123-135.

CALDINI, E. T. G. **Estudo histoquímico e ultra-estrutural do colágeno na fibrose periglandular do endométrio equino**. 1992. 123f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental e Comparada) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1992.

CARON, J.P.; KANEENE, J. B.; MILLER, R. Reported use and perceived efficacy of polysulfated glycosaminoglycan: a survey of the AAEP. In: ANNUAL

CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 40.,1994, Vancouver. **Proceedings....** Vancouver: Ed. 1994. p.137-138.

CARON, J. P.; KANEENE, J. B.; MILLER, R. Results of a survey of equine practitioners on use and perceived efficacy of polysulfated glycosaminoglycan. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v.209, n.9, p.1564-1568, 1996.

DOW, S. M.; WILSON, A. M.; GOODSHIP, A. E. Treatment of acute superficial digital flexor tendon injury in horses with polysulfated glycosaminoglycan. **Vet. Rec.**, London, v.139, p.413-416, 1996.

DYSON, S. J. Treatment of superficial digital flexor tendinitis: a comparison of conservative management, sodium hyaluronate, and glycosaminoglycan polysulfated. **Proc. Am. Assoc. Equine Pract.**, Newmarket, v.43, p.297-300, 1997.

FOLAND, J. W.; TROTTER, G. W.; POWERS, B. E.; WRIGLEY. R. H.; SMITH. F. N. Effect of sodium hyaluronate in collagenase induced superficial digital flexor tendinitis in horse. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v.53, p.2371-6, 1992.

FREAN, S. P.; LEES, P. Effects of polysulfated glycosaminoglycan and hyaluronan on prostaglandin E<sub>2</sub> production by cultured equine synoviocytes. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v.61, n.5, p.499-505, 2000.

GAUGHAN, E. M.; NIXON, A. J.; KROOK, A. E.; MANN, K. A.; MOHAMMEDH L. and BARTEL, D. L. Effects of sodium hyaluronate on tendon healing and adhesion formation in horses. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v.52, p.764-773, 1991.

GENOVESE, R. L. Sonographic response to intralesional therapy with Beta-aminopropionitrile fumarate for clinical tendon injuries in horses. **Proc. Am. Assoc. Equine Pract.**, Newmarket, v.38, p.265-272, 1992.

GIFT, L. J.; GAUGHAN, R. M.; DEBOWES, J. P. The influence of intratendinous sodium hyaluronate on tendon healing in horse. **Vet. Comp. Orthop. Traumatol.**, Stuttgart, v.5, p.151-7, 1992.

GOODSHIP, A. E.; BIRCH, H. L. The Pathophysiology of the tendon in the equine athlete. In: DUBAI INTERNATIONAL EQUINE SIMPOSIUM, 1996, Dubai. **Proceedings...**Dubai: Neyenesch Printers, 1996, p.83-107.

GOODSHIP, A. E.; SILVER, I. A.; ROSSDALE, P. D. Biochemistry and pathology of tendon injury and healing. **Equine Vet. J.**, Newmarket, v. 1, supp., p.5-22, 1983.

GOODSHIP, A. E.; BIRCH, H. L.; WILSON, A. M. The Pathophysiology and repair of tendon ligament injury. **Vet. Clin. North Am. Equine Pract.**, Philadelphia, v.10, p.322-49, 1994

HENNINGER, R. Treatment of superficial digital flexor tendonitis. **Vet. Clin. North Am. Equine Pract.**, Philadelphia, v.10, p.409-424, 1994.

HORTON, W. A. Histochemistry – available tool in connective tissue research. **Collagen Relat. Res.**, Stuttgart, v. 4, p.231-237, 1984.

JONES, E.; and WHITE, G. The current status of the clinical use of polysulfated glycosaminoglycan in the USA. **J. Equine Vet. Sci.**, Tokio, v.16, n.2, p.53-57, 1996.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 9.ed, Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1999, 414p.

JUNQUEIRA, L. C. U.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochem. J.**, Berlim, v.11, p. 447-455, 1979.

JUNQUEIRA, L. C. U.; BIGNOLAS, G.; MOURÃO, P. A . S. Quantitation of collagen-proteoglycan interaction in tissue sections. **Conn. Tissue Res.**, London, v.7, p.91-96, 1980.

JUNQUEIRA, L. C. U.; MONTES, G. S.; SANCHES, E. M. The influence of tissue section thickness on the study of collagen by the picrosirius-polarization method. **Histochemistry**, Berlim, v. 74, p. 153-156, 1982.

JUNQUEIRA , L. C. U.; MONTES, G. S.; TOLEDO, O . M. S. Evidence for collagen molecular orientation in basement membranes. **Histochem. J.**, Berlim, v.79, p.347-403, 1983.

KRAUS-HANSEN, A. E.; FACKELMAN, G. E.; BECKER, C.; WILLIAMS, R.M. PIPERS, F. S. Preliminary studies on the vascular anatomy of the equine superficial digital flexor tendon. **Equine Vet. J.**, Newmarket, v.24, p.46-51, 1992.

LUNA, L. G. **Histopatologic methods and color atlas of special stains and tissue artifacts**. Downers Grove: Johnson, 1992, p.767.

LUST, G.; WILLIAMS, A. J.; BURTON-WURSTER, N. Effects of intramuscular administration of glycosaminoglycan polysulfated on signs of incipient hip dysplasia in growing pups. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v.53, n.10, p.1836-1843, 1992.

MARR, C. M.; LOVE, S.; BOYD, J. S.; WRIGHT, N.G.; MURRAY, M. Factors affecting the clinical outcome of injuries to the superficial digital flexor tendon in National Hunt and point-to-point race horses. **Vet. Rec.**, London, v.132, p.476-476, 1993.

MONTES, G. S.; JUNQUEIRA, L. C. U. The use of the picosirius polarization method for the study of the biopathology of collagen. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.86, p.1-11, 1991.

MONTES, G. S.; KRISZTAN, R. M.; SHIGIARA, K. M. Histochemical and morphological characterizations of reticular fibers. **Histochemistry**, Berlim, v.65, p.131-41, 1980.

OXLUND, H. and ANDREASSEN, T.T. The roles of hyaluronic acid, collagen and elastin in mechanical properties of connective tissues. **J. Anat.**, Cambridge, v.131, p.611-620, 1980.

PARRY, D. A. D.; CRAIG, A. S. Growth and development of collagen fibrils in connective tissue. in: RUGGERI, A.; MOTTA, P. M. (Ed). **Ultra structure of the connective tissue matrix**. Boston: Martinus Nijhoff, 1984. p. 34-64.

PEACOCK, E. E. **Wound repairs**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1984. 230 p.

POOL, R. R. Pathologic changes in tendinitis of athletic horses. In: DUBAI INTERNATIONAL EQUINE SIMPOSIUM, 1996, Dubai. **Proceedings.....Dubai:** Neyenesch Printers, 1996. p.109-117.

RASMIR-RAVEN, A.; COYNE, C. P.; FENWICK, B. W.; GAUGHAN, E. M.; ANDREWS, G. A.; DEBOWES, R. M. Inhibition of complement activity by polysulfated glycosaminoglycans. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v.53, n.1, p.87-90, 1992.

REDDING, W. R.; BOOTH, L. C.; POOL. R. R. The effects of polysulfated of glycosaminoglycan on the healing of collagenase induced tendinitis. **Vet. Comp. Orthop. Traumatol.**, Stuttgart, v.12, p.48-55, 1999.

REEF, V. B.; GENOVESE, R. L., DAVIS, W. M. Results of horses with superficial digital flexor treated with intralesional  $\beta$ -aminopropionitrile fumarate **Proc. Am. Assoc. Equine Pract.**, Newmarket, v.43, p.301-305, 1997.

REEF, V. B.; GENOVESE, R. L.; BYRD, J. W.; REED, K. P.; DAVIS, W. M. Treatment of superficial digital flexor tendon injuries with beta-aminopropionitrile fumarate (BAPN-F): sonographic evaluation of early tendon healing and remodelling. In: DUBAI EQUINE INTERNATIONAL SYMPOSIUM, 1996, Dubai. **Proceedings...** p.423-430.

RENNARD, S. I.; STIER, L. E.; CRISTAL, R. Intracellular degeneration of newly synthesized collagen. **J. Invest. Dermatol.**, Osaka, v.79, p.77-82, 1982.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V. **Inflammation and repair**. In: ROBBINS S. L. **Pathologic basis of disease**. Pennsylvania: W. B. Saunders, 1994. p. 51-92.

SALTI, N. I.; TUEL, R. J.; MASS, D.P., Effect of hyaluronic acid on rabbit profundus flexor tendon healing *in vitro*. **J. Surg. Res.**, Duluth, v. 55, p.411-415, 1993.



SILVER, I. A.; BROWN, P. N.; GOODSHIP, A. E.; LANYON, L. E.; McCULLAGER, K. G.; PERRY, G. C.; WILLIAMS, I. F. A clinical and experimental study of tendon injury, healing and treatment in the horse. **Equine Vet. J.**, Newmarket, v.1, Suppl., p.5-22, 1983.

SMITH, R. K. W. A case of superficial digital flexor tendinitis: ultrasographic examination and treatment with intralesional polysulphated glycosaminoglycans. **Equine Vet. Educ.**, Newmarket, v.4, n. 6, p.280-285, 1992.

SPURLOCK, G. H.; SPURLOCK, S. L.; PARKER, G. A. Evaluation of hylartin V therapy for induced tendinitis in the horse. **J. Equine Vet. Sci.**, Tokio, v.9, p.242-6, 1989.

STROMBERG, B. The Normal and diseased superficial flexor tendon in racehorses; a morphologic and physiologic investigation. **Acta Radiol.**, Basel, v.305, p.1-94, 1971.

STRYER, L., Connective tissue proteins. In: **Biochemistry**, 3. ed. Feerman & Co. New York, 1988, p.261-280.

THOMAS, C.; JONES, L.C. HUNGERFORD, D. S. Hyaluronic acid and its effect on postoperative adhesions in the rabbit flexor tendon. **Clin. Orthop. Rel. Res.** Philadelphia, v.206, 1986. p.281-289.

TODHUNTER, R. J.; LUST, G. Polysulfated glycosaminoglycan in the treatment of osteoarthritis. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburgh, v.204, n.8, p.1245-1251, 1994.

TROTTER, G. W. Polysulfated glycosaminoglycan (ADEQUAN). In: McLWRAITH, C.CW. TROTTER, G. W. **Joint disease in the horse**. Philadelphia: Saunders, 1996. p.270-280.

WILLIAMS, I.F.; MCCULLAGH, K. G.; SILVER, I. A. The distribution of types I and III collagen and fibronectin in the healing equine tendon. **Conn. Tissue Res.**, London, v.12, p.211-227, 1984.

## **CAPÍTULO 2- TRATAMENTO COM GLICOSAMINOGLICANOS POLISSULFATADOS NO PROCESSO CICATRICIAL TENDÍNEO EM EQÜINOS. ANÁLISE MORFOLÓGICA**

### **RESUMO**

Os glicosaminoglicanos polissulfatados (GAGPS) são amplamente utilizados no tratamento das doenças articulares degenerativas de várias espécies. O escopo deste estudo foi o de analisar morfológicamente o efeito do tratamento com glicosaminoglicanos polissulfatados (GAGPS) na organização do colágeno na área de regeneração tendínea de tendões flexores superficiais em dez cavalos árabes de ambos os sexos após injúria pela colagenase. Segmentos de 20 tendões flexores digitais dos membros torácicos lesionados pela colagenase e tratados com GAGPS (n=10) ou com salina (n=10) foram corados pelo método de picrossírius e analisados em microscópio de luz polarizada 150 dias após a injúria. A análise morfométrica foi realizada contando-se o número de feixes de colágeno organizados e desorganizados em cada um dos animais, em lâminas coradas pelo método de picrossírius empregando-se ocular integradora Carl Zeiss. A área delimitada pela ocular integradora foi determinada por meio de retículo quadriculado (Olympus, Tokyo). Para as contagens foram tomados ao acaso cinco campos, de dois cortes em duas lâminas de cada animal onde foram considerados os feixes presentes nos pontos de intercessão das linhas do retículo. Os resultados foram analisados estatisticamente e revelaram significativo aumento das fibrilas de colágeno organizadas nos tendões tratados com GAGPS. Desta forma, conclui-se que GAGPS foi efetivo na regeneração tendínea, sendo assim indicado por seu efeito morfológico no processo cicatricial observado neste estudo.

**Palavras-Chaves:** Cicatrização tendínea, Eqüino, Glicosaminoglicanos Polissulfatados, Morfometria, Tendão.

## **CHAPTER 2: POLYSULFATED GLYCOSAMINOGLYCAN TREATMENT IN TENDON WOUND HEALING IN HORSES. MORPHOLOGICAL ANALYSIS**

### **ABSTRACT**

Polysulfated Glycosaminoglycan (PSGAG) is widely utilized in the treatment of degenerative joint disease in various animals. The aim of this study was to assess morphologically the effect of PSGAG treatment on collagen organization in the tendon regeneration area of the superficial flexor tendons in ten Arabian horses, both sexes, after collagenase injury. Segments of 20 digital flexor tendons of forelimbs lesioned by collagenase and treated with PSGAG (n=10) or saline (n=10) were stained using the Picrossirius red method and examined by polarization microscopy 150 days after injured. Morphometric analysis was performed by counting the number of organized and disorganized collagen bands in each of the animals in slides stained by the Picrossirius method employing a Carl Zeiss integrated ocular system. The area delimited by on integrated ocular was determined by means of an integrating graticule (Olympus, Tokyo). Five random fields on two slides of two sections were counted for each animal, where bands were considered present at intersection points of the reticule lines. The results were submitted to statistical analysis and revealed a significant increase in organized collagen bands in the tendon treated with GAGPS. It was therefore concluded that GAGPS may be effective in tendon regeneration as indicated by the morphological effect on wound healing observed in this study.

Keywords: Collagen, Equine, Morphometry, Polysulfated Glycosaminoglycan, Tendon.

## 2. INTRODUÇÃO

O tendão é uma forte conexão fibrosa proveniente de extensões do endomísio, perimísio ou epimísio, que são os envoltórios dos agrupamentos de fibras musculares (SPENCE,1991). Embora resistente, pode ser lesado por pressão, estresse ou fricção excessiva principalmente se comprimido contra tecidos rígidos ou desviado sobre proeminências ósseas. Naturalmente existem formas de proteção do tendão tais como os ossos sesamóides, bolsas ou bainhas sinoviais (SPENCE,1991). Os tendões apresentam baixa exigência metabólica, são pouco irrigados e não sangram ao corte. São compostos por tecido conectivo denso modelado, com baixa celularidade, cuja unidade básica são as fibras formadas por colágeno tipo I (75%), tipo II (5%) e tipo III (20%), direcionadas longitudinalmente ao eixo tendíneo. Apesar de apresentarem particularidades funcionais e estruturais, os diversos tipos de colágeno nos tendões têm estrutura química e organizacional semelhantes. As moléculas de colágeno são formadas pela associação em tripla hélice de três cadeias polipeptídicas alfa formando homo ou heterotrímeros, dependendo do tipo de colágeno presente. A estrutura triplo-helicoidal do colágeno e as ligações covalentes intermoleculares no interior das fibrilas são responsáveis pela resistência à tensão, que é característica do colágeno (INGELMARK, 1948; KASTELIC et al., 1978; HOLMES et al., 1991).

O tecido conectivo apresenta diversos tipos de células separadas por abundante material extracelular sintetizado por elas. A riqueza de material extracelular é uma de suas características mais evidentes, caracterizados por uma parte com estrutura microscópica definida representada pelas fibras do conectivo e pela matriz extracelular ou substância fundamental, um gel viscoso de macromoléculas alongadas (glicosaminoglicanas, proteoglicanas e glicoproteínas adesivas) muito hidratadas que formam um arcabouço entrelaçado e ligado às fibras e aos receptores celulares denominados integrinas (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999).

Quando relaxada, a unidade estrutural das fibras colágenas apresenta-se de forma ondulada, em termos de comprimento e ângulo de onda. Podem-se diferenciar dentro de um fascículo e também em toda região transversal do

tendão. Por meio de análise microscópica com luz polarizada podemos mensurar estas ondulações (INGELMARK,1948; KASTELIC et al.,1978; HOLMES et al.,1991).

Durante a resposta tecidual após a injúria tendínea, as glicoproteínas, a fibronectina e o colágeno tipo III são sintetizados em quantidade aumentada. Na primeira semana após a injúria a fibronectina é identificada no interior do tendão por imunofluorescência indireta (WILLIAMS et al.,1984; WATKINS et al.,1985). O corante fixa-se na matriz, nas proximidades dos capilares e de células semelhantes aos fibroblastos. O colágeno tipo III tem localização pericelular e a matriz é observada até três meses após a lesão. Sua coloração mantém-se por até 14 meses (WILLIAMS et al.,1984).

Além do colágeno, os tendões possuem ainda proteínas estruturais como a elastina e os componentes glicosaminoglicanos, que estão presentes na matriz extracelular. A análise bioquímica da matriz extracelular demonstra aumento no conteúdo de glicosaminoglicanos sulfatados totais, aumento na proporção de colágeno tipo III e diminuição na ligação do colágeno com a fluoresceína na região central de tendões degenerados quando comparado à periférica do mesmo tendão. Estas mudanças sugerem alterações no metabolismo celular e modificações da matriz na região central do tendão que provavelmente contribuem para perda da função mecânica nesta região do tendão, predispondo-o à ruptura parcial característica no tendão (BIRCH et al., 1998).

O processo cicatricial pode ser monitorado pela utilização de métodos diagnósticos de imagem como o ultra-sonográfico ou histopatológico. Dentre os últimos, a avaliação do tecido cicatricial por biópsia é um dos mais utilizados em estudos experimentais. Este exame permite a caracterização morfológica do processo regenerativo (HATAKA et al., 1999).

Muitas técnicas de coloração foram desenvolvidas para permitir a diferenciação dos diversos tipos de fibrilas colágenas ao microscópio óptico. A maioria destas pertence à categoria das colorações tricrômicas. Embora as fibras colágenas apareçam geralmente bem coradas por estes métodos, outras estruturas que contém colágeno, como as fibras reticulares e as membranas

basais não são coradas seletivamente uma vez que a densidade da cor resultante é insuficiente para dar resolução a essas estruturas delicadas. Desse modo, os vários tipos geneticamente distintos de colágeno não podem ser distinguidos em cortes histológicos corados por métodos como o de Van Gienson (HORTON,1984).

Embora tenha sido idealizado para a demonstração de colágeno, o método de Mallory não é adequado para seu estudo (LUNA, 1992). Além disso, há referência de que os métodos tricrômicos não apresentam resultados confiáveis mesmo nas próprias fibras colágenas, pois estas não se apresentam de cor uniforme no mesmo corte histológico (JUNQUEIRA et al., 1983).

A coloração pelo método picrossírius faz com que grande quantidade de moléculas do "sirius red", de caráter ácido e alongadas, disponham-se paralelamente às moléculas de colágeno o que provoca aumento considerável da birrefringência das fibras colagenosas quando observadas em luz polarizada (CALDINI,1992). Apesar do corante "siriús red" ligar-se inespecificamente aos componentes de caráter básico do tecido, o fenômeno do aumento de birrefringência ocorre exclusivamente com o colágeno. Assim, a coloração com picrossírius associada à microscopia de polarização, constitui-se em método histoquímico específico para definir a orientação de moléculas de colágeno (JUNQUEIRA et al., 1980; JUNQUEIRA et al., 1982; MONTES & JUNQUEIRA, 1991).

Considerando a importância de se estudar o efeito do tratamento intratendíneo com GAGPS nos processos de regeneração e cicatrização, o objetivo deste trabalho foi o de investigar, com a utilização da microscopia com luz polarizada, a organização do colágeno em tendões flexores digitais superficiais (TFDS) de eqüinos adultos submetidos à tendinite induzida pela colagenase e tratados com glicosaminoglicanos polissulfatados.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Animais

Foram utilizadas amostras de 20 tendões flexores digitais superficiais (TFDS), dos membros torácicos, procedentes de 10 eqüinos da raça Puro Sangue Árabe (PSA), machos ou fêmeas, com idade variando entre dois e seis anos. Nos tendões dos membros torácicos esquerdos, de todos os animais foi induzida tendinite com colagenase.

### Indução da tendinite

O processo inflamatório foi induzido pela injeção intratendínea de 0,2 mL (2,5 mg/mL) de colagenase<sup>1</sup>, na região central do tendão, usando agulha hipodérmica 23G, em três locais ao longo do eixo tendíneo longitudinal, cada um distante 1,0 cm do outro, na face palmar da região metacarpiana.

### Tratamentos preconizados e avaliações previamente realizadas

Após a indução da tendinite nos TFDS dos membros torácicos esquerdos, os eqüinos foram distribuídos ao acaso em dois grupos constituídos cada um por cinco animais, denominados: GI - tendões flexores digitais superficiais dos membros torácicos esquerdos, tratados com glicosaminoglicanos polissulfatados (GAGPS)<sup>2</sup> e GII - tendões flexores digitais superficiais dos membros torácicos esquerdos tratados com solução salina. Os tendões dos membros torácicos direitos constituíram o grupo controle negativo (MARXEN, 2001).

**Grupo tratado com GAGPS (GI):** Aplicação local de 1,0 mL (125 mg) de glicosaminoglicanos polissulfatados<sup>2</sup>. Respeitando as recomendações de Van den Belt et al. (1992), o volume total foi distribuído em dois locais ao longo do tendão de forma que o volume de fluido injetado no TFDS em eqüinos não excedesse 0,5 mL por aplicação, para evitar a ruptura de fibrilas colagenosas. As aplicações da droga foram repetidas a intervalos de quatro dias num total de cinco aplicações.

---

<sup>1</sup> (colagenase tipo I:C 0130, Sigma)

<sup>2</sup> (Adequan®, Luitpold Pharmaceuticals, Shirley, NY, USA)

**Grupo tratado com Salina (GII):** foram seguidos os mesmos procedimentos do GI, entretanto estes animais receberam infiltração local de solução fisiológica, em igual volume e frequência utilizados no grupo I.

Os membros lesados permaneceram enfaixados com bandagem compressiva e os eqüinos foram confinados em baias durante os 60 dias subseqüentes. Após este período, permaneceram em piquetes até completar 150 dias. Ao final de 150 dias, os animais foram sacrificados e suas estruturas tendíneas removidas. Foram colhidas amostras de tecido cicatricial dos TFDS do membros torácicos esquerdos e dos membros torácicos direitos que foram imersos em solução de n-hexano (Labsynth) a  $-14^{\circ}\text{C}$  (gelo seco) e posteriormente descongelados para processamento histopatológico usual.

#### **Avaliação histológica das secções tendíneas sob luz polarizada**

As amostras teciduais dos tendões foram colhidas para análise histopatológica comparativa dos tendões tratados com GAGPS e com salina, assim como as amostras controle, originários dos tendões hígidos dos membros torácicos direitos. Para tanto foram seccionadas no sentido longitudinal e transversal em cortes de 5-7  $\mu\text{m}$  em micrótomo de congelação (criostato). Todos os cortes foram corados pelo método de Picrossírius (PS). Foram efetuadas avaliações histológicas da organização dos feixes colagenosos na área de regeneração (LUNA, 1992). Os cortes selecionados foram documentados em fotomicroscópio Carl Zeiss (West Germany Kpl) do Departamento de Patologia Veterinária/FCAV/Jaboticabal/Unesp.

#### **Morfometria das fibrilas de colágeno dos animais tratados com GAGPS e tratados com salina**

A morfometria foi realizada contando-se o número de feixes de colágeno organizados ou desorganizados em cada animal do grupo tratado com GAGPS ou tratado com salina em lâminas coradas pelo método de picrossírius, empregando-se ocular integradora Carl Zeiss (West Germany Kpl 10x) e objetiva de 4x, totalizando aumento de 40x. A área delimitada pela ocular integradora foi



determinada em 0,175 mm<sup>2</sup> por meio de retículo quadriculado (Olympus, Tokyo). Para as contagens foram tomados ao acaso cinco campos, de dois cortes em duas lâminas de cada animal, totalizando 1.620 pontos para cada animal. Para as contagens foram considerados os feixes presentes nos pontos de intercessão das linhas do retículo da ocular integradora (Apêndice A).

A organização tinha como parâmetro a disposição paralela dos feixes colagenosos que apresentavam colorações amarelo-ouro sob luz polarizada. Por outro lado, a desorganização era caracterizada por disposição assimétrica dos feixes colagenosos com coloração variável de verde à verde-escuro sob luz polarizada.

### **Análise estatística**

A interdependência entre os grupos e a ocorrência da reorganização dos feixes dos tendões tratados e salina foram analisados pelo teste de Qui-quadrado com nível de probabilidade de 1% utilizando o programa – “Statistical Analysis System” SAS (SCHLOTZHAWER & LITTELL,1997).

Os resultados foram expressos em percentagem de fibras organizadas e desorganizadas para cada grupo.

## **RESULTADOS**

### **Avaliação histológica das secções tendíneas dos TFDS normais**

A avaliação histológica dos TFDS dos membros torácicos direitos (grupo controle negativo) corados pelo método de picrossírius, evidenciou disposição paralela de feixes colagenosos corados em amarelo-ouro, ausência de ligações cruzadas, identificada pela coloração amarela difusa, presença de ondulações das fibras e birrefringência sob luz polarizada visualizada pela potencialização das cores (verde e amarelo) absorvidas pelas fibrilas na presença do corante. (Figura 1).

### **Avaliação histológica das secções tendíneas dos TFDS do grupo tendinite tratados com solução salina**

No grupo tratado com salina (GII) a avaliação histológica das fibrilas colagenosas sob luz polarizada evidenciou feixes de fibras colágenas desorganizadas próximo ao endotendíneo revelando grande quantidade de ligações cruzadas e pouco paralelismo das fibras, que destaca-se pela variabilidade na coloração pelo Picrossírius evidenciado coloração verde-escuro nesta área (Figuras 2 e 3).

### **Avaliação histológica das secções tendíneas dos TFDS do grupo tendinite tratado com GAGPS**

Os tendões tratados (GI) com glicosaminoglicanos polissulfatados (GAGPS) mostraram feixes de fibras colágenas desorganizadas dispostas em diferentes sentidos e com variabilidade na coloração: de amarelo-esverdeado à verde-escuro. Entretanto, visualizou-se diminuição das ligações cruzadas e presença de aumento na intensidade da birrefringência, que está associada a um maior alinhamento e organização das fibrilas colagenosas durante o processo de reparação (Figura 4).

### **Avaliação morfométrica dos feixes de colagenosos organizados e desorganizados nos grupos tratados com GAGPS e tratados com salina**

A avaliação morfométrica dos feixes organizados e desorganizados do grupo tratado totalizou 5.725 e 2.375 pontos, respectivamente, para o grupo tratado com GAGPS. Para o grupo tratado com salina, os feixes organizados totalizaram 5.338 e 2.762 pontos, respectivamente (Tabela 1).

### **Avaliação estatística**

Análise estatística dos feixes organizados e desorganizados no grupo tratado com GAGPS foi de 70,67% e 29,32% respectivamente e, no grupo tratado com salina, 65,90% e 34,09%, respectivamente (Tabela 1 e Figura 5).

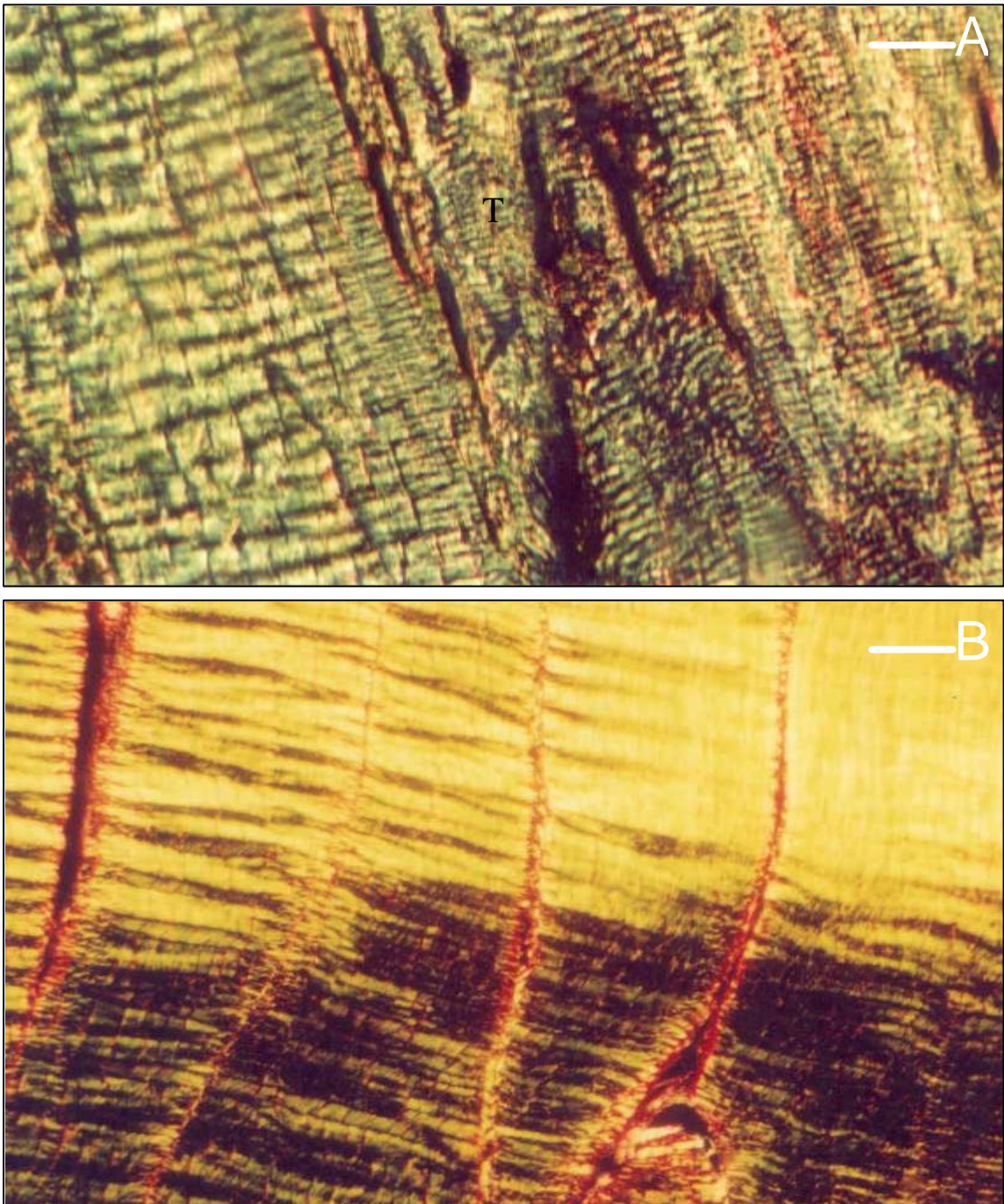
Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que as tendinites induzidas experimentalmente com colagenase de origem bacteriana e tratadas com glicosaminoglicanos polissulfatados (GAGPS), apresentaram bons resultados no remodelamento dos feixes colagenosos em relação ao grupo salina evidenciado pela diferença significativa no percentagem de feixes organizados neste grupo. Esse fato foi estatisticamente comprovado pelo teste de Qui-quadrado ( $<0,001$ ), isto é, foi identificado maior número de feixes organizados no grupo tratado com GAGPS comparado ao grupo tratado com salina.



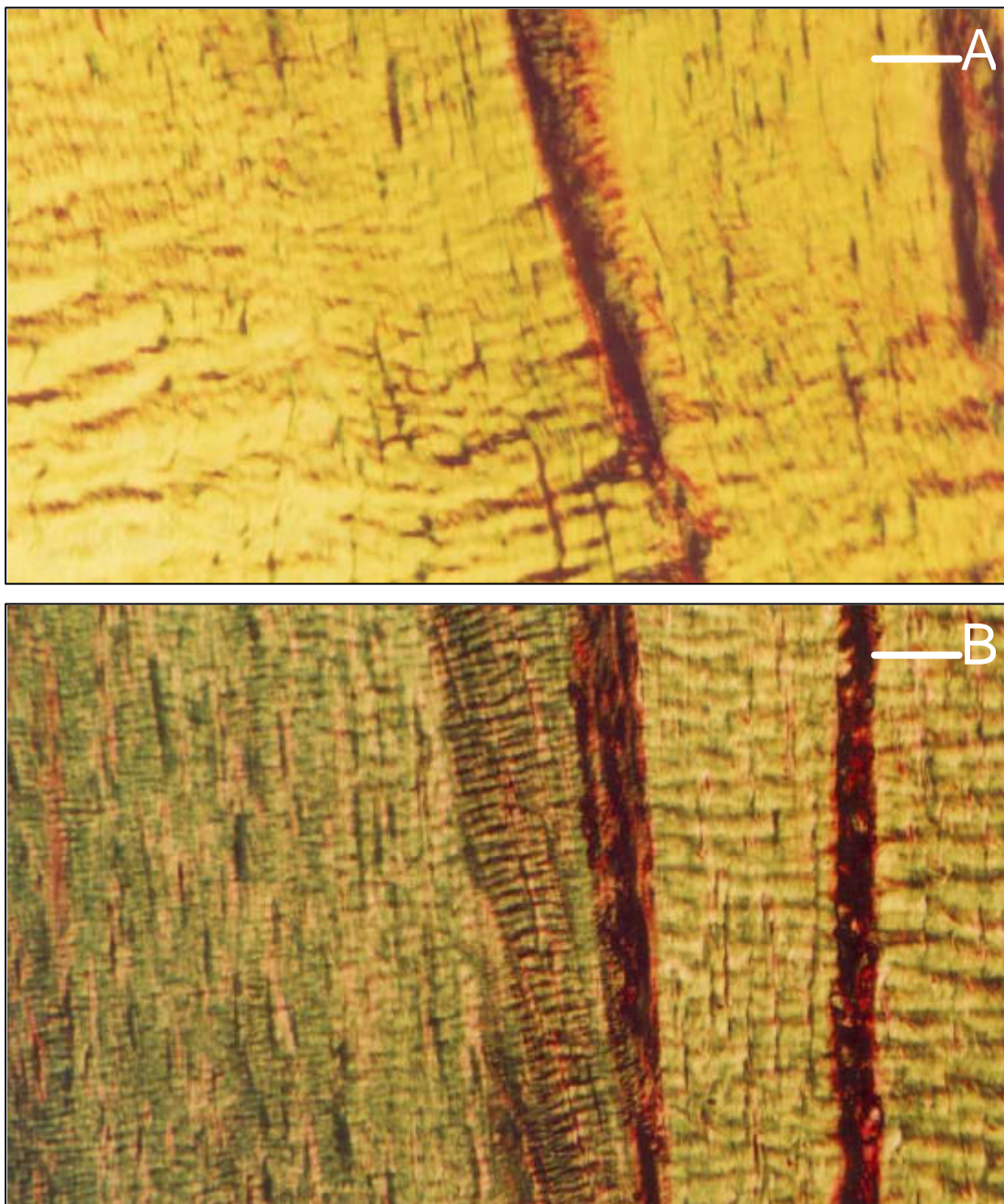
**Figura 1:** A: Aspecto histológico do TFDS de equino em corte longitudinal do grupo normal. Observar fascículos colagenosos com bandas de fibras colágenas organizadas e paralelas. Coloração de Picrosirius. Barra:1,04 $\mu$ m.



**Figura 2:** A: Aspecto histológico do TFDS de eqüino em corte longitudinal do grupo tratado com GAGPS (GI). Observar fascículos colagenosos com bandas de fibras colágenas desorganizadas mostrando orientações em diferentes sentidos. Coloração de Picrossírius. Barra: 1,04  $\mu$ m. B: Aspecto histológico do TFDS de eqüino em corte longitudinal do grupo tratado com GAGPS (GI). Observar eoitendíneo entre fascículos colagenosos com bandas de fibras desorganizadas (D) e organizadas (E). Coloração de Picrossírius. Barra: 1,04  $\mu$ m.



**Figura 3:** A: Aspecto histológico do TFDS de eqüino em corte longitudinal do grupo tratado com salina (GII). Observar transição entre fascículos colagenosos com bandas de fibras colágenas organizadas e desorganizadas mostrando orientações em diferentes sentidos, corados em verde-escuro (T). Coloração de Picrossírius. Barra: 1,04  $\mu$ m. B: Aspecto histológico do TFDS de eqüino em corte longitudinal do grupo tratado com salina (GII). Observar fascículos colagenosos com bandas de fibras colágenas desorganizadas mostrando orientação em diferentes sentidos e grande variabilidade na polarização. Coloração de Picrossírius. Barra: 1,04  $\mu$ m.



**Figura 4:** A: Aspecto histológico do TFDS de eqüino em corte longitudinal do grupo tratado com salina (GII). Observar fascículos colagenosos com banda de fibras colágenas desorganizadas mostrando orientações em diferentes sentidos e grande variabilidade na polarização. Coloração de Picrosirius. Barra: 1,04  $\mu\text{m}$ . B: Aspecto histológico do TFDS de eqüino em corte longitudinal do grupo tratado com salina (GII). Observar fascículos colagenosos com bandas de fibras colágenas desorganizadas mostrando orientações em diferentes sentidos e grande variabilidade na polarização. Coloração de Picrosirius. Barra: 1,04  $\mu\text{m}$ .

Tabela 1. Índice de feixes de colágeno organizados e desorganizados nos grupos tratados com GAGPS e salina. O nível de significância foi  $< 0,001$

	Feixes Organizados		Feixes Desorganizados		Total	
	n	%	n	%	n	%
<b>Tratado com GAGPS</b>	5.725	70,67	2.375	29,32	8.100	100
<b>Tratado com salina</b>	5.338	65,90	2.762	34,09	8100	100

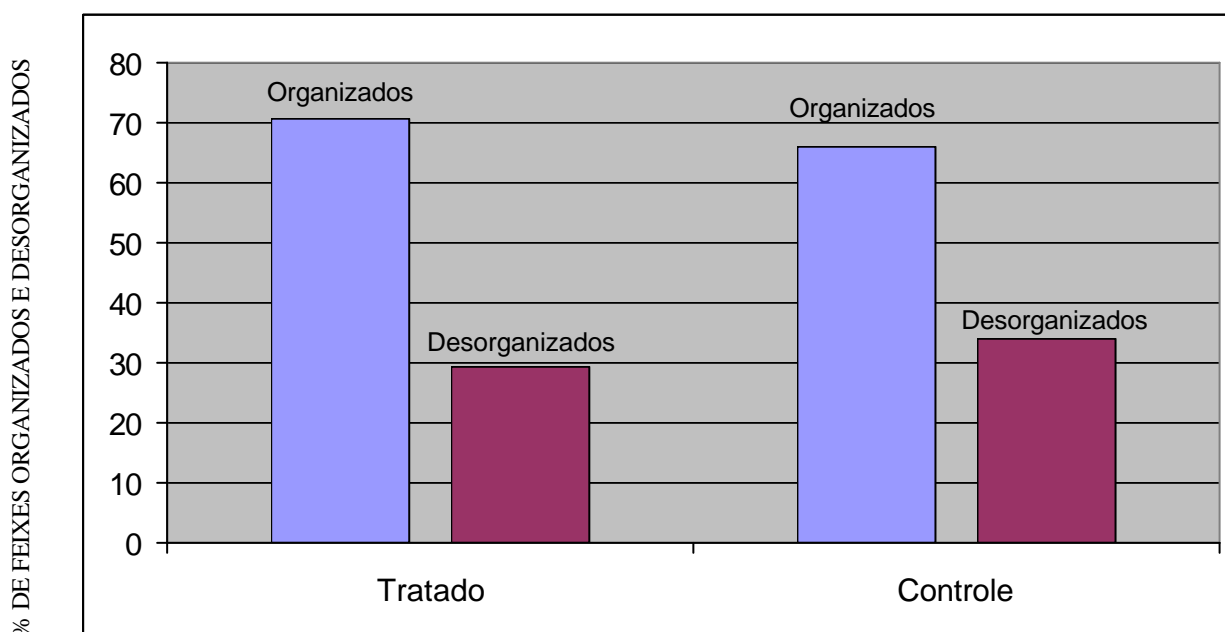


Figura 1. Percentagem de feixes de colágeno organizados e desorganizados, oriundos de tendões de equínos com tendinite induzida pela colagenase e tratados com GAGPS e salina.



## DISCUSSÃO

As tendinites constituem um dos mais graves e limitantes problemas dos eqüinos submetidos à exercícios. O processo de regeneração independentemente do tratamento preconizado é prolongado e o restabelecimento morfofuncional fica comprometido por fatores extrínsecos e intrínsecos ao tendão. Além disso, é grande os riscos de recidivas, inclusive naqueles tendões adequadamente regenerados.

Na busca de padronizar lesões tendíneas para estudos experimentais e comparados, vários métodos foram desenvolvidos na tentativa de reproduzir a tendinite espontânea. Devido às limitações em reproduzir a ruptura do tendão por estiramento mecânico, explorou-se a possibilidade de induzir lesão enzimaticamente pelo emprego de colagenase de origem bacteriana (SILVER et al., 1983). Vários autores relatam a eficiência da colagenase administrada por via intratendínea no Tendão Flexor Digital Superficial (TFDS) induzindo à tendinite com alterações clínicas semelhantes às observadas nas tendinites de ocorrência natural (GAUGHAN et al., 1989; FOLAND et al., 1992; REDDING et al., 1999; ALVES et al., 2001; MARXEN, 2001).

Neste experimento, as lesões observadas após inoculação da colagenase de origem bacteriana apresentaram alterações histológicas muito semelhantes as de ocorrência natural. Estes achados corroboram os identificados por SILVER et al., (1983), WILLIAMS et al., (1984), SPURLOCK et al., (1989), FOLAND et al., (1992), KEG et al., (1992) e ALVES et al., (2001).

Os fenômenos inflamatórios na tendinite aguda são resultantes da ação de enzimas que levam à ruptura fibrilar, hemorragia e exsudação (RUBIN et al., 2002).

O processamento histológico do tendão de eqüinos apresenta algumas dificuldades, dado a sua configuração morfológica que evidencia extremo empacotamento e rigidez das fibras de colágeno nesta espécie. O método de congelamento das amostras tendíneas descrito por MARR et al., 1993, foi utilizado

na presente pesquisa e mostrou-se mais eficiente do que a embebição em blocos de parafina facilitando o corte dos segmentos e melhorando a qualidade das amostras para a análise histopatológica.

A análise histopatológica demonstrou o tecido tendíneo normal com fibras colágenas onduladas e dispostas em feixes paralelos, separados uns dos outros por fileiras de fibroblastos alongados e finos septos de tecido conectivo organizado entre os fascículos contendo vasos sanguíneos. Os resultados obtidos no exame histopatológico realizado no 150º dia da avaliação mostraram que o grupo de animais tratados com GAGPS apresentaram fibroplasia na área de regeneração semelhante aos resultados descritos na literatura (SILVER et al.,1983; PEACOCK ,1984; SPURLOCK, 1989; GOODSHIP et al.,1994).

O tecido cicatricial caracterizou-se por hiper celularidade e vascularização intensa com fibroblastos de núcleos arredondados ou levemente alongados, parcialmente organizados entre as fibras colágenas. O endotendíneo apresentou-se hiper celular com vascularização evidente e abundante, pobremente organizado e mais espesso do que o normal. A disposição longitudinal e paralela das fibras mostrou-se parcial. Essas alterações histopatológicas observadas na cicatriz tendínea 150 dias após a indução das lesões são semelhantes às observações documentadas por outros autores (SILVER et al.,1983; WILLIAMS et al.,1984; MARR et al.,1993; CREVIER et al.,1997) em estudos sobre a fisiopatologia das tendinites clínicas induzidas enzimaticamente e não tratadas.

O estudo sob microscopia óptica de luz polarizada, associado à coloração pelo picrossírius permitiu identificar diferenças no grau de remodelamento das fibras colágenas no grupo de tendões de eqüinos tratados com Glicosaminoglicanos Polissulfatados (GAGPS) pela maior percentual de feixes colagenosos organizados em comparação ao grupo tratado com solução salina.

O grau de maturação da cicatriz significativamente maior no grupo tratado com Glicosaminoglicanos Polissulfatados (GAGPS), teve como base a identificação de maior percentagem de fibras colágenas paralelas observadas ao microscópio óptico de luz polarizada com forte birrefringência, evidenciada pela

coloração amarela e verde das fibrilas colagenosas. As ondulações das fibrilas colágenas foram visualmente potencializadas nas áreas de contração do tecido.

Os GAGPS têm a capacidade de inibir os lisossomos e diminuir o grau de inflamação (HENNINGER, 1994). São capazes de aplacar a atividade da colagenase e a ativação de macrófagos, melhorar a orientação das fibrilas de colágeno de tendões em recuperação (SMITH, 1992).

JUNQUEIRA et al., (1983), MONTES e JUNQUEIRA (1991), sugerem que o método de coloração com o picrossírius, associado à luz polarizada é um excelente método histoquímico específico para detecção de estruturas compostas por fibras colágenas orientadas.

Neste estudo, a birrefringência observada pela coloração de picrossírius sob luz polarizada nos tendões tratados com GAGPS, reflete a presença do paralelismo das fibras encontradas neste grupo e evidenciada pelas colorações amarelo e verde das fibrilas nos tipos I e III do colágeno. Segundo HENNINGER et al., (1994), a presença do aumento na intensidade de birrefringência está associado ao alinhamento e evolução do processo de reparação (JONES et al., 1996; GILLIS et al., 1997).

O tendão do equino é constituído basicamente de 75 % de fibras colágenas tipo I, 5 % do tipo II e 20 % tipo III. As moléculas de colágeno dos tipos I e II são similares em termos de periodicidade de bandas. O diâmetro destas moléculas difere, sendo o tipo I maior e o tipo III de menor diâmetro (BIRCH et al., 1998). A proporção destes dois tipos de fibras colágenas no tecido de reparação determina as propriedades mecânicas da cicatriz .

No tecido cicatricial neoformado, o colágeno inicialmente é imaturo, compreendendo predominantemente fibras colágenas tipo III, de pequeno diâmetro. Com a evolução do processo de reparação, o diâmetro das fibras aumenta assim como o número de ligações químicas estáveis, juntamente com o aumento de proporções de fibras tipo I, levando meses para completar o processo de maturação e remodelamento da cicatriz (GOODSHIP et al., 1994; MURPHY e NIXON, 1997).

O tratamento com glicosaminoglicanos polissulfatados (GAGPS) nas lesões tendíneas induzidas neste estudo, possibilitou melhora significativa na qualidade da recuperação tendínea. Resultado semelhante foi obtido após aplicação única intralesional de 1,0 mL de glicosaminoglicanos polissulfatados em uma tendinite clínica após cinco dias de evolução (SMITH, 1992).

Estudos com tendinite experimental, induzida pela collagenase em eqüinos, mostraram efeitos benéficos do tratamento intramuscular com glicosaminoglicanos polissulfatados (REDDING et al.,1999).

O método de coloração com o picrossírius provou ser adequado para o estudo do tratamento com o glicosaminoglicanos polissulfatados na tendinite induzida pela collagenase em eqüinos. Foi possível a identificação de birrefringência e a presença de ondulações das fibras nas áreas de regeneração, o que indica reorganização do colágeno nestas áreas. Em alguns segmentos histológicos, observou-se que a espessura do corte alterou a cor e direcionamento das fibrilas. Dobras nos cortes histológicos aparecem mais fortemente birrefringentes e apresentam coloração diferente da usual quanto comparado ao tecido tendíneo adjacente (CALDINI, 1992).

Pelo exposto, os resultados permitem aferir que a administração dos glicosaminoglicanos polissulfatados possibilitou a melhora qualitativa do processo de reparação tendínea podendo contribuir de maneira decisiva para o retorno do animal a uma performance competitiva, fazendo-se possivelmente necessário um período mais prolongado de repouso, além dos cinco meses, para o restabelecimento morfofuncional das fibrilas colágenas.

## CONCLUSÕES

Considerando-se os resultados obtidos no presente trabalho, concluiu-se que:

- 1 O método de coloração de picrossírius, sob luz polarizada, mostrou-se eficiente para o estudo da organização das fibras colágenas na fase de remodelamento cicatricial.
- 2 As lesões tendíneas tratadas com glicosaminoglicanos polissulfatados apresentaram maior percentual de redução de feixes desorganizados na área lesada.
- 3 Os glicosaminoglicanos polissulfatados preveniram a formação de ligações cruzadas das fibras colágenas mantendo o paralelismo das fibras colágenas e conferindo maior resistência da estrutura tendínea.

## REFERÊNCIAS

- ALVES, A. L. G.; RODRIGUES, M. A. M.; BORGES, A. S.; NICOLETTI, J. L. M. Influência do fumarato de beta-aminopropionitrila associada ao exercício na cicatrização tendínea eqüina – Avaliação clínica e ultra-sonográfica. **Rev. Educ. Cont. CRMV-SP**, São Paulo, v. 4, n. 1, p.19-27, 2001.
- BIRCH, H.L.; BAILEY, A J.; GOODSHIP., AN E. Macroscopic 'degeneration' of equine superficial digital flexor tendon is accompanied by a change in extracellular matrix composition. **Equine Vet. J.**, Newmarket, v.30, n.6, p.534-539,1998.
- CALDINI, E. T. G. **Estudo histoquímico e ultra-estrutural do colágeno na fibrose periglandular do endométrio eqüino.**1992. 123f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental e Comparada) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia , Universidade de São Paulo, São Paulo,1992.
- CREVIER, N.; COLLOBERT, C.; POURCELOT, P. Mechanical properties of pathological equine superficial digital flexor tendons. **Equine Vet. J.**, Newmarket, v. 23, suppl. p.23-27, 1997.
- FREAN, S. P.; LEES, P. Effects of polysulfated glycosaminoglycan and hyaluronan on prostaglandin E<sub>2</sub> production by cultured equine synoviocytes. **Am. J. Vet. Res**, Schaumburg, v.61, n.5, p.499-505, 2000.
- FOLAND, J. W.; TROTTER, G. W.; POWERS, B. E.; WRIGLEY. R. H.; SMITH. F. N. Effect of sodium hyaluronate in collagenase induced superficial digital flexor tendinitis in horse. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v.53, p.2371-6,1992.
- GAUGHAN, E. M.; NIXON, A. J.; KROOK, A. E.; MANN, K. A.; MOHAMMEDH L. and BARTEL, D. L. Effects of sodium hyaluronate on tendon healing and adhesion formation in horses. **Am. J. Vet Res**. Schaumburg, v.52, p.764-773, 1989.
- GILLIS, C. L. Rehabilitation of tendon and ligament injuries. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 43., 1997, Phoenix. **Proceedings...** Phoenix: Editora, 1997, p.306-309.

GOODSHIP, A. E.; BIRCH, H. L.; WILSON, A. M. The Pathophysiology and repair of tendon lligament injury. **Vet. Clin. North Am. Equine Pract**, Philadelphia, v.10, p.322-349,1994.

HATAKA, A.; MORAES, J. R. E.; PAURA, D.; FÁVARO, A. F.; MORAES, F. R.; PERECIN, D. Evolution of the vascular pattern in deep flexor tendon healing. An experimental study in dogs. **Braz. J. Morphol. Sci.**, São Paulo, v.16, p.203-208, 1999.

HENNINGER, R. Treatment of superficial digital flexor tendonitis. **Vet. Clin. N. Am. Equine Pract**, Philadelphia, v.10, p.409-424, 1994.

HOLMES, D. F.; WATSON, R. B.; KADLER, K. E. On the regulation of collagen fibril shape and form. **Biochem. Soc. Trans.**, London, v19, p.808-811, 1991.

HORTON, W. A. Histochemistry – available tool in connective tissue research. **Collagen Relat. Res.**, Stuttgart, v. 4, p.231-237, 1984.

INGELMARK, B. E. The structure of tendon at various ages and under different functional conditions: an. electron-microscopic investigation of Achilles tendon from white rats. **Acta Anat.**, Basel, v.6, p.193-225, 1948.

JONES, E.; WHITE, G. The currents status of the clinical use of polysulfhated glycosaminoglycan in the USA. **J. Equine Vet. Sci.**, Tokio, v.16, n.2, p.53-57, 1996.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**, 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1999. 414p.

JUNQUEIRA, L. C. U.; BIGNOLAS, G.; MOURÃO, P. A . S. Quantitation of collagen-proteoglycan interaction in tissue sections. **Conn. Tissue Res.**, London, v.7, p.91-96, 1980.

JUNQUEIRA, L. C. U.; MONTES, G. S.; SANCHES, E. M. The influence of tissue section thickness on the study of collagen by the picrosirius-polarization method. **Histochemistry**, Berlim, v.74, p.153-156, 1982.

JUNQUEIRA , L. C. U.; MONTES, G. S.; TOLEDO, O . M. S. Evidence for collagen molecular orientation in basement membranes. **Histochem J.**, Berlim, v.79, p.347-403, 1983.

KASTELIC, J.; GALESKI, A.; BAER. E. The multicomposite structure of tendon. **Conn. Tissue Res.**, Berlim, v. 6, p.11-23, 1978.

KEG, P.R.; Van den BELT, A. J. M.; MERKENS, H. W. The effect of regional nerve blocks on the lameness caused by collagenase induced tendonitis in the midmetacarpal region of the horse: a study using gait analysis, and ultrasonography to determine tendon healing. **J. Vet Med. Assoc.**, Schaumburg, v.39, p.349-364, 1992.

LUNA, L. G. **Histopatologic methods and color atlas of special stains and tissue artifacts**. Downers Grove: Johnson, 1992, p.767.

MARR, C. M.; LOVE, S.; BOYD, J. S.; WRIGHT, N.G.; MURRAY, M. Factors affecting the clinical outcome of injuries to the superficial digital flexor tendon in National Hunt and point-to-point racehorses. **Vet. Rec.**, London, v.132, p.476-476, 1993.

MARXEN, S. **Análise da eficácia do Polissulfato de Glicosaminoglicanas no tratamento intratendíneo de tendinite induzida enzimaticamente pela colagenase em eqüinos**. 2001. 77 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Animal)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2001.

MONTES, G. S.; JUNQUEIRA, L. C. U. The use of the picosirius polarization method for the study of the biopathology of collagen. **Memorial do Instituto Osvaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.86, p.1-11, 1991.

MURPHY, D. J.; NIXON, A. J. Biochemical and site-specific effects of insulin-like growth factor I on intrinsic tenocyte activity in equine flexor tendons. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v. 58, n.1, p.103-109, 1997.

PEACOCK, E. E. **Wound repairs**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1984. 230 p.



REDDING, W. R.; BOOTH, L. C.; POOL, R. R. The effects of polysulfated of glycosaminoglycan on the healing of collagenase induced tendinitis. **Vet. Comp. Orthop. Traumatol.**, Stuttgart, v.12, p.48-55, 1999.

RUBIN, E.; FARBER, J. L. **Patologia**, 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-koogan, 2002.

SCHLOTZHAWER, S.; LITTELL, R. C. **SAS System for elementary statistical analysis**, 2. Ed. Cary: SAS Institute, 1997. 456p.

SILVER, I. A.; BROWN, P. N.; GOODSHIP, A. E.; LANYON, L. E.; McCULLAGER, K. G.; PERRY, G. C.; WILLIAMS, I. F. A clinical and experimental study of tendon injury, healing and treatment in the horse. **Equine Vet. J.**, Newmarket, v.1, Suppl., 1, p.5-22, 1983.

SMITH, R. K. W. A case of superficial digital flexor tendinitis: ultrasonographic examination and treatment with intralesional polysulphated glycosaminoglycans. **Equine Vet. Educ.**, Newmarket, v.4, n. 6, p.280-285, 1992.

SPENCE, A. P. **Anatomia humana básica**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1991.p. 65, 68, 189.

SPURLOCK, G. H.; SPURLOCK, S. L.; PARKER, G. A. Evaluation of hylartin V therapy for induced tendinitis in the horse. **J. Equine Vet. Sci.**, Wildomar, v.9, p.242-6, 1989.

Van den BELT, A. J. M.; KEG, P. R.; DIK, K. J. The correlation between the dose and distribution of intratendinous fluid injections in the flexor tendons the horse: a pilot study. **Vet. Radiol. Ultrasound.**, Raleigh, v.33, p.120, 1992.

WATKINS, J.P.; AUER, J.A; GAY, S. Healing of surgically created defects in the equine superficial digital flexor tendon: collagen-type transformation and tissue morphologic reorganization. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v.46, p. 2091-2096, 1985.

WILLIAMS, I.F.; MCCULLAGH, K. G.; SILVER, I. A. The distribution of types I and III collagen and fibronectin in the healing equine tendon. **Conn. Tissue Res**, London, v.12, p.211-227,1984.

## APÊNDICE A

Resultado da contagem feixes organizados e desorganizados em tendões dos grupos tratado com GAGPS e tratado com salina analisado em microscópio de luz polarizada, sob retículo de 81 pontos em 5 campos, 2 cortes e 2 lâminas de cada animal, totalizando 1.620 pontos para cada animal.

### Grupo Tratado

#### Animal 2

Lâmina 1	Corte 1					Total
Feixes organizados	27	37	32	19	42	157
Feixes desorganizados	54	44	49	62	39	248
	81	81	81	81	81	405
Lâmina 1	Corte 2					Total
Feixes organizados	39	38	41	46	41	205
Feixes desorganizados	42	43	40	35	40	200
	81	81	81	81	81	405
Lâmina 2	Corte 1					Total
Feixes organizados	64	81	72	59	50	326
Feixes desorganizados	17	0	9	22	31	79
	81	81	81	81	81	405
Lâmina 2	Corte 2					Total
Feixes organizados	52	80	71	76	80	359
Feixes desorganizados	29	1	10	5	1	46
	81	81	81	81	81	405

#### Animal 3

Lâmina 1	Corte 1					Total
Feixes organizados	9	56	65	36	18	184
Feixes desorganizados	72	25	16	45	63	221
	81	81	81	81	81	405
Lâmina 1	Corte 2					Total
Feixes organizados	72	54	72	63	60	321
Feixes desorganizados	9	27	9	18	21	84
	81	81	81	81	81	405
Lâmina 2	Corte 1					Total
Feixes organizados	59	50	55	72	63	299
Feixes desorganizados	22	31	26	9	18	106
	81	81	81	81	81	405
Lâmina 2	Corte 2					Total
Feixes organizados	58	55	67	66	65	311
Feixes desorganizados	23	26	14	15	16	94
	81	81	81	81	81	405

**Animal 4**

Lâmina 1	Corte 1					Total
Feixes organizados	39	72	62	48	70	291
Feixes desorganizados	42	9	19	33	11	114
	81	81	81	81	81	405
Lâmina 1	Corte 2					
Feixes organizados	45	62	69	72	60	308
Feixes desorganizados	36	19	12	9	21	97
	81	81	81	81	81	405
Lâmina 2	Corte 1					
Feixes organizados	39	65	45	65	65	279
Feixes desorganizados	42	16	36	16	16	126
	81	81	81	81	81	405
Lâmina 2	Corte 2					
Feixes organizados	39	67	72	70	72	320
Feixes desorganizados	42	14	9	11	9	85
	81	81	81	81	81	405

**Animal 7**

Lâmina 1	Corte 1					Total
Feixes organizados	56	60	59	53	56	284
Feixes desorganizados	25	21	22	28	25	121
	81	81	81	81	81	405
Lâmina 1	Corte 2					
Feixes organizados	60	57	66	65	52	300
Feixes desorganizados	21	24	15	16	29	105
	81	81	81	81	81	405
Lâmina 2	Corte 1					
Feixes organizados	62	51	67	71	61	312
Feixes desorganizados	19	30	14	10	20	93
	81	81	81	81	81	405
Lâmina 2	Corte 2					
Feixes organizados	37	71	64	63	64	299
Feixes desorganizados	44	10	17	18	17	106
	81	81	81	81	81	405

**Animal 9**

Lâmina 1	Corte 1					Total
Feixes organizados	47	56	70	51	53	277
Feixes desorganizados	34	25	11	30	28	128
	81	81	81	81	81	405
Lâmina 1	Corte 2					
Feixes organizados	41	61	64	49	62	277
Feixes desorganizados	40	20	17	32	19	128
	81	81	81	81	81	405
Lâmina 2	Corte 1					
Feixes organizados	71	64	69	65	70	339
Feixes desorganizados	10	17	12	16	11	66
	81	81	81	81	81	405
Lâmina 2	Corte 2					
Feixes organizados	47	70	53	56	51	277
Feixes desorganizados	34	11	28	25	30	128
	81	81	81	81	81	405

## Grupo Controle

### ANIMAL 1

Lâmina 1	Corte 1					Total
Feixes organizados	75	70	77	65	70	357
Feixes desorganizados	6	11	4	16	11	48
	81	81	81	81	81	405
Lâmina 1	Corte 2					Total
Feixes organizados	77	65	71	75	70	358
Feixes desorganizados	4	16	10	6	11	47
	81	81	81	81	81	405
Lâmina 2	Corte 1					Total
Feixes organizados	0	6	4	10	9	29
Feixes desorganizados	81	75	77	71	72	376
	81	81	81	81	81	405
Lâmina 2	Corte 2					Total
Feixes organizados	6	4	3	3	9	30
Feixes desorganizados	75	77	78	78	72	380
	81	81	81	81	81	405

### ANIMAL 5

Lâmina 1	Corte 1					Total
Feixes organizados	58	46	44	56	47	251
Feixes desorganizados	23	35	37	25	34	154
	81	81	81	81	81	405
Lâmina 1	Corte 2					Total
Feixes organizados	60	47	29	60	45	241
Feixes desorganizados	21	34	52	21	36	164
	81	81	81	81	81	405
Lâmina 2	Corte 1					Total
Feixes organizados	52	59	60	53	55	279
Feixes desorganizados	29	22	21	28	26	126
	81	81	81	81	81	405
Lâmina 2	Corte 2					Total
Feixes organizados	61	48	24	71	50	254
Feixes desorganizados	20	33	57	10	31	151
	81	81	81	81	81	405

### ANIMAL 6

Lâmina 1	Corte 1					Total
Feixes organizados	14	10	10	24	20	78
Feixes desorganizados	67	71	71	57	51	327
	81	81	81	81	81	405
Lâmina 1	Corte 2					Total
Feixes organizados	73	36	62	50	51	272
Feixes desorganizados	8	45	19	31	30	133
	81	81	81	81	81	405
Lâmina 2	Corte 1					Total
Feixes organizados	70	66	67	73	50	326
Feixes desorganizados	11	15	14	8	31	79
	81	81	81	81	81	405

## Lâmina 2 Corte 2

Feixes organizados	62	50	36	73	67	288
Feixes desorganizados	19	31	45	8	14	117
	81	81	81	81	81	405

**ANIMAL 8**

Lâmina 1	Corte 1					Total
Feixes organizados	66	57	60	55	56	294
Feixes desorganizados	15	224	221	26	25	111
	81	81	81	81	81	405

## Lâmina 1 Corte 2

Feixes organizados	57	58	56	51	58	280
Feixes desorganizados	24	23	25	30	23	125
	81	81	81	81	81	405

## Lâmina 2 Corte 1

Feixes organizados	70	75	65	76	70	356
Feixes desorganizados	11	6	16	5	11	49
	81	81	81	81	81	405

## Lâmina 2 Corte 2

Feixes organizados	70	65	75	76	70	356
Feixes desorganizados	11	16	6	5	11	49
	81	81	81	81	81	405

**ANIMAL 10**

Lâmina 1	Corte 1					Total
Feixes organizados	48	70	67	72	52	309
Feixes desorganizados	33	11	14	9	29	96

## Lâmina 1 Corte 2

Feixes organizados	70	67	52	60	48	297
Feixes desorganizados	11	14	29	21	33	108
	81	81	81	81	81	405

## Lâmina 2 Corte 1

Feixes organizados	73	64	72	70	70	349
Feixes desorganizados	8	17	9	11	11	56
	81	81	81	81	81	405

## Lâmina 2 Corte 2

Feixes organizados	60	70	72	64	73	339
Feixes desorganizados	21	11	9	17	8	66
	81	81	81	81	81	405

## Coloração de Picrossírius

### Soluções

- 1) Ácido fosfomolibídico 0,2%
  - 2,0 gramas de ácido fosfomolibídico
  - 1000 ml de água destilada
  
- 2) Ácido Pítrico saturado
  - 6,0 gramas de ácido pítrico
  - 200 ml de água destilada
  
- 3) Solução corante de Picrossírius
  - 200 ml ácido pítrico saturado
  - 0,4 gramas de Sírius Red
  
- 4) Ácido Hidroclorídrico 0,01 N
  - 992 ml de água destilada
  - 8 ml de ácido hidroclorídrico

### PROCEDIMENTO

- Desparafinar e hidratar em água destilada;
- Ácido fosfomolibídico por 2 minutos;
- Lavar em água destilada;
- Picrossírius por 110 minutos;

- Ácido clorídrico por 2 minutos;
- Álcool etílico 70% por 45 segundos;
- Desidratar em 3 passagens de álcool 100%, clarear e montar em resina sintética.