ANA GUIOMAR MATOS SANTIAGO REIS

**Avaliação da aplicação do ultrassom terapêutico em
tendinites de equinos**

São Paulo

2009

ANA GUIOMAR MATOS SANTIAGO REIS

**Avaliação da aplicação do ultrassom terapêutico em
tendinites de equinos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Departamento:

Clínica Médica

Área de concentração:

Clínica Veterinária

Orientador:

Prof^a Dr^a Raquel Yvonne Arantes Baccarin

São Paulo

2009

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2136
FMVZ

Reis, Ana Guiomar Matos Santiago

Avaliação da aplicação do ultrassom terapêutico em tendinites de equinos / Ana Guiomar Matos Santiago Reis. – São Paulo : Ana Guiomar Matos Santiago Reis, 2009.

148 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, 2009.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.
Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Profa. Dra. Raquel Yvonne Arantes Baccarin.

1. Equino. 2. Tendinite. 3. Ultrassom terapêutico.
4. Imunoistoquímica. 5. Birrefringência. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Terapia por ultra-som no tratamento de tendinites induzidas em eqüinos: avaliação clínica, ultra-sonográfica, imunoistoquímica e análise da birrefringência intrínseca do colágeno", protocolado sob o nº957/2006, utilizando 09 (nove) eqüinos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Raquel Yvonne Arantes Baccarin está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 13/09/06".

(We certify that the Research "Therapeutic ultrasound as treatment of equine induced tendinitis: clinical, ultrasonographic, immunohistochemical evaluation and intrinsic birefringence analyses of collagen", protocol number 957/2006, utilizing 09 (nine) equines, under the responsibility of Profa. Dra. Raquel Yvonne Arantes Baccarin, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of the day 09/13/2006).

São Paulo, 14 de setembro de 2006

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: REIS, Ana Guiomar Matos Santiago

Título: Avaliação da aplicação do ultrassom terapêutico em tendinites de equinos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

À Deus por abençoar cada fase deste trabalho.

*Aos meus pais, Carmelia e Eugênio, pelo amor,
incentivo e confiança.*

*Aos meus irmãos, Camila e Eugênio Filho, pelo
apoio constante.*

AGRADECIMENTOS

À Profª Drª. **Raquel Yvonne Arantes Baccarin**, pela confiança, amizade, orientação, seu inestimável apoio e seus ensinamentos abrangentes a concretização deste trabalho. Obrigada por toda a paciência e dedicação, por acreditar na minha capacidade e me incentivar nos momentos mais difíceis.

Ao Prof. Dr. **Nivaldo Parizotto**, pela contribuição valiosa, incentivo e orientação e, sua equipe do Laboratório de Eletrotermofototerapia do Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos.

À Profª. Drª. **Ana Liz Alves** do Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, pela orientação e apoio sempre ofertados.

À Profª. Drª. **Renée Amorim** pela amizade, orientação e colaboração durante a execução dos experimentos e, sua equipe do Laboratório de Imunoistoquímica do Departamento de Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, em especial **Marcela Marcondes, Mariana Vidale e Rafael Torres**.

Ao Prof. Dr. **Stefano Hagen** do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pelo espírito de colaboração durante a execução deste experimento.

Ao Dr. **Romeu Macruz e Henrique** do Departamento de Patologia do Jockey Club de São Paulo, pela contribuição valiosa e apoio sempre ofertados.

À equipe do Laboratório para Estudos Morfofuncionais e Endocrinologia no Setor de Anatomia do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pela colaboração.

À equipe do Laboratório de Histologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, em especial, **Cláudio** e **Luciano**, pela colaboração.

À **Ana Carolina** e **Rodrigo Rossi** pelo inestimável apoio ofertado.

Aos colegas, **Paulo Frazão** e **Katherine Colomba**, pela grande contribuição na execução deste experimento.

Aos funcionários, **Rosendo**, **José Antônio**, **Osmar**, **Gervasio**, que prestaram valiosa colaboração no cuidado com os animais.

Aos enfermeiros, **Marcos**, **Henrique**, **Cícero**, pela colaboração e apoio prestados.

Aos residentes 2007/2008 do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, **Helena**, **Karen**, **Keila**, **Sandra**, **Bruna**, **Gustavo**, **Tiago** e **Paolo**, pelo apoio e incentivo sempre dispensados.

Ao Prof. Dr. **Paulo Diniz**, pela colaboração na revisão dos dados estatísticos.

À Profª. Drª. **Carmelia Reis** pelas madrugadas e finais de semana empregados na revisão linguística deste trabalho.

À minha amiga **Aline Moraes**, pela amizade, ajuda, dedicação, elaboração cuidadosa da documentação fotográfica deste trabalho e, principalmente, pela companhia nas “noites em claro”.

A todos os meus **amigos**, pelo apoio nas horas mais difíceis e pela compreensão da minha ausência.

À **Elza**, funcionária da biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pela colaboração na revisão deste trabalho.

À **FAPESP** pelo incentivo financeiro e proporcionar condições de desenvolver este projeto.

Nosso respeito aos **cavalos**, um estandarte na nossa pesquisa, que auxiliaram na elucidação deste experimento.

Enfim, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, me ajudaram a concretizar este trabalho, que muito contribuiu para o meu crescimento individual e profissional.

RESUMO

REIS, A. G. M. S. **Avaliação da aplicação do ultrassom terapêutico em tendinites de equinos.** [Evaluation of therapeutic ultrasound application on equine tendinitis]. 2009. 148 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Os equinos atletas, especialmente os cavalos de corrida, são frequentemente acometidos por lesões do sistema locomotor. A tendinite é uma enfermidade frequente, sendo o flexor digital superficial (TFDS) o mais acometido. Muitos dos métodos de tratamento para lesões de tendão são utilizados, mas poucos proporcionam cura eficiente e duradoura. Este trabalho tem por finalidade investigar o efeito do ultrassom terapêutico (UST) no processo de cicatrização do TFDS em equinos. Para tanto foram utilizados 20 equinos da raça Puro Sangue Inglês, com idade variando entre dois e nove anos, machos e fêmeas, distribuídos em três grupos (G1, G2 e G3). O G1 foi formado por oito animais, sendo que os TFDS de seus membros torácicos não foram infiltrados com colagenase e nem expostos ao UST. O G2 e o G3 foram compostos por seis animais cada. A indução da lesão foi realizada no terço médio do TFDS com 1ml da solução de colagenase (2,5mg/ml), em todos os membros torácicos dos animais do G2 e do G3. A cicatrização dos tendões foi acompanhada pelos exames clínicos e ultrassonográficos. Aleatoriamente, apenas um membro torácico de cada cavalo do G2 e do G3 foi tratado com UST, modo pulsado (ciclo de trabalho 20%), frequência de 1 MHz e intensidade 0,5 W/cm² (SATA – “spatial average temporal average”), por 5 minutos. Foram colhidas amostras de tecido tendíneo lesado no 15º dia após o início do tratamento (T15) no G2 para determinar a expressão das proteínas IGF-1, TGF- β 1 e PCNA por imunistoquímica; no 60º dia após o início do tratamento (T60) no G3 para detectar e mensurar a variação da organização dos feixes de colágenos por análise da birrefringência. Não foram observadas diferenças clínicas entre os membros tratados e não tratados dos grupos G2 e G3. Por meio da avaliação ultrassonográfica observou-se que o tamanho e ecogenicidade do tendão, tamanho e ecogenicidade da lesão, alinhamento longitudinal das fibras dos membros tratados

do G3 não diferiram de tendões normais (G1) ($P>0,05$). Não houve diferença estatística entre os grupos para a expressão de PCNA. Entretanto, os membros tratados do G2 apresentaram maior expressão do TGF- β 1, enquanto os membros não tratados apresentaram maior expressão para o IGF-1 ($P<0,05$). Os resultados da birrefringência mostraram diferença estatística significativa entre o G1 e os membros não tratados do G3 e, entre os membros tratados e não tratados do G3 ($P<0,001$). A análise dos resultados sugere que o tempo de tratamento com UST não foi suficiente no G2 para promover regeneração do tendão, mas alterou a expressão de IGF-1 e TGF- β 1, indicando aceleração do processo cicatricial. Já a irradiação do UST no G3 promoveu reorganização, agregação das fibras de colágeno e regeneração do tendão. Conclui-se que, este protocolo de tratamento de UST é eficaz tanto para acelerar o processo de cicatrização do tendão, como para melhorar a organização de suas fibras de colágeno.

Palavras-chave: Equino. Tendinite. Ultrassom terapêutico. Imunoistoquímica. Birrefringência.

ABSTRACT

REIS, A. G. M. S. **Evaluation of therapeutic ultrasound application on equine tendinitis.** [Avaliação da aplicação ultrassom terapêutico em tendinites de equinos]. 2009. 148 f Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Equine athletes are frequently afflicted with locomotor injuries, especially racing horses. Tendinitis is a common problem of lameness in horse, and then the superficial digital flexor tendinitis (SDFT) is the greatest affected. Many of the tendinitis methods of treatment have an empirical basis; but none has proved an effective cure. The purpose of this study was to evaluate the effects of therapeutic ultrasound (TUS) on equine SDFT healing process. It was submitted 20 thoroughbred horses, mares and stallions, between two and nine years old, which were divided into three groups (G1, G2 and G3). The G1 was composed of eight horses; no tendinitis was induced, so they did not received any treatment. G2 and G3 were composed of six animals each one. All G2 and G3 forelimbs received 1.0 ml of collagenase (2.5 mg/ml) in the middle of SDFT. Healing process was monitored by clinical and sonographic evaluations. Randomly, one forelimb from each horse of G2 and G3 was treated with TUS performed at a frequency of 1 MHz on pulsed mode, an intensity of 0.5 W/cm² (SATA - spatial average temporal average), for 5 minutes. After 15 treatment days, a tendon biopsy was performed on G2 tendons and protein expression for IGF-1, TGF- β 1 and PCNA were determined by immunohistochemistry. After 60 treatment days, a tendon biopsy was performed on G3 with the purpose of detecting and measuring the organization of collagen fibers through birefringence. Results showed no statistically difference for clinical examination on G2 and G3 treated and untreated tendons. Sonographic evaluation parameters such as isoechogenicity of tendon and lesion, diminution of lesion and tendon cross-sectional area, good axial alignment of collagen fibers was demonstrated by G3 treated limbs compared with normal tendon ($P>0,05$). The results showed no statistically difference between G1 and G2 treated and untreated tendons cells for PCNA expression. However, ultrasound-treated tendon cells (G2) were stained more strongly for TGF- β 1; whereas untreated tendon cells (G2) stained more strongly for IGF-1. The results

showed a statistically difference ($P < 0.001$) between G1 x G3 untreated tendons and between G3 treated and untreated tendons. Our results suggest that G2 TUS treatment time was not sufficient to improve tendon regeneration; although it modified IGF-1 and TGF- β 1 expression, accelerating tissue healing rate. In addition, G3 TUS protocol improved the arrangement and aggregation state of the collagen fibril, and promotes tendon regeneration. In conclusion, this TUS protocol is effective either to accelerate tendon healing or to improve the arrangement of the collagen fibril.

Keywords: Equine. Tendinitis. Therapeutic ultrasound. Immunohistochemistry. Birefringence.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Procedimento da indução da lesão tendínea nos membros torácicos: (A) solução de collagenase tipo I – 2,5mg/ml; (B) administração intratendínea de collagenase guiada por ultrassom; (C) imagem ultrassonográfica do posicionamento da agulha (seta branca) no centro do tendão flexor digital superficial.....	60
Figura 2 -	(A) Aparelho Avatar 1 – KLD Biosistemas Equipamentos Eletrônicos. (B) Aplicação do ultrassom terapêutico no membro torácico	62
Figura 3 -	(A) Régua para auxiliar a aferição do perímetro. (B) Aferição do perímetro da circunferência dos membros torácicos com o auxílio de fita métrica.....	64
Figura 4 -	(A) Aparelho Pro-Mag TM Ultra e agulha. (B) Biópsia do TFDS (animal 14 –G2).....	69
Figura 5 -	Aumento de volume no local da lesão 24 horas após a infiltração com collagenase (seta)	77
Figura 6 -	Imagens ultrassonográficas do corte transversal do tendão do membro tratado do animal 11 do G2: (A), anterior à infiltração (B) anterior ao início do tratamento e (C) ao final do tratamento.....	89
Figura 7 -	Imagens ultrassonográficas do corte transversal do tendão do membro não tratado do animal 11 do G2: (A) anterior à infiltração, (B) anterior ao início do tratamento e (C) ao final do tratamento	89
Figura 8 -	Mediana da ecogenicidade da lesão dos membros tratados e não tratados do G2 e G3, no decorrer da pesquisa.....	90
Figura 9 -	Imagens ultrassonográficas do corte transversal do tendão do membro tratado do animal 15 do G3: (A) anterior à infiltração, (B) anterior ao início do tratamento e (C) ao final do tratamento.....	91

Figura 10 -	Imagens ultrassonográficas do corte transversal do tendão do membro não tratado do animal 15 do G3: (A) anterior à infiltração, (B) anterior ao início do tratamento e (C) ao final do tratamento	91
Figura 11 -	Médias da área da lesão (cm ²) dos membros tratados e não tratados do G2 e G3, no decorrer da pesquisa.....	101
Figura 12 -	Porcentagem (%) da área tendínea lesada nos membros tratados e não tratados do G2 e G3, no decorrer da pesquisa.....	103
Figura 13 -	Imagens ultrassonográficas no corte longitudinal do tendão do membro tratado do animal 11 do G2: (A) anterior à infiltração, (B) anterior ao início do tratamento e (C) ao final do tratamento. Observar alinhamento das fibras.....	105
Figura 14 -	Imagens ultrassonográficas no corte longitudinal do tendão do membro não tratado do animal 11 do G2: (A) anterior à infiltração, (B) anterior ao início do tratamento e (C) ao final do tratamento. Observar alinhamento das fibras.....	106
Figura 15 -	Imagens ultrassonográficas no corte longitudinal do tendão do membro tratado do animal 15 do G3: (A) anterior à infiltração, (B) anterior ao início do tratamento e (C) ao final do tratamento. Observar alinhamento das fibras.....	108
Figura 16 -	Imagens ultrassonográficas no corte longitudinal do tendão do membro não tratado do animal 15 do G3: (A) anterior à infiltração, (B) anterior ao início do tratamento e (C) ao final do tratamento. Observar alinhamento das fibras.....	109
Figura 17 -	(A) Aspecto macroscópico da amostra de tendão normal G1. (B) Aspecto gelatinoso das amostras dos tendões do G2 e G3.....	110
Figura 18 -	Imagem microscópica da imunomarcação do anticorpo IGF-1 das células do tendão: (A) grupo controle, G1; (B) membro tratado do G2; (C) membro não tratado do G2. A imunocoloração na foto C é mais intensa que nas fotos A e B. Citoplasma das células positivas para a expressão do IGF-1 (seta). (Aumento de 40x).....	112

- Figura 19 - Imagem microscópica da imunomarcaço do anticorpo TGF-1 das clulas do tendo: (A) grupo controle, G1; (B) membro tratado do G2; (C) membro no tratado do G2. A imunocolorao na foto B mais intensa que nas fotos A e C. Citoplasma das clulas positivas para a expresso do TGF-1 (seta). (Aumento de 40x)..... 114
- Figura 20 - Imagem microscpica da imunomarcao do anticorpo PCNA das clulas do tendo: (A) grupo controle, G1; (B) membro tratado do G2; (C) membro no tratado do G2. Expresso positiva do PCNA no ncleo das clulas (seta). (Aumento de 40x)..... 116
- Figura 21 - Anlise quantitativa da birrefringncia das amostras dos tendes do (A) G1, (B) membros tratados do G3 e (C) membros no tratados do G3, com seu eixo longitudinal orientado a 45 em relao a direo de propagao da luz polarizada. (Aumento de 20x)..... 119

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Descrição dos animais segundo grupo, raça, sexo, idade (anos), peso (kg), altura da lesão (cm) e o membro que recebeu tratamento – São Paulo – 2009	58
Quadro 2 -	Escore correspondente a ecogenicidade do tecido na avaliação ultrassonográfica (RANTANEN; GENOVESE, 2003)	67
Quadro 3 -	Escore correspondente ao alinhamento longitudinal das fibras de colágeno do tendão na avaliação ultrassonográfica (RANTANEN; GENOVESE, 2003)	67
Quadro 4 -	Escala correspondente a porcentagem (%) de células positivas para expressão do respectivo anticorpo (HELLER et al., 2005)	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Perímetros das circunferências (cm) dos membros torácicos direitos dos animais do G1, G2 e G3, a cada dois centímetros, no início do experimento (A0) – São Paulo – 2009.....	78
Tabela 2 -	Perímetros das circunferências (cm) dos membros torácicos esquerdos dos animais do G1, G2 e G3, a cada dois centímetros, no início do experimento (A0) – São Paulo - 2009.....	79
Tabela 3 -	Perímetros das circunferências (cm) na altura 12 dos membros tratados e não tratados dos animais do G2 – São Paulo – 2009.....	80
Tabela 4 -	Perímetros das circunferências (cm) na altura 14 dos membros tratados e não tratados dos animais do G2 – São Paulo –2009.....	81
Tabela 5 -	Perímetros das circunferências (cm) na altura 16 dos membros tratados e não tratados dos animais do G2 – São Paulo – 2009.....	82
Tabela 6 -	Perímetros das circunferências (cm) na altura 12 dos membros tratados e não tratados dos animais do G3 – São Paulo – 2009.....	83
Tabela 7 -	Perímetros das circunferências (cm) na altura 14 dos membros tratados e não tratados dos animais do G3 – São Paulo – 2009.....	84
Tabela 8 -	Perímetros das circunferências (cm) na altura 16 dos membros tratados e não tratados dos animais do G3 – São Paulo – 2009.....	85
Tabela 9 -	Grau de claudicação dos membros tratados e não tratados do G2 – São Paulo - 2009	86
Tabela 10 -	Grau de claudicação dos membros tratados e não tratados do G3 – São Paulo – 2009	87
Tabela 11 -	Escore da ecogenicidade da lesão dos membros tratados e não tratados do G2, por avaliação ultrassonográfica – São Paulo - 2009.....	88

Tabela 12 -	Escore da ecogenicidade da lesão dos membros tratados e não tratados do G3, por avaliação ultrassonográfica – São Paulo - 2009.....	90
Tabela 13 -	Escore da ecogenicidade do tendão dos membros tratados e não tratados do G2, por avaliação ultrassonográfica – São Paulo - 2009	92
Tabela 14 -	Escore da ecogenicidade do tendão dos membros tratados e não tratados do G3, por avaliação ultrassonográfica – São Paulo - 2009	93
Tabela 15 -	Área do tendão normal (cm ²) do membro torácico direito por avaliação ultrassonográfica – São Paulo – 2009.....	94
Tabela 16 -	Área do tendão normal (cm ²) do membro torácico esquerdo por avaliação ultrassonográfica – São Paulo – 2009.....	95
Tabela 17 -	Área do tendão (cm ²) dos membros tratados e não tratados do G2, por avaliação ultrassonográfica – São Paulo - 2009.....	96
Tabela 18 -	Área da lesão (cm ²) dos membros tratados e não tratados do G2, por avaliação ultrassonográfica – São Paulo - 2009.....	97
Tabela 19 -	Comprimento longitudinal da lesão (cm) dos membros tratados e não tratados do G2, por avaliação ultrassonográfica – São Paulo - 2009	98
Tabela 20 -	Porcentagem (%) da área do tendão lesada nos membros tratados e não tratados do G2, por avaliação ultrassonográfica – São Paulo - 2009.....	99
Tabela 21 -	Área do tendão (cm ²) dos membros tratados e não tratados do G3, por avaliação ultrassonográfica – São Paulo - 2009.....	100
Tabela 22 -	Área da lesão (cm ²) dos membros tratados e não tratados do G3, por avaliação ultrassonográfica – São Paulo - 2009.....	101

Tabela 23 -	Porcentagem (%) da área do tendão lesada nos membros tratados e não tratados do G3, por avaliação ultrassonográfica – São Paulo - 2009	102
Tabela 24 -	Comprimento longitudinal da lesão (cm) dos membros tratados e não tratados do G3, por avaliação ultrassonográfica – São Paulo - 2009	103
Tabela 25 –	Escore do alinhamento longitudinal das fibras nos membros tratados e não tratados do G2, por avaliação ultrassonográfica – São Paulo – 2009	104
Tabela 26 –	Escore do alinhamento longitudinal das fibras nos membros tratados e não tratados do G3, por avaliação ultrassonográfica – São Paulo – 2009	107
Tabela 27 –	Medianas dos escores de expressão positiva do IGF-1 nas células dos tendões do G1, membros tratados e não tratados do G2, com seus respectivos números de análises efetuadas – São Paulo - 2009	111
Tabela 28 –	Medianas dos escores de expressão positiva do TGF- β 1 nas células dos tendões do G1, membros tratados e não tratados do G2, com seus respectivos números de análises efetuadas – São Paulo - 2009	113
Tabela 29 –	Medianas dos escores de expressão positiva do PCNA nas células dos tendões do G1, membros tratados e não tratados do G2, com seus respectivos números de análises efetuadas – São Paulo - 2009	115
Tabela 30 –	Medianas dos retardos ópticos (η m) dos tendões do G1, membros tratados e não tratados do G3, com seus respectivos números de análises efetuadas – São Paulo - 2009	118

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINE	Anti-inflamatório não esteroideal
bFGF	Fator de crescimento de fibroblasto básico
cm	Centímetro
cm ²	Centímetro quadrado
DAB	Diaminobenzidina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetra-Acético
F	Fêmea
FBAPN	Fumarato de beta-aminopropionitrila
FDS	Flexor digital superficial
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
GAGP	Glicosaminoglicanos polisulfatados
G1	Grupo 1
G2	Grupo 2
G3	Grupo 3
Hz	Hertz
IGF-1	Fator de crescimento similar à insulina tipo I
i.v.	Intravenoso
J	Joule
Kg	Quilograma
M	Macho
MHz	Megahertz
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimol
ms	Milisegundo
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro

nº	Número
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação nuclear
PCR-RT	Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
pH	Potencial hidrogeniônico
PSI	Puro Sangue Inglês
OR	Retardo óptico
SATA	Spatial Average Temporal Average
s	Segundo
USP	Universidade de São Paulo
UST	Ultrassom Terapêutico
TFDS	Tendão Flexor Digital Superficial
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
TGF- β 1	Fator de crescimento transformador beta 1
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
x	Vezes
w	Watts

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
β	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
γ	Gama
α	Alfa
$\div$	Divisão
$\otimes$	Marca registrada
$\geq$	Maior ou igual
$\leq$	Menor ou igual
μm	Micrômetros
$>$	Maior
$<$	Menor
λ	Lambda
nm	Nanômetros

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	26
2	REVISÃO DE LITERATURA	28
2.1	Tendão	28
2.1.1	Anatomia	28
2.1.2	Composição Bioquímica	29
2.1.3	Função	30
2.2	Tendinite	31
2.2.1	Fisiopatologia	32
2.2.2	Cicatrização	34
2.2.2.1	<i>Cicatrização pós-infiltração por collagenase</i>	36
2.3	Métodos de Avaliação	38
2.3.1	Avaliação Clínica	38
2.3.2	Avaliação Ultrassonográfica	39
2.3.3	Avaliação Imunoistoquímica	41
2.3.4	Avaliação da Birrefringência do Colágeno	44
2.4	Tratamentos	45
2.4.1	Tratamentos Clínicos	46
2.4.2	Tratamentos Cirúrgicos	49
2.4.3	Tratamentos Fisioterapêuticos	50
2.4.3.1	<i>Ultrassom terapêutico</i>	52
3	OBJETIVOS	56
3.1	Objetivo Geral	56
3.2	Objetivos Específicos	56
4	MATERIAL E MÉTODOS	57
4.1	Aspectos Éticos	57
4.2	Animais Experimentais	57
4.3	Métodos	59
4.3.1	Analgesia dos Animais	59
4.3.2	Infiltração por Collagenase	59
4.3.3	Protocolo Fisioterapêutico	61

4.3.3.1	<i>Grupos de tratamento</i>	63
4.3.3.2	<i>Programa de reabilitação</i>	63
4.3.4	Avaliação Física	63
4.3.4.1	<i>Critérios de avaliação física</i>	64
4.3.5	Avaliação Ultrassonográfica	65
4.3.5.1	<i>Esquema de avaliações</i>	66
4.3.5.2	<i>Critérios de avaliação ultrassonográfica</i>	66
4.3.6	Biópsia	68
4.3.7	Processamento das Amostras	69
4.3.8	Avaliação Imunoistoquímica	70
4.3.8.1	<i>Anticorpo IGF-1</i>	71
4.3.8.2	<i>Anticorpo TGF-β1</i>	71
4.3.8.3	<i>Anticorpo PCNA</i>	72
4.3.8.4	<i>Análise dos resultados</i>	73
4.3.9	Análise da Birrefringência do Colágeno	74
4.3.10	Análise Estatística	74
5	RESULTADOS	76
5.1	Analgesia dos Animais	76
5.2	Infiltração por Colagenase	76
5.3	Avaliação Clínica	76
5.4	Avaliação Ultrassonográfica	87
5.5	Biópsia	110
5.5.1	Avaliação Macroscópica	110
5.6	Avaliação Imunoistoquímica	110
5.6.1	Anticorpo IGF-1	111
5.6.2	Anticorpo TGF- β 1	113
5.6.3	Anticorpo PCNA	115
5.3.9	Análise da Birrefringência do Colágeno	117
6	DISCUSSÃO	120
6.1	Avaliação Clínica	120
6.2	Avaliação Ultrassonográfica	122
6.3	Biópsia	124
6.4	Avaliação Imunoistoquímica	124

6.5	Análise da Birrefringência do Colágeno	126
6.6	Tratamento por Ultrassom Terapêutico	127
7	CONCLUSÃO	130
	REFERÊNCIAS	131

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tendão

2.1.1 Anatomia

Os tendões são associados aos músculos e formam uma continuação da estrutura colágena que suporta as fibras musculares contráteis (GOODSHIP et al., 1994).

O corpo do músculo flexor digital superficial tem origem na porção proximal do epicôndilo medial do úmero; possui fortes inserções tendíneas e progressivamente continua como TFDS no membro torácico distal. Esse tendão também se origina do seu ligamento acessório, inserido na região caudomedial do rádio. O tendão fusionado, com formato arredondado passa distalmente por dentro do canal carpal. Seguindo pelo metacarpo, o TFDS fica achatado com um formato de meia lua e em seguida, posterior ao ligamento intersesamoideo, seu formato fica simétrico sofrendo um espessamento. Na região distal dos ossos sesamóides proximais, o TFDS fica progressivamente mais fino no plano sagital e mais espesso no plano abaxial. Na região distal da falange proximal, o ramo distal do TFDS separa-se e torna-se espesso distalmente, em cada lado da quartela. Eles terminam entre os ligamentos palmar axial e abaxial da articulação interfalangeana proximal (DENOIX, 1994b, 1996).

Essas alterações anatômicas ao longo do comprimento do TFDS do equino são acompanhadas por mudanças na composição da matriz extracelular. Foi sugerido que essas variações na estrutura do tecido sejam influenciadas por solicitações de áreas que recebem altas forças de tensão comparadas com regiões que suportam pressão (JONES; BEE, 1990).

2.1.2 Composição bioquímica

Os tendões são brancos e inextensíveis devido à sua riqueza em fibras colágenas; são formados por feixes paralelos de fibras colágenas entre as quais existe pequena quantidade de substância fundamental amorfa e de fibroblastos. Esses fibroblastos, ou tenócitos, têm núcleos alongados, paralelos às fibras, e citoplasma delgado com prolongamentos que tendem a envolver os feixes colágenos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

Dentro da população dos tenócitos, aparentemente, três tipos diferentes de células podem ser observados: células com núcleo achatado, em forma de charuto e denso; células localizadas em agrupamentos lineares, com núcleo arredondado e denso; e aquelas com natureza imatura, com núcleo menos denso e aberto. Essas células são responsáveis pela produção e manutenção da matriz extracelular circundante (GOODSHIP et al., 1994).

A matriz extracelular é composta por quatro tipos principais de macromoléculas: colágeno, elastina, proteoglicanos e glicoproteínas. O colágeno e a elastina formam o componente fibroso que fornece a força de tensão. A molécula de colágeno ou tropocolágeno é composta por três cadeias de polipeptídeos enroladas em uma super-hélice para o lado direito (GOODSHIP et al., 1994).

O colágeno predominante em um tendão normal adulto é do tipo I (95%) com uma porção pequena do tipo III e V, associados com a vasculatura intratendínea (GOODSHIP, 1993). Os tipos de colágeno II e IV também estão presentes nos tendões flexores normais, entretanto em menor quantidade e em locais específicos (DOWLING et al., 2000). As fibrilas colágeno tipo I são organizadas em fibras alinhadas ao eixo longitudinal do tendão (BIRCH et al., 1998).

As moléculas de colágeno são construídas em uma série de subunidades progressivamente mais largas que combinam e formam o tendão (GOODSHIP, 1993). Os feixes colágenos do tendão (feixes primários) formam conjuntos (feixes secundários) envolvidos por um tecido conjuntivo frouxo que contém vasos sanguíneos e nervos. O tendão é envolvido externamente por uma bainha de conjuntivo denso (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

As ligações cruzadas do colágeno, intra e interfibrilar, e as ligações cruzadas eletrostática supridas pelas proteínas não colagenosas têm sido estudadas por

contribuir para as propriedades biomecânicas do tendão (DOWLING et al., 2000).

Os proteoglicanos circundam as fibrilas de colágeno (SCOTT, 1986), acredita-se que pequenos proteoglicanos possuam um importante papel metabólico, como o sequestro de fatores de crescimento para a matriz (YAMAGUCHI et al., 1990).

2.1.3 Função

Os tendões são estruturas cilíndricas alongadas que ligam os músculos esqueléticos aos ossos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999), transferem ativamente a força biomecânica do músculo para o osso (SMITH; WEBBON, 1996) e atuam como coaptadores da articulação (DENOIX, 1994b, 1996). Entre as propriedades bioquímicas dos tendões estão: alta força de tensão, flexibilidade e elasticidade (GOODSHIP et al., 1994).

Os tendões possuem várias funções importantes durante a locomoção e para manter o animal parado. Como estruturas elásticas, eles possuem a função principal de absorver o impacto e a habilidade de armazenar e liberar energia, reduzindo o gasto de energia na locomoção, especialmente em altas velocidades (DENOIX, 1994b, 1996).

Os tendões flexores dos cavalos, não só flexionam o dígito durante a locomoção, assim como, flexionam o membro na fase de movimento da passada. Sob estresse, por exemplo, eles seguram a articulação do boleto quando o animal está parado (GOODSHIP, 1993).

As ações do TFDS estão correlacionadas com a contração ativa do corpo do músculo e a tensão passiva do seu ligamento acessório. Durante o suporte total do peso, a alta tensão no TFDS é responsável pela estabilização da articulação interfalangeana proximal. No início do movimento, a tensão e a elasticidade do aparato FDS contribui passivamente para iniciar a flexão das articulações: cárpica, metacarpofalangeana e interfalangeana proximal. Proeminentemente, os tendões flexores contribuem na limitação da inclinação palmar dos ossos, balanceando o estresse nos diferentes aspectos do terceiro osso metacarpiano e da falange proximal, prevenindo fraturas (DENOIX, 1994b, 1996).

No repouso ou durante a fase estática, o TFDS impede a flexão da articulação interfalangeana proximal. O TFDS associado ao ligamento reto sesamoideano impedem a hiperextensão dessa mesma articulação. Durante a fase estática ou de propulsão, o TFDS atua sobre a articulação interfalangeana proximal como um extensor, um papel oposto a sua função durante a fase de movimento. Os ramos distais do TFDS associados aos ligamentos colateral e palmar e, ramos do ligamento suspensor do boleto, contribuem para a estabilização do plano frontal da articulação interfalangeana proximal (DENOIX, 1994b, 1996).

A energia elástica armazenada nos tendões flexores sob estresse é utilizada no passo subsequente para reduzir a necessidade de energia e aumentar sua eficiência (ALEXANDER, 1988). Para maximizar a energia armazenada, os tendões alongam até o ponto perto do rompimento, o que pode contribuir para a alta incidência de lesões durante a atividade atlética (GOODSHIP et al., 1994).

Também a característica mecânica dos tendões sugere que eles possam agir como freios para proteger as fibras musculares durante movimentos súbitos e inesperados, como as contrações excêntricas (BARNETT et al., 1961).

2.2 Tendinite

Frequentemente, a lesão aguda do TFDS ocorre durante o treinamento, exercício ou corrida. O grau de dano nessas lesões varia do rompimento localizado das fibrilas até a ruptura completa do tendão. A ruptura total ou parcial do tendão está sempre associada com uma hemorragia considerável e inflamação, assim, a zona de lesão fica edemaciada com exsudato. Quando a inflamação cede, a cicatrização ocorre na zona de lesão e a formação da cicatriz pode se estender para os tecidos peritendíneos (WILLIAMS et al., 1984).

2.2.1 Fisiopatologia

O desenvolvimento de técnicas efetivas no manejo de lesões tendíneas está relacionado com o conhecimento dos princípios biológicos e biomecânicos, associados com o remodelamento e com o reparo (GOODSHIP; BIRCH, 1996).

Os fatores que causam a lesão do tendão não são bem compreendidos; porém, danos vasculares, fadiga, falta de condicionamento, conformação ruim, idade, doença sistêmica, microtraumas, forças biomecânicas incompatíveis com o esforço e problemas nutricionais são reconhecidos como fatores predisponentes à ruptura do tendão; entretanto a relação exata ainda não foi elucidada (WEBBON, 1973; KRAUS-HANSEN et al., 1992; GOODSHIP et al., 1994; GOODSHIP; BIRCH, 1996).

Uma possível explicação está relacionada com o aumento da temperatura no núcleo central no tendão durante o exercício de alta intensidade (GOODSHIP et al., 1994). Um estudo *in vivo* demonstrou que a região central do TFDS sofre um aumento de temperatura, em torno de 45°C, durante um galope de sete minutos; enquanto a temperatura na superfície do tendão é menor em 10°C (WILSON; GOODSHIP, 1994). Fato que sugere que o efeito térmico local resulta na morte celular ou no prejuízo do metabolismo dos tenócitos, no núcleo central dos tendões, utilizados no armazenamento da energia elástica (GOODSHIP et al., 1994).

Sabe-se que os radicais livres de oxigênio são tóxicos para os tecidos podendo levar dano local às células, assim comprometendo a manutenção da matriz. A carga cíclica nos tendões resulta em uma isquemia associada durante o período no qual o tendão está sob carga de tensão máxima. Quando relaxado, a reperfusão ocorre e os superóxidos podem ser formados (GOODSHIP et al., 1994).

A lesão também pode resultar de uma sobrecarga mecânica aguda e frequente durante um movimento descoordenado ou dano da lesão subclínica repetitiva. As fibras centrais alcançam um estresse maior que as fibras mais periféricas, para uma determinada carga, por isso serão as primeiras a romper (GOODSHIP et al., 1994).

Reduções no ângulo e comprimento da ondulação da fibrila do colágeno, em resposta a idade e ao exercício também têm sido demonstradas (WILMINK et al., 1992; PATTERSON-KANE et al., 1997, 1998).

Patterson-Kane et al. (1998) relataram que um estiramento rápido e de grau elevado sofrido pelo TFDS durante um regime de exercício uniforme ao galope, causa redução no ângulo de ondulação, na região central do tendão, assim como a redução no período de alongamento da ondulação em alguns cavalos. Essas diferenças não são vantajosas para as propriedades mecânicas dessa região, sendo assim, pode ser classificada como uma evidência de microtrauma que predispõe o tendão a sobrecarga e lesão.

A eliminação da ondulação da fibra de colágeno com a idade contribui, parcialmente, com o aumento da rigidez do tendão (DOWLING et al., 2000). Wilmink et al. (1992) descobriram que a ondulação na região central do TFDS estira menos que na área periférica em animais velhos, sugerindo que esta região do tendão é mais predisposta a romper. Logo, os cavalos mais velhos mostram alterações na mecânica da ondulação do TFDS que provavelmente predispõem a lesão no núcleo central do tendão (GOODSHIP et al., 1994).

Patterson-Kane et al. (1997) confirmaram em cavalos selvagens que a redução do ângulo das ondulações na região central do tendão é uma ocorrência normal relacionada com a idade, um mecanismo de fadiga ocorre em um amplo número de ciclos de carga durante o tempo de vida do cavalo.

O processo natural de envelhecimento resulta em mudança na composição da matriz dos tendões de equinos (BIRCH et al., 1999). Birch et al. (1999) em seu estudo descobriram que a região central do TFDS produz significativamente mais colágeno tipo III, do que a região periférica, o que pode contribuir para a fraqueza mecânica dessa região; e sustentaria as diferenças morfológicas das características de suas ondulações.

Gillis et al. (1997) descobriram que a área transversal dos fascículos do colágeno diminui a medida que os animais ficam mais velhos. Predominantemente, nos neonatos e nos estágios iniciais de reparo após a lesão, as fibrilas possuem o diâmetro pequeno (GOODSHIP, 1993). Mecanicamente as fibrilas pequenas são mais fracas que as largas (PARRY et al, 1978), por essa razão o tendão do neonato, dos animais idosos e após a lesão são fracos. Em ambos os casos, o tecido aumenta sua força com o tempo devido ao aumento do diâmetro da fibrila e número de ligações cruzadas estáveis. O aumento no diâmetro das fibrilas está associado com o aumento na força de tensão do tendão, assim como o aumento no número de ligações cruzadas não redutíveis (GOODSHIP; BIRCH, 1996; BIRCH et al., 1999).

Os fascículos também podem se esticar independentemente nos tendões normais, isto significa que quando os tendões são esticados algumas fibrilas vão esticar antes das outras. Consequentemente, quando um tendão é esticado até romper, algumas fibrilas rompem antes das outras, resultando na ruptura parcial como é visto em muitos casos de tendinites (GOODSHIP, 1993).

São referidas na literatura que as condições da superfície da raia, tal como a dureza ou rudeza, influenciam na incidência de lesões nos cavalos Puro Sangue Inglês (PSI), durante o treinamento e corrida (OIKAWA, 2000b). No Japão o membro torácico direito tende a ser acometido de 10 a 20% a mais que o esquerdo, mesmo que os cavalos sejam colocados tanto no sentido horário, como no anti-horário, durante o treinamento ou corrida (OIKAWA, 2000a). Submeter o cavalo a altas velocidades durante o treinamento pode estar associado ao maior risco de desenvolvimento da tendinite (OIKAWA; KASASHIMA, 2002).

A incidência de tendinite em potros machos é levemente mais alta que em fêmeas. As diferenças na incidência da tendinite entre machos e fêmeas podem ser explicadas pelo fato dos machos possuírem maior velocidade, necessidade de tempo maior para condicionamento e conformação, ou existir diferenças entre os sexos no metabolismo das fibras do tendão, ou na resposta dos mecanoreceptores ao exercício (YOSHIKAWA et al., 2001, 2002).

O peso pode ser um fator predisponente na incidência da tendinite. Potros machos acometidos pesam 17,8 kg, e as fêmeas 12 kg, a mais do que os cavalos não acometidos respectivamente (OIKAWA; KASASHIMA, 2002).

O casco longo e o talão baixo são fatores importantes que fazem o cavalo ser suscetível à tendinite (OIKAWA; KASASHIMA, 2002).

2.2.2 Cicatrização

A sequência de reparação do tendão ocorre em estágios diferentes, porém correlacionados: agressão, indução, inflamação, estágio fibroblástico (reparador) e maturação (remodelador) (BANKS, 1992).

Assim, após a agressão os vasos sanguíneos se rompem e inicia-se a cascata de coagulação com formação de coágulo ao redor da área lesada. O

coágulo contém células e plaquetas que vão imediatamente iniciar a liberação de várias moléculas, principalmente os fatores de crescimento levando a inflamação local aguda (FRANK et al., 1999; MOLLOY et al., 2003).

Segue a fase inflamatória (dois dias), com invasão de neutrófilos e macrófagos que atuam por fagocitose nos debris necróticos. A fase inflamatória está associada ao aumento do fluxo sanguíneo e ruptura vascular, com consequente extravasamento de sangue, plasma e fluidos teciduais. Algumas enzimas degenerativas são ativadas e liberadas no processo inflamatório, aumentando a extensão da lesão. Esta fase também está associada com a presença de dor, aumento de volume e claudicação (ENWEMEKA et al., 1990).

A sequência é a fase proliferativa (do segundo ao quarto dia), com nova invasão de células extrínsecas (polimorfonucleares) e intrínsecas (células do endotendão e epitendão); é nesta fase que ocorre formação de citocinas. Do quarto ao 14º dia ocorre a fase reparadora, quando são observadas deposição de colágeno, formação do tecido de granulação, neovascularização, migração de fibroblastos extrínsecos e proliferação de fibroblasto intrínseco. Os fibroblastos são responsáveis por sintetizar uma nova matriz extracelular, consistindo principalmente de colágeno e glicosaminoglicanos. Já no sétimo dia, o local da lesão se torna mais organizado. Finalmente inicia a fase remodeladora, quando ocorre a redução de células e vasos do tecido cicatrizado; há aumento na quantidade e densidade de colágeno tipo I, promovendo a sua reorganização, orientado e entrelaçado com a matriz sadia (MAST, 1997; MOLLOY et al., 2003).

A deposição de colágeno aumenta progressivamente, atingindo seu pico por volta do 14º dia após a formação da lesão (ENWEMEKA; SPIELHOLZ, 1992). No novo tecido cicatricial, o colágeno inicialmente é imaturo e organizado em uma arquitetura casual, composto predominantemente do colágeno tipo III com fibrilas de pequeno diâmetro. O processo de maturação então ocorre gradativamente, no qual o diâmetro da fibrila aumenta, assim como o número de ligações cruzadas quimicamente estáveis, junto com uma proporção de colágeno tipo I (GOODSHIP et al., 1994). Subsequentemente, ao prosseguir com a maturação, as fibrilas são organizadas em um alinhamento longitudinal (NIMNI; HARKNESS, 1988).

A ligação cruzada inicial do colágeno é essencial para a estabilização da síntese do novo colágeno. Essas ligações cruzadas são denominadas redutíveis porque são solúveis e facilmente desnaturadas pelo calor. Com a maturação do

colágeno, as ligações redutíveis são convertidas em ligações cruzadas estáveis que fornecem a força de tensão e outras características mecânicas próprias do tecido de reparo maduro (YAMAUCHI; MECHANIC, 1988).

2.2.2.1 Cicatrização pós-infiltração por collagenase

A infiltração de collagenase no centro do tendão resulta na rápida dissolução das fibras, necrose celular, dano vascular, hemorragia, inflamação, o que mimetiza muitos aspectos da ocorrência natural da lesão traumática (WILLIAMS et al., 1984). A cicatriz ocorre após o processo inicial inflamatório e, remoção do tecido danificado pelas células fagocitárias do corpo (GOODSHIP, 1993).

As enzimas bacterianas agem diretamente na tripla hélice da molécula do colágeno, para liberar o tropocolageno afetado e, rapidamente causam a solubilização do colágeno (WILLIAMS et al., 1984; DOWLING et al., 2000). Também as proteases presentes na preparação da collagenase atacam a matriz não colagenosa e as células. O resultado é o tecido danificado e inflamação; a aparência macroscópica e histológica da lesão é muito parecida com a lesão seguida de trauma natural (WILLIAMS et al., 1984).

Após 24 horas da infiltração com collagenase, a matriz está quase completamente dissolvida; resultando na dissolução ou fragmentação parcial das fibras de colágeno, cercadas de filetes de fibrinas e espaços compostos de exsudato. Eritrócitos e leucócitos polimorfonucleares estão presentes nas áreas danificadas em grande quantidade (WILLIAMS et al., 1984).

Uma semana após a indução da lesão ocorre a organização do exsudato. São observadas áreas de hemorragia com fibrina coagulada e fibrilas de colágeno danificadas, intercalando com áreas de tecido de granulação. Um grande número de macrófagos fagocitam debris celulares, fibrinas e hemácias. Leucócitos, polimorfonucleares, estão presentes associados a vasos sanguíneos pequenos neoformados no tecido de granulação. Fibroblastos alongados invadem a zona lesada e secretam matriz de tecido conjuntivo frouxo. Esta nova matriz formada de tecido conjuntivo é orientada aleatoriamente (WILLIAMS et al., 1984).

Macroscopicamente a lesão no tendão com uma a duas semanas parece uma massa gelatinosa com sangue coagulado, fibrina e matriz extracelular danificada. Microscopicamente é uma massa amorfa com tecido acelular. Os tenócitos se apresentam arredondados (DAHLGREN et al., 2005).

Quatro semanas após a indução da lesão, não há área de necrose, lise de fibrila ou inflamação aguda. Zonas necróticas são substituídas completamente por tecido conjuntivo celular. Histologicamente o novo tecido formado é densamente composto por fibroblastos alongados e células mononucleares dispersas. Frequentemente são evidenciadas mitoses e pequenos capilares neoformados. Aparentemente o tecido conjuntivo alongado é disposto em uma orientação casual sem consistência (WILLIAMS et al., 1984).

De quatro a 24 semanas, as lesões são preenchidas por uma cicatriz pálida e fibrosa que fica firme e organizada com o tempo (DAHLGREN et al., 2005).

Seis semanas pós-lesão os principais achados histológicos consistem na proliferação de celular, infiltrado inflamatório e neoformação de vasos (MACHADO et al., 2000). Os achados histológicos da lesão caracterizam-se por aumento da vascularização e atividade fibroblástica, demonstrando organização tecidual compatível com a fase proliferativa da tendinite (FERNANDES et al., 2003).

De oito a 24 semanas os tenócitos ficam com o formato típico de charuto (DAHLGREN et al., 2005). Oito semanas após a lesão com colágeno, o tendão ainda demonstra um padrão de reparo desorganizado, entretanto a deposição de matriz intercelular é mais proeminente. Porém, o arranjo casual das celulares e fibras ainda não apresenta semelhança à estrutura bem organizada do tendão normal. Vasos sanguíneos estão mais largos, incluindo vênulas e arteríolas diferenciadas (WILLIAMS et al., 1984).

Com 20 semanas, o tendão continua mole e gelatinoso. O tecido cicatricial é caracterizado por hipercelularidade e intensa vascularização com os fibroblastos contendo um núcleo redondo a levemente alongado, parcialmente organizado entre as fibras de colágeno. O endotendão é hipercelular com abundante vascularização menos organizada e mais espessa que o endotendão normal. O arranjo paralelo e longitudinal das fibras é parcial (MARXEN et al., 2003).

Com 24 semanas, o tecido cicatricial fica mais organizado preenchido com fibras de colágeno e fibroblastos dispostos em linhas de tensão. As lesões permanecem com hipercelularidade, com diminuição da densidade do colágeno

quando comparado com o tendão normal. O endotendão apresenta concentrações lineares de fibroblastos cubóides e em forma de charuto, entre largas expansões da matriz eosinofílica. O endotendão fica interconectado a uma rede vascular neoformada no centro das lesões do tendão e na área circundante (DAHLGREN et al., 2005).

As características do tendão normal são observadas com a redução gradual do tamanho do fibroblasto e um aumento do alinhamento das fibras do tecido conjuntivo. A ondulação do tendão normal não se restabelece dentro do período de 14 meses (WILLIAMS et al., 1984).

2.3 Métodos de Avaliação

O sucesso no manejo das lesões de tecidos moles dos equinos depende da avaliação precisa do grau da lesão. Um histórico completo, exame físico minucioso e varias técnicas de imagem podem ser selecionadas para fornecer essa informação (STASHAK, 1996).

Atualmente a ultrassonografia é o método de imagem mais popular para os tecidos moles dos cavalos. Outros métodos, que contribuem significativamente para a avaliação da lesão nos tecidos moles são: termografia, cintilografia, tomografia e ressonância magnética (TURNER, 1996).

2.3.1 Avaliação Clínica

A avaliação clínica, utilizando procedimentos convencionais, continua como uma parte essencial no diagnóstico e prognóstico da claudicação, apesar do considerável aperfeiçoamento alcançado nos procedimentos diagnósticos disponíveis, para a identificação das lesões no tendão (DENOIX, 1994a).

O exame físico deve incluir uma avaliação inicial do local da lesão, seguida do exame do paciente (STASHAK, 1996). Tipicamente o cavalo, com tendinite de

flexor, apresenta sinais locais de edema, distensão, espessamento e calor associados à claudicação (STASHAK, 2002).

A inspeção é um passo essencial para identificar lesões do aparato locomotor. O objetivo desse procedimento é identificar a deformação na anatomia superficial dos membros dos cavalos. Geralmente, as lesões no tendão produzem distensão focal e edema difuso (DENOIX, 1994a).

Procedimentos manuais auxiliam na investigação precisa da natureza da deformação. A palpação e a pressão são úteis para estabelecer a presença de características físicas modificadas, em volta ou no tendão, assim como calor, dor e aderências. A dor originada de lesão no tendão pode ser avaliada com a aplicação da pressão digital. A resposta à dor pode ser evidenciada pela tração ou compressão da estrutura acometida. A presença de calor pode indicar um processo inflamatório associado à lesão aguda ou subaguda, ou com uma lesão crônica recorrente. O acúmulo de líquido é indicativo de uma distensão em uma estrutura sinovial, hematoma ou abscesso (DENOIX, 1994a).

Após o exame passivo, o cavalo deve ser observado em movimento para detectar as anormalidades no andamento (HAWKINS; TURNER, 1996). Esse exame é fundamental para análise para todo problema do sistema locomotor. O cavalo deve ser examinado ao passo, em linha reta e em círculos. Depois deve ser colocado ao trote, em linha reta, em superfície dura e macia (DENOIX, 1994a).

2.3.2 Avaliação Ultrassonográfica

A ultrassonografia é um método seguro, não-invasivo, de baixo custo e realizado com o cavalo em estação (RANTANEM, 1982; DENOIX, 1994a; DOWLING et al., 2000).

Não há correlação da severidade da inflamação e da dor, com a extensão das lesões nas estruturas intratendíneas, por esta razão, o tratamento e o prognóstico da tendinite são fundamentados racionalmente na avaliação ultrassonográfica (HENNINGER, 1994). Quando o local de dor e a disfunção são identificados, além da investigação clínica, o objetivo desta avaliação é determinar as estruturas

anatômicas responsáveis pelo problema ou compreendidas nele e, a natureza exata do processo patológico envolvido no caso clínico (DENOIX, 1994a).

Foi descrita uma íntima relação entre a ultrassonografia e os achados histológicos na tendinite e durante toda a cicatrização (REEF et al., 1989; CRASS et al., 1992; MARR et al., 1993b). A base do diagnóstico é determinar a variação morfológica com relação à estrutura normal (RANTANEN et al., 2003) e a gravidade da lesão é definida pela combinação da extensão da lesão, tamanho da área do tendão e da lesão, em corte transversal, ecogenicidade da lesão e padrão de alinhamento das fibras no corte longitudinal (REEF, 1998).

As lesões nos tendões induzem a modificações na sua ecogenicidade (DENOIX, 1994a), que se refere ao brilho ou clareza de uma estrutura (RANTANEN et al., 2003). As lesões variam sua ecogenicidade de acordo com a consistência morfológica no momento do exame (RANTANEN et al., 2003).

A avaliação do alinhamento do feixe da fibra nas imagens longitudinais determina a natureza do alinhamento da fibra do tendão. Normalmente as fibras estão alinhadas paralelamente, entretanto quando a lesão ocorre, o padrão paralelo das fibras é interrompido e durante a cicatrização da lesão fica com uma orientação aleatória (RANTANEN et al., 2003).

No exame ultrassonográfico, a ecogenicidade normal e alinhamento das fibras indicam estruturas normais ou completamente recuperadas (GENOVESE et al., 1986). Ultrassonograficamente, o tendão normal é muito ecogênico nos planos sagital e longitudinal (CRASS et al., 1992). A área do tendão sadio, avaliada ao corte transversal, possui entre 0,60 cm² e 1,20 cm² (GENOVESE et al., 1986; GILLIS et al., 1993).

Segundo Crass et al. (1992), o ultrassom reflete precisamente as anormalidades nas lesões agudas de equinos. As tendinopatias geralmente são acompanhadas pelo aumento de tamanho da estrutura (DENOIX, 1994a, b). A perda da intensidade normal da ecogenicidade pode ser causada por uma ruptura fibrilar ou processos inflamatórios (hemorragia, edema, infiltração celular) nos estágios iniciais (GENOVESE et al., 1986; MARR et al., 1993a; DENOIX, 1994a). Geralmente o edema é observado ao redor da estrutura lesada como uma área hipoecoica periférica, nas lesões recentes (DENOIX, 1994a).

Na fase inflamatória, o tendão ainda está aumentado e sua ecogenicidade diminuída, quando comparado ao tendão sadio (CRASS et al., 1992). Essas

imagens representam hemorragia, exsudato inflamatório, fibrólise, e tecido de granulação inicial (PALMER et al., 1994; STASHAK, 2002).

Na fase proliferativa, as fibrilas residuais são representadas por áreas lineares mais claras, separadas por zonas livres de eco, que representam focos de infiltração celular. Na fase remodeladora, as zonas com início de fibrogênese apresentam-se ecogênicas (CRASS et al., 1992). Durante o processo de cicatrização, a fibroplasia e o não alinhamento das fibrilas também reduzem a ecogenicidade do tendão (DENOIX, 1994a).

Quanto mais crônica a lesão, a imagem fica mais ecóica; a ecotextura tende a heterogeneidade e, no corte longitudinal costumam apresentar fibras irregulares e desalinhas (MARR et al., 1993a; REEF, 1998). Imagens hiperecoicas podem ser causadas por tecido fibroso ou calcificação (DENOIX, 1994b).

O tendão tende a diminuir aproximando-se do tamanho normal. Esse fato, associado ao retorno do padrão paralelo das fibras significa um prognóstico mais favorável (RANTANEN, 1996). Quanto mais paralelo for o alinhamento do remodelamento da cicatriz, menor espaço é necessário, resultando na redução da área do tendão no corte transversal (RANTANEN et al., 2003).

O uso do ultrassom diagnóstico também permite que o programa de reabilitação do paciente seja prescrito de acordo com a cicatrização do tendão, quando evidenciado pela direta visualização da sua arquitetura (GILLIS, 1997). A diminuição da área transversal do tendão durante a reabilitação indica resolução do componente inflamatório da cicatrização, ou pode indicar um remodelamento satisfatório da cicatrização (RANTANEN et al., 2003).

2.3.3 Avaliação Imunoistoquímica

A imunoistoquímica é amplamente aceita e bem documentada como um método de caracterização dos padrões da expressão da proteína, enquanto preserva a arquitetura celular e do tecido (TAYLOR, 2006).

Os fatores de crescimento são moléculas de peptídeos sinalizadores com diversos papéis biológicos, representando um sistema de mensageiros na cicatrização da ferida de todos os tecidos (ZAPF et al., 1984; MURPHY; NIXON,

1997]). Especialmente durante a fase aguda, os fatores de crescimento organizam e coordenam a proliferação, migração e diferenciação celular (MURPHY; NIXON, 1997); ainda a produção da matriz extracelular (ZAPF et al., 1984).

Cada fator de crescimento possui um padrão de expressão temporal distinto e um único papel no reparo do tendão (YEUNG et al., 2004). Muitos fatores de crescimento são essenciais para o desenvolvimento e homeostase do tendão; porém, o fator de crescimento similar à insulina tipo I (IGF-1) e o fator de crescimento transformador beta (TGF- β) possuem um papel importante no reparo. Atualmente, os efeitos desses dois hormônios de crescimento estão sendo examinados no metabolismo do tendão do equino (DOWLING et al., 2000).

O IGF-1 e o TGF- β estão ativamente envolvidos na cicatrização do tendão (YEUNG et al., 2004). Ambos IGF-1 e TGF- β são constantemente produzidos por fibroblastos do tendão e, são conhecidos por alcançar o reparo do tendão *in vitro*, aumentando a proliferação e a síntese de colágeno e proteoglicanos (ABRAHAMSSON et al., 1991; DOWLING et al., 2000).

O IGF-1 age como um mensageiro para o estímulo do crescimento em vários tecidos *in vivo* e *in vitro* (ZAPF et al., 1984). É um mediador importante em todas as fases de cicatrização da ferida, particularmente nas fases inflamatória e proliferativa (SCIORE et al., 1998). Tem demonstrado uma alta expressão durante a fase inicial da inflamação em inúmeros modelos de cicatrização de tendão de animais (MOLLOY et al., 2003).

Como a expressão do IGF-1 está relacionada com a proliferação e migração dos fibroblastos, subsequentemente, relaciona-se ao aumento da produção de colágeno associado com acúmulo de glicosaminoglicanos (MOLLOY et al., 2003; SCOTT et al., 2007).

Em explantes de tendão de equino, o IGF-1 demonstrou efeitos positivos na síntese de colágeno, proliferação celular, produção do colágeno tipo I (MURPHY; NIXON, 1997) e estímulo da produção de matriz (DAHLGREN et al., 2001).

A expressão do IGF-1 aumenta no tendão em resposta a vibração do trauma, da carga mecânica e da lesão no tecido (DAHLGREN et al., 2001). O aumento da imunocoloração reflete o desenvolvimento da morfologia alterada do tendão (SCOTT et al., 2007).

Sciori et al. (1998) demonstraram que o nível do mRNA do IGF-1 é cinco vezes maior, três semanas após a lesão e que diminui com seis a 14 semanas. E

Dowling et al. (2000) demonstraram que o nível de proteína (PCR-RT) do IGF-1 diminui do início até duas semanas após a lesão, quando aumenta até um platô entre quatro e oito semanas.

Outro fator de crescimento importante envolvido na inflamação e reparo do tecido é o TGF- β , liberado principalmente da degranulação das plaquetas e macrófagos (LEUNG et al., 2006). A hipóxia tem sido demonstrada como um regulador na síntese do TGF- β 1 de fibroblastos na pele (FALANGA et al., 1991).

O TGF- β é essencial por sua habilidade de estimular a migração quimiotática de fibroblastos (POSTLETHWAITE et al., 1987) e macrófagos (WAHL et al., 1987), regulação na migração e proliferação celular e interações da ligação de fibronectina (MOLLOY et al., 2003).

A suplementação de TGF- β nos explantes de tenócitos de equinos *in vitro* resulta no estímulo da produção da proteína oligomérica da matriz da cartilagem e replicação celular (SMITH et al., 1998, 1999).

A expressão do TGF- β no tecido normal é restrita a níveis muito baixos (DOWLING et al., 2000), mas está ativa durante a inflamação (MOLLOY et al., 2003). A expressão do mRNA do TGF β -1 tem demonstrado estar extremamente aumentado em um período muito curto, após a lesão no tendão (MOLLOY et al., 2003). Os níveis da proteína do TGF- β iniciam seu aumento após uma semana e tem o pico em quatro semanas, após a lesão (DOWLING et al., 2000). Ngo et al. (2001) observaram pico no 14º dia após a lesão e, a diminuição no 56º dia.

Entre uma e oito semanas, o nível de proteína é significativamente elevado, quando comparado com tendões normais (DOWLING et al., 2000). Foi observado que com 24 semanas após a lesão, a expressão da proteína permanece elevada em fibroblastos maduros (DOWLING et al., 2000).

O IGF-1 e o TGF- β retornam para seus valores basais assim que os tecidos começam o remodelamento (DOWLING et al., 2000).

Determinadas situações podem alterar a expressão dos fatores de crescimento, por exemplo, a exposição ao ultrassom terapêutico pode aumentar a secreção de TGF- β por osteoclastos (LI et al., 2003) e por tenócitos (WEN et al., 2006).

O Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA) estabelece interações com proteínas necessárias para o controle do ciclo celular (XIONG et al., 1992), sendo essencial para a replicação e reparo do DNA (PROSPERI, 1997). O RNA

mensageiro do PCNA está presente em todas as fases do ciclo celular, com o crescimento exponencial celular e duas a três vezes aumentado durante a fase S - segunda fase da interfase no ciclo celular, quando ocorre a síntese do DNA (MORRIS; MATHEUS, 1989). Postula-se que a expressão do PCNA está associada com a proliferação celular no tendão (WEN et al., 2002).

2.3.4 Avaliação da Birrefringência do Colágeno

Embora relativamente simples, a microscopia de polarização traz informações valiosas sobre a ultra-estrutura e a organização molecular de células e tecidos. Este tipo de microscopia óptica permite tanto a pesquisa como a determinação das anisotropias ópticas em preparados biológicos (VIDAL, 1987b).

A birrefringência é a anisotropia que está relacionada à diferença de índices de refração do objeto, que corresponde à propagação de luz com velocidades diferentes, em direções diferentes, no corpo birrefringente. Um corpo birrefringente possui duas direções de propagação, com um índice de refração para cada uma delas (VIDAL, 1987b).

Alguns estudos têm utilizado a microscopia de luz polarizada para qualificar e quantificar a organização e agregação das fibras de colágeno, por meio do retardo óptico (OR) produzido pela birrefringência (VIDAL; CARVALHO, 1990; CUNHA et al., 2001; SANTOS, 2004; KOEKE et al., 2005).

A variação do estado de organização é detectado e mensurado nos feixes de colágeno durante o processo de reparo, por meio da sua propriedade anisotrópica, a birrefringência (VIDAL et al., 1975; VIDAL; CARVALHO, 1990). Esta propriedade é considerada a melhor forma de estudar a ordem molecular e o grau da agregação ordenada nos feixes colágenos (VIDAL, 1986).

A constituição básica do microscópio de luz polarizada é essencialmente os filtros polarizadores: o polarizador e o analisador. Sob o condensador do microscópio está posicionado o polarizador, com possibilidade para ser situado ou afastado do trajeto da luz. Já o analisador está localizado abaixo das oculares e sobre as objetivas; deste modo, o plano de polarização do analisador se encontra perpendicular à direção de vibração da luz polarizada (VIDAL, 1987a).

Os materiais birrefringentes colocados entre polarizadores cruzados provocam um brilho característico. O brilho exibido pelo objeto birrefringente é devido à diferença de caminho óptico, ou retardo óptico, isto é a diferença entre a direção do raio ordinário e a direção do raio extraordinário. O corpo birrefringente colocado entre polarizadores deverá exibir um máximo de brilho, quando um dos seus eixos de propagação é colocado a 45° dos dois polarizadores. Mas quando as direções são paralelas aos polarizadores, desaparecem as imagens birrefringentes, escurecendo o objeto. Girar a platina do microscópio determinando os ângulos de extinção e desaparecimento de birrefringência é um método para determinar a orientação de elementos anisotrópicos em uma estrutura (VIDAL, 1987b).

Um compensador basicamente tem condições de anular a birrefringência de um espécime colocado em posição de subtração, com respeito aos seus eixos γ e α . Ao fazê-lo, o compensador determina um ângulo cujos valores finais em γ são expressos em nanômetros. As medidas de γ só podem ser efetuadas de forma acurada com os compensadores especiais (VIDAL, 1987b).

2.4 Tratamentos

O tratamento da tendinite induzida por exercício é extremamente frustrante, porque independente do tratamento, o reparo do tendão em cavalos é prolongado e, a composição, estrutura, função do tecido recente reparado, pode não se igualar ao tendão normal não lesado (POOL, 1992; GOODSHIP, 1993).

Não existe um método uniforme com sucesso para o tratamento de tendinite e, conseqüentemente, uma variedade enorme de tratamentos é utilizada para alcançar um bom resultado e aumentar a taxa e a qualidade de reparo, após uma lesão aguda (HENNINGER, 1994). Muitos dos métodos de tratamento para lesões de tendão possuem uma base empírica, mas nenhum ainda proporcionou uma cura eficiente. Esta vasta variedade de tratamentos preconizados para esses casos, mesmo no passado ou no presente, indica que nenhuma abordagem provou completa eficiência (GOODSHIP, 1993; GOODSHIP et al., 1994).

Muitos procedimentos clínicos são recomendados no tratamento de tendinites em equinos, como a administração de anti-inflamatórios não-esteróides e esteróides;

uso de glicosaminoglicanos polissulfatados; ácido hialurônico; fumarato de beta-aminopropionitrilo; aplicação tópica de dimetilsufóxido; terapia com choques extracorpóreos; terapia intralesional com fatores de crescimento [TGF- β , IGF-1, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF)], além da aplicação intralesional de células-tronco (MOLLOY et al., 2003; BARREIRA, 2005).

Também técnicas cirúrgicas são indicadas em situações específicas, como “splitting” tendíneo, drenagem de hematomas, desmotomia do ligamento acessório e do ligamento anular, para aumentar a extensão da unidade músculo-tendão e, implantes de fibras sintéticas.

2.4.1 Tratamentos Clínicos

Os objetivos da terapia da tendinite aguda são: diminuir a inflamação, minimizar a formação da cicatriz, promover a restauração da estrutura e função normais do tendão (GOODSHIP et al., 1994; HENNINGER, 1994).

Apesar da resposta inflamatória ser uma parte importante no processo de reparo, tentativas de reduzir sua magnitude diminuí os efeitos deletérios da inflamação nas fibras de colágeno e na matriz circundante (HENNINGER, 1994).

É comum a administração de anti-inflamatórios tanto esteroidal como não esteroidal, para reduzir o edema, associado ao processo inflamatório na fase inicial do reparo. Infelizmente, esses agentes podem suprimir a atividade fibroblástica e reduzir a taxa de síntese de colágeno (GOODSHIP et al., 1994).

A administração sistêmica da medicação não esteroidal (AINE) ajuda a combater a formação de prostaglandinas e tromboxanas nos tecido lesados. Segundo Henninger (1994) a fenilbutazona é o anti-inflamatório mais popular na terapia inicial e parece não interferir no processo de reparo, também o flunixin meglumine, o cetoprofeno e o meloxicam podem ser utilizados.

Várias medicações tópicas são aplicadas nos tendões durante a fase inicial da tendinite. O dimetilsulfóxido (DMSO) possui benefícios potenciais no tratamento para a lesão aguda de tendão. As propriedades anti-inflamatórias do DMSO na grande maioria resultam da sua habilidade varredora de radicais livres, que são

produzidos por células inflamatórias e tecidos isquêmicos e, podem causar danos às estruturas adjacentes não lesadas (ALBRECHTSEN; HARVEY, 1982; BRAYTON, 1986).

Os corticosteróides são as drogas anti-inflamatórias mais potentes disponíveis e utilizadas, na apresentação tópica, como de uso sistêmico, para diminuir a inflamação, edema e a formação de aderências. Apesar dessas propriedades referidas, alguns estudos demonstraram que os esteróides são prejudiciais no reparo do tendão. Os corticóides inibem a fibroplasia, assim como a síntese do colágeno e glicosaminoglicanos; ambos são importantes no processo de reparo (BLACK, 1985). O uso intralesional do corticosteróide de depósito demonstrou efeitos deletérios no processo de reparo; incluindo: necrose, aumento da lesão já existente, aceleração ou potencialização do processo distrófico de calcificação e retardo na formação do tecido conjuntivo fibroso (POOL et al., 1980).

O uso do hialuronato de sódio intralesional ou peritendíneo, no tratamento da lesão aguda de tendão, tem produzido resultados conflitantes (DOWLING et al., 2000). O hialuronato tem demonstrado possuir um efeito benéfico na proliferação, migração e diferenciação das células, durante o reparo, associados à prevenção de aderências (BERTOLAMI; DONOFF, 1978; HENNINGER, 1994). Spurlock et al. (1989) não observaram diferenças na avaliação clínica, mas observaram melhor ecogenicidade, na avaliação ultrassonográfica dos tendões, dos animais tratados, com hialuronato de sódio peritendíneo. Por outro lado, estudos experimentais em equinos com o hialuronato de sódio intralesional não demonstraram efeito benéfico significativo na diminuição da recorrência da tendinite do flexor superficial do equino, quando comparado com casos não tratados (DYSON, 1997).

Também os glicosaminoglicanos polisulfatados (GAGPs) têm sido utilizados no tratamento da tendinite. Acredita-se que as GAGPs inibem a ativação do macrófago, da collagenase e da atividade da metaloproteinase, propriedades úteis nas fases agudas da tendinite (SMITH, 1992). Além disso, a GAGP inibe a síntese de prostaglandina E₂ (FREAN; LEES, 2000), a atividade da cascata de complemento (RASHMIR-RAVEN et al., 1992), o influxo de leucócitos para o local da inflamação e a produção de radicais livres super-óxidos e interleucina-1. Ainda existe um efeito dose-dependente no metabolismo dos fibroblastos e tenócitos, resultando no aumento da produção de proteínas colágenas e não-colágenas (TROTTER, 1996). As GAGPs têm demonstrado inibir enzimas lisossomais e encurtar o processo

inflamatório (YOVICH et al., 1987), porém sua eficiência clínica necessita ser provada (HENNINGER, 1994). A avaliação dos efeitos benéficos da GAGP na tendinite é baseada na clínica subjetiva e medidas ultrassonográficas, sem a prova conclusiva da melhora significativa do prognóstico sobre outros tratamentos (DOWLING et al., 2000). Marr et al. (1993a) não observaram efeitos benéficos quando se utilizou GAGP intramuscular e intralesional no tratamento das tendinites agudas em equinos; confirmados pelos achados de Marxen et al. (2003, 2004) apenas nos tratamentos intralesionais.

O fumarato de beta-aminopropionitrila (FBAPN) é um latirógeno que se liga irreversivelmente a lisil-oxidase, a qual alternadamente inibe a ligação cruzada covalente das proteínas, elastina e colágeno dos tecidos conjuntivos (NIMNI; HARKNESS, 1988; ALVES et al., 2001b). O FBAPN é efetivo em reduzir a produção das fibrilas de colágeno com padrão de rede imatura não desenvolvida, o qual ocorre durante um estagio inicial da recuperação do tendão. Ele também promove a organização das fibrilas de colágeno em uma direção vertical, se administrado em conjunto com reabilitação adequada (GILLIS, 1996). Um estudo clínico em cavalos com tendinite indicou, que a injeção intralesional do FBAPN resultou em melhora mais rápida na imagem ultrassonográfica do tendão lesado, do que outros métodos de terapia (GENOVESE, 1992). O FBAPN associado à atividade física controlada possui ação benéfica na fase tardia do processo de reparação (ALVES et al., 2001a, b). Walther (1996) declarou que esta medicação não acelera o curso do processo de reparo, mas que melhora a qualidade da cicatrização.

A descoberta que a expressão e a atividade dos fatores de crescimento se alteram durante a resposta à lesão e, ao processo de cicatrização, permitiu que vários pesquisadores explorassem seu uso exógeno para alcançar a cicatrização normal ou deficiente (FRANK et al., 1999). A terapia exógena utilizando fator de crescimento tem sido proposta como meio de alcançar aumento da proliferação celular na lesão do tendão e, finalmente a qualidade do reparo (ABRAHAMSSON et al., 1991; MURPHY; NIXON, 1997). Estudos dos efeitos da aplicação exógena de TGF β , IGF-1, PDGF e bFGF, no local da ferida, isolados ou em conjunto são promissores (MOLLOY et al., 2003). Novos estudos são necessários para avaliação dos fatores de crescimento e sua expressão endógena, durante a cicatrização, ou novos procedimentos para modificar o ambiente do fator de crescimento endógeno (FRANK et al., 1999).

Diversos cientistas procuram descobrir o real poder das células-tronco na cura ou degeneração de órgãos e tecidos (OLIVEIRA, 2008). Barreira (2005) e Oliveira (2008) observaram que a terapia celular tendínea melhorou a organização tecidual e acelerou o processo de cicatrização. Investigações do método, dose, tempo e técnicas de aplicação, da abordagem, da terapia por genes, tanto na regulação superior ou inferior da produção de células, em vários intervalos da cicatrização parece ser promissora (FRANK et al., 1999).

2.4.2 Tratamentos Cirúrgicos

O “splitting” do tendão foi introduzido por Asheim e Knudson (1967) como tratamento de rotina para as lesões primárias no tendão. Este método, durante as fases iniciais da tendinite pode diminuir o tamanho das lesões no centro e promover uma neovascularização mais rápida e, subsequente reparo das áreas lesadas do tendão. Porém, seus efeitos nas propriedades mecânicas da maturação do tecido colagenoso reparado necessitam ser determinados (HENNINGER, 1994).

Bramlage (1986) propôs que a transecção do ligamento acessório proximal permite que o corpo do músculo flexor digital superficial, assuma uma maior porção da carga e crie uma unidade musculotendínea mais extensível, a qual serviria para proteger o TFDS reparado. A desmotomia do ligamento acessório superior aumenta as chances dos cavalos de retornar ao seu nível de competição anterior e diminui a incidência de recorrência comparada com outros métodos de terapia.

Ainda são utilizados a “ponta-de-fogo” ou o termocautério terapêutico (PALMER et al., 1994). O objetivo principal da contra-irritação é transformar uma condição crônica em aguda, por indução da inflamação nos tecidos. Acredita-se que ela promova o aumento do suprimento sanguíneo e o influxo de células inflamatórias para o local da lesão, favorecendo o processo de cicatrização. Porém, pode afetar desfavoravelmente as propriedades viscoelásticas vitais do tendão (HENNINGER, 1994), prolongar a cicatrização e resultar em uma lesão maior no tendão (SILVER et al., 1983). Não se deve utilizar a contra-irritação no tratamento de tendinites, especialmente se a função atlética é o objetivo do tratamento (HENNINGER, 1994).

2.4.3 Tratamentos Fisioterapêuticos

A aplicação do estímulo físico inclui regimes específicos de exercício e o uso da fisioterapia, particularmente no estágio inicial, para prover baixos níveis de carga e proporcionar a dispersão dos fluidos (GOODSHIP et al., 1994). Dentre eles destacam-se a terapia com laser de baixa intensidade e o UST, associados ou não a programas de exercício controlado.

A terapia com laser de baixa intensidade tem sido utilizada no tratamento de várias enfermidades dos tecidos moles e esqueléticos em cavalos. Um feixe de luz coerente penetra nos tecidos e diretamente, estimula o metabolismo celular e libera substâncias farmacologicamente ativas de diferentes células, que indiretamente acelera as fases inflamatória e de reparo no processo de cicatrização (PORTER, 1992). Os efeitos benéficos propostos incluem: a aceleração da atividade da célula fagocítica, a proliferação fibroblástica e a produção de colágeno (GATNER, 1987).

Toda extensão dos efeitos terapêuticos do laser de baixa intensidade não são completamente conhecidos, mas acredita-se que inclui a aceleração da síntese de proteína, o aumento do fluxo sanguíneo, a promoção de regeneração linfática e alívio da dor. Estudos clínicos e experimentais devem ser realizados para melhor avaliação dessa terapia, possibilitando o desenvolvimento e a aplicabilidade do laser como modulador de reparação (PORTER, 1992). Permanecem ainda várias dúvidas em relação aos seus efeitos, Machado et al. (2000) demonstraram que o laser de arsenito de gálio não interfere no processo de reparação do TFDS dos equinos. Entretanto, Mikail (2008) evidenciou que o laser de arsenito de gálio na dose de 20J/cm² foi efetivo na aceleração do reparo da lesão em TFDS.

Programas de exercício controlado foram desenvolvidos para reabilitação das lesões de TFDS do cavalo (GILLIS, 1996, 1997). O objetivo básico da reabilitação por exercício é inicialmente encorajar a resolução da inflamação e manter a função de deslizamento do tendão durante o repouso e a caminhada. O aumento gradual da carga de trabalho estimula o tendão a continuar o processo de cicatrização, já que o tendão está fraco após a lesão e, ganha força após muitos meses (GILLIS, 1997).

O passo e o exercício leve auxiliam na promoção do fluxo sanguíneo e o linfático para região distal do membro (HENNINGER, 1994). O arranjo casual inicial

das fibras de colágeno é modificado quando a carga funcional é restabelecida (GOODSHIP et al., 1994); o aumento gradual no estresse do tendão promove maturação e alongamento longitudinal das fibras do colágeno (HENNINGER, 1994).

O repouso é contra-indicado, com exceção no período muito inicial, após a lesão; o exercício controlado deve ser introduzido de uma maneira progressiva, desde o estágio inicial (GOODSHIP et al., 1994), durante a fase de reparo, uma vez que a inflamação cedeu (DOWLING et al., 2000).

Goodship et al. (1994) defenderam o conceito do exercício controlado, começando com a caminhada na guia por períodos curtos, para iniciar o tratamento, do que o repouso completo em baia. O exercício controlado requer tempo, esforço e dinheiro, porém se utilizado em conjunto com a interpretação acurada de exames clínicos e ultrassonográficos regulares, proporciona a melhor oportunidade para a resolução com sucesso da lesão do tendão (GILLIS, 1997). É importante que o aumento do exercício seja gradual para que não ocorra lesão por fadiga ou sobrecarga do tendão em cicatrização (GILLIS, 1997), já que o exercício em excesso pode produzir efeitos danosos ao tendão (SMITH; WEBBON, 1996).

O ultrassom terapêutico tem sido utilizado por muitos anos no tratamento de uma ampla variedade de lesões do tecido mole em pessoas e, em menor escala em animais (PARTRIDGE, 1987). Apesar de existir um suporte clínico consistente para a eficácia dessa modalidade de tratamento, poucos estudos experimentais têm demonstrado sua eficácia. Os efeitos biológicos das ondas de ultrassom nos tecidos não foram completamente elucidados (HENNINGER, 1994).

2.4.3.1 Ultrassom terapêutico

O UST é uma técnica sem dor e não invasiva, que em cavalos, tem seu uso indicado no tratamento de tendinites, desmites, lesões articulares, lacerações, redução de tecido cicatricial, edema, exostose, fraturas ósseas e miosites (STEISS, 2000).

O ultrassom terapêutico é uma forma de energia acústica comumente utilizada no tratamento de lesões musculoesqueléticas. Durante a década de 30, o ultrassom de baixa intensidade foi empregado pela primeira vez no tratamento de lesões de tecidos moles (PORTER, 1998). O primeiro uso registrado do ultrassom terapêutico foi em 1938, quando foi utilizado para tratamento de inflamação no nervo ciático (PORTER, 1991a).

As ondas do ultrassom são ondas de pressão de energia mecânica que se movimentam em linha reta, quando saem da fonte (PORTER, 1991a; 1998). O transdutor converte energia elétrica em energia cinética, na forma de ondas de som antes do contato com o corpo (PORTER, 1998).

A quantidade de energia que alcança uma área específica está relacionada com algumas características do ultrassom (frequência, intensidade, amplitude, foco e uniformidade do feixe) e dos tecidos pelo qual vai atravessar (SPEED, 2001).

Os aparelhos oferecem uma frequência com alcance de 1 a 3MHz nos modos contínuo e pulsado. As ondas de som se dissipam no meio até que a energia seja absorvida. A absorção das ondas aumenta proporcionalmente com a frequência. As altas frequências, 3MHz, emitem energia aos tecidos com 1 a 2cm de profundidade. Tratamentos de baixa frequência, 1MHz, podem emitir energia aos tecidos com 5cm de profundidade ou mais. Com frequências mais altas, o tecido superficial absorve toda a energia e as estruturas mais profundas não são atingidas. Logo, a frequência a qual o UST é aplicado vai determinar a profundidade de penetração da energia do ultrassom (PORTER, 1998).

A decisão sobre qual forma de onda utilizar depende principalmente dos objetivos da intervenção terapêutica. O terapeuta deve escolher entre uma forma de onda contínua ou pulsada. O ciclo de trabalho ("duty cycle") refere-se à fração de tempo que o feixe de ultrassom é emitido durante o período de um pulso (STEISS, 2000). De acordo com Cunha et al. (2001), o UST no modo pulsado é capaz de

produzir efeitos terapêuticos, entretanto o UST no modo contínuo parece provocar uma forte pressão acústica, capaz de produzir uma pressão local e danificar a formação das fibras colágenas, em áreas de lesão do tecido.

A intensidade refere-se a taxa de energia emitida por unidade de área; é expressa em watts por cm^2 (PORTER, 1998). Relatos sobre o ultrassom indicam que doses menores são mais efetivas que doses maiores (PORTER, 1991c). Ao longo dos anos, existe uma tendência de reduzir as intensidades médias utilizadas, reduzindo a energia vinda do aparelho ou utilizando os regimes pulsados (HAAR, 1999).

Os locais de tratamento devem ser divididos em áreas de 5cm^2 e, que devem ser irradiadas por 5 minutos; áreas menores devem receber apenas 2-3 minutos de irradiação (PORTER, 1991c). Para alcançar uma distribuição uniforme da energia, o movimento do transdutor deve ser devagar e constante, são recomendadas as velocidades de 4cm/s (MICHLOVITZ, 1990) a 10cm/s (HAYES, 1993). Os tratamentos devem ser diários, entretanto aqueles com intervalos de um ou dois dias, são efetivos, dependendo do tipo e da extensão da lesão (PORTER, 1991c).

Geralmente, a técnica mais utilizada para aplicar o ultrassom é a de contato (PORTER, 1991c). O transdutor deve ser mantido em contato com a pele (PORTER, 1991c) e movimentado em círculos sobrepostos, durante todo o tratamento (PORTER, 1998). Manter o transdutor parado sobre o tecido é prejudicial, pois este é submetido à energia emitida e à energia refletida. É importante manter em movimento o transdutor com movimentos lentos e calmos para prevenir esses danos e tratar uniformemente a área (PORTER, 1998).

Para minimizar o reflexo do feixe de ultrassom nas interfaces ar-tecido, um meio de acoplamento deve ser aplicado entre a cabeça do transdutor e a pele, por exemplo, um gel neutro solúvel em água (STEISS, 2000).

O uso principal do UST tem sido no tratamento de lesões de tecidos moles, mas também é aplicado em ossos e articulações e para acelerar a cicatrização de feridas (HAAR, 1999). Com o aumento da evidência da capacidade do ultrassom para tecidos moles, os pesquisadores tentam explorar a base do mecanismo desse tratamento (LEUNG et al., 2006). Foi demonstrado, tanto em experimentos de laboratório, como clínicos, que o ultrassom pode estimular o reparo do tecido e a cicatrização da ferida, se corretamente aplicado (DYSON et al., 1968; YOUNG; DYSON, 1990c).

Aparentemente, a fase inflamatória do reparo do tecido pode ser acelerada quando ocorre a exposição concomitante ao ultrassom (YOUNG; DYSON, 1990a, c HAAR, 1999), pois há interação com um ou mais componentes da inflamação. Durante a fase proliferativa, o ultrassom tem demonstrado aumentar a síntese de colágeno por fibroblastos. Já na fase de remodelamento, existe uma evidência que o tecido cicatricial tratado com ultrassom pode ser mais forte e mais elástico que o tecido de cicatrização comum (HAAR, 1999).

Alguns estudos *in vitro* confirmam essas afirmações. O ultrassom pode contribuir potencialmente para a fibrinólise terapêutica, acelerando a dissolução de coágulo, diminuindo a concentração do ativador requerida ou diminuindo a resistência a fibrinólise (FRANCIS et al., 1992). Também o UST estimula os fibroblastos, derivados de macrófagos, liberar substâncias mitogênicas e sintetizá-las (YOUNG; DYSON, 1990b); ainda aumenta o recrutamento de fibroblastos (YOUNG; DYSON, 1990a), acelera a angiogênese (YOUNG; DYSON, 1990c), aumenta a síntese de matriz, deixa as fibrilas de colágeno mais densas (FRIEDAR, 1988) e aumenta a força de tensão do tecido (BYL et al., 1993). O UST estimula a síntese de proteína óssea (REHER et al., 1997), assim como a proliferação de células da cartilagem (WILTINK et al., 1995). O ultrassom causa alteração nas células endoteliais levando ao aumento da adesão dos leucócitos (MAXWELL et al., 1994).

Alguns estudos têm demonstrado o aumento na força de tensão, absorção de energia e melhora no alinhamento das fibrilas do colágeno após utilização do UST (ENWEMEKA, 1989; ENWEMEKA et al., 1990). Koeke et al. (2005) demonstraram melhora na organização do colágeno e aceleração do processo de reparo do tendão tenotomizados, tratados com UST. O tratamento com ultrassom aumenta a taxa de síntese do colágeno no local da lesão e aumenta a força contra o rompimento (JACKSON et al., 1991). Também Harvey et al. (1975) relataram o aumento da síntese de proteína por fibroblastos. Além disso, o ultrassom pode acelerar a cicatrização do ligamento e aumentar a expressão do TGF- β (LEUNG et al., 2006). Um estudo relatou o aumento da proliferação celular em culturas de fibroblastos quando irradiadas por ultrassom terapêutico (WEN et al., 2005). Dyson et al. (1968) sugeriram que o ultrassom pode interferir na formação da ligação química associada com polimerização do colágeno. Também sugeriram que o ultrassom terapêutico estimula a atividade dos fibroblastos.

Os efeitos mecânicos terapêuticos são mais prováveis devido à cavitação estável em combinação com fluxo acústico do fluido extracelular, resultando em mudanças na permeabilidade da membrana celular de células adjacentes (MORTIMER; DYSON, 1988). Esta mudança de permeabilidade pode refletir da ativação de canais de íons ativados por extensão na membrana celular devido a perturbação da membrana (SACHS, 1988). O que pode resultar em uma mudança na permeabilidade do íon do Ca^{2+} , levando ao influxo desse para dentro da célula e, subsequente aumento da concentração de cálcio intracelular (MORTIMER; DYSON, 1988; WILTINK et al., 1995).

O efeito da pressão mecânica na membrana celular pode ativar um tipo de receptor de extensão do canal do cátion (SACHS, 1991). Além disso, a força mecânica transmitida pelo ultrassom pode afetar o metabolismo celular e a expressão gênica (WANG et al., 1993). Foi descoberto que os tenócitos convertem o estímulo biofísico em uma resposta bioquímica levando a liberação de fatores de crescimento e adaptação celular (SKUTEK et al., 2001).

Alguns trabalhos não demonstraram efeitos benéficos (ROBERTS et al., 1982; TURNER et al., 1989; ROBINSON; BUONO, 1995). Baker et al. (2001) acreditam que os efeitos do UST são improváveis de serem benéficos. Contudo, os resultados contraditórios relatados nos vários estudos podem ser facilmente explicados pela diferença no tempo e duração do tratamento, assim como as diferenças nos parâmetros utilizados na onda sonora (HENNINGER, 1994).

A terapia por ultrassom parece ter um potencial para acelerar a cicatrização de lesões de tecidos moles, mas muitas dúvidas permanecem com relação aos parâmetros de tratamento que podem ser mais benéficos (HENNINGER, 1994).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar o efeito do ultrassom terapêutico no processo de cicatrização do tendão flexor digital superficial em equinos.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a resposta ao tratamento da tendinite induzida pelos exames físico e ultrassonográfico.
- ✓ Caracterizar e padronizar a distribuição dos fatores de crescimento IGF-1 e TGF- β 1, e do antígeno PCNA em tendões normais de equinos.
- ✓ Caracterizar e padronizar na fase inicial da cicatrização a distribuição dos fatores de crescimento IGF-1 e TGF- β 1, e do antígeno PCNA, após o estímulo por UST.
- ✓ Padronizar os valores de birrefringência do colágeno para tendões normais de cavalo PSI.
- ✓ Analisar o estado de agregação e orientação da fibra do colágeno pela propriedade anisotrópica do colágeno, após o tratamento da tendinite por UST.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida no Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP) no período de fevereiro de 2007 a abril de 2009.

4.1 Aspectos Éticos

O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Bioética da FMVZ-USP (protocolo nº 957/2006), seguindo os padrões nacionais e internacionais de cuidados e experimentação em animais.

4.2 Animais Experimentais

Foram selecionados 20 animais (seis cadáveres frescos e 14 animais vivos) da espécie equina da raça Puro Sangue Inglês, com idade entre dois e nove anos. Desses cavalos, 11 eram machos e nove, fêmeas. Seis dos animais vivos foram mantidos em piquete e oito, em baias com exercícios controlados. Todos receberam água à vontade e alimentação balanceada, composta por feno de “coast-cross” e ração comercial.

Os 20 animais foram divididos em três grupos distintos (Quadro 1):

O primeiro grupo (G1) foi composto por oito animais, denominado grupo controle, composto de seis cadáveres frescos e dois cavalos vivos. Esse grupo não foi submetido à indução da tendinite ou exposto ao UST, porém foi avaliado por imunoistoquímica e birrefringência do colágeno.

O segundo grupo (G2) foi constituído por seis animais vivos submetidos à indução da tendinite, ao tratamento por UST e avaliação imunoistoquímica.

O terceiro grupo (G3) foi constituído por seis animais vivos submetidos à indução da tendinite, ao tratamento por UST e avaliação da birrefringência do colágeno.

Todos os animais vivos foram examinados clinicamente; seus membros torácicos assim como os dos cadáveres frescos foram avaliados por ultrassom diagnóstico com a finalidade de exclusão de tendinite prévia.

Animais	Grupo	Raça	Sexo	Idade	Peso	Altura da lesão	Membro tratado
1	G1	PSI	M	4	cadáver	—	—
2	G1	PSI	M	2,5	cadáver	—	—
3	G1	PSI	M	5	cadáver	—	—
4	G1	PSI	M	3	cadáver	—	—
5	G1	PSI	M	4	cadáver	—	—
6	G1	PSI	M	4	cadáver	—	—
7	G1	PSI	F	4	428	—	—
8	G1	PSI	M	6	450	—	—
9	G2	PSI	M	3,5	490	14	torácico direito
10	G2	PSI	F	8	486	14	torácico direito
11	G2	PSI	F	6	436	14	torácico direito
12	G2	PSI	M	2	462	12	torácico esquerdo
13	G2	PSI	M	3	500	14	torácico esquerdo
14	G2	PSI	F	4	406	14	torácico esquerdo
15	G3	PSI	F	6	403	14	torácico esquerdo
16	G3	PSI	F	8	455	12	torácico direito
17	G3	PSI	F	5	458	12	torácico direito
18	G3	PSI	F	6	345	16	torácico direito
19	G3	PSI	M	5	445	14	torácico esquerdo
20	G3	PSI	F	9	415	12	torácico esquerdo

Quadro 1 - Descrição dos animais segundo grupo, raça, sexo, idade (anos), peso (kg), altura da lesão (cm) e o membro que recebeu tratamento – São Paulo – 2009

4.3 Métodos

4.3.1 Analgesia dos Animais

A sedação dos animais foi realizada com xilazina¹ a 10% (0,05 mg/kg) por via intravenosa (i.v.).

A infiltração local foi feita com agulha hipodérmica 0,45mm x 13 mm com cloridrato de lidocaína² a 2% (1,5 ml), sem vasoconstritor.

4.3.2 Infiltração por Colagenase

O primeiro dia do experimento para cada animal foi denominado como A0 (dia 0 anterior ao tratamento).

A lesão foi induzida com a administração intratendínea de colagenase³ tipo I no tendão flexor digital superficial, dos membros torácicos direito e esquerdo dos animais do G2 e G3.

A indução da lesão foi realizada segundo procedimento descrito por Barreira (2005). Os animais foram sedados com xilazina 10% (i.v.), seguida de anestesia por infiltração local com cloridrato de lidocaína a 2%, sem vasoconstritor, em ambos os membros torácicos, no ponto exato da infiltração por colagenase.

A região palmar do osso metacarpiano foi tricotomizada e preparada cirurgicamente com solução de clorexidine degermante 2% e alcóolica 0,5%. Posteriormente, o tendão flexor digital superficial foi identificado, mediante palpação das estruturas tendíneas; seguindo-se a infiltração de 1ml da solução de colagenase (2,5mg/ml) no centro do terço médio do tendão, utilizando agulha hipodérmica 0,8mm x 30mm, descartável, posicionada lateralmente e perpendicular ao tendão.

¹ Sedazine® - Fort Dodge

² Xylestesin 2%® - Cristália

³ Collagenase Type I – Sigma Aldrich – C0130

Para certificação do posicionamento correto da agulha, todo o procedimento foi guiado pelo exame ultrassonográfico (Figuras 1A, B e C).

Figura 1 – Procedimento da indução da lesão tendínea nos membros torácicos: (A) solução de collagenase tipo I – 2,5mg/ml; (B) administração intratendínea de collagenase guiada por ultrassom; (C) imagem ultrassonográfica do posicionamento da agulha (seta branca) no centro do tendão flexor digital superficial

4.3.3 Protocolo Fisioterapêutico

O tratamento fisioterapêutico teve início, nos membros torácicos dos animais do G2 e G3, com pelo menos 25% de lesão tendínea ao exame ultrassonográfico em corte transversal. Este momento foi denominado T1 (1º dia do tratamento) e consistiu do seguinte protocolo:

Ultrassom terapêutico em modo pulsado, 100 Hz, ciclo de trabalho de 1:4 (2ms ligado e 8ms desligado, 20%), área efetiva de radiação de 3cm², com frequência de 1MHz e intensidade 0,5W/cm² (SATA – “spatial average temporal average”), com duração de cinco minutos por sessão (Figuras 2A e B).

Figura 2 - (A) Aparelho Avatar 1 – KLD Biosistemas Equipamentos Eletrônicos. (B) Aplicação do ultrassom terapêutico no membro torácico

4.3.3.1 Grupos de tratamento

G2 - aleatoriamente foram tratados com UST, os membros torácicos direitos de três cavalos e os membros torácicos esquerdos dos três animais restantes. Os membros contralaterais dos seis animais desse grupo não foram expostos ao UST. As sessões foram diárias do 1º ao 10º dia (T1 ao T10), prosseguindo com três sessões semanais até o 15º dia (T15).

G3 – os procedimentos realizados foram semelhantes aos do G2, do 1º ao 10º dia (T1 ao T10), porém, seguidos de três sessões semanais até o 60º dia (T60).

4.3.3.2 Programa de reabilitação

Somente os animais do G3 foram submetidos ao programa de reabilitação. Três animais escolhidos aleatoriamente ficaram soltos em piquetes. Os três animais restantes desse grupo foram confinados em baias durante todo o experimento; eram conduzidos diariamente ao exercício controlado após confirmação da lesão tendínea, do 20º ao 60º dia de tratamento (T20 ao T60).

O protocolo seguido por esses animais foi o seguinte: do 20º ao 30º dia (T20 ao T30), foram conduzidos na guia, uma vez ao dia para caminhar 5 minutos ao passo; do 31º ao 45º dia (T31 ao T45), o tempo de caminhada foi de 10 minutos diários; do 46º ao 60º dia (T46 ao T60), durante 15 minutos. Este protocolo foi baseado no programa de exercício controlado descrito por Palmer et al. (1994).

4.3.4 Avaliação Física

O exame físico dos animais do G2 e G3 foi realizado diariamente desde a indução da lesão por collagenase, até o 10º dia após o início do tratamento (T10). Prosseguindo em dias alternados até o 15º dia (T15) no G2 e o 30º dia (T30) no G3;

seguido, semanalmente até o 60º dia de tratamento (T60) no G3. A avaliação física constou de: inspeção, palpação e dinâmica do animal. Para fins de análise, foram utilizados os dias A0, A11, T1 e T15 para o G2; e os dias A0, A11, T1, T15, T30 e T60 para o G3.

4.3.4.1 Critérios de avaliação física

a) Na inspeção foram avaliados: aumento de volume da área acometida (presente ou ausente) e postura antálgica do animal em estação (presente ou ausente). Para acompanhar com maior precisão o aumento de volume dos membros torácicos foi utilizada uma fita-métrica em centímetros para aferir a circunferência dos mesmos. Essa medida foi realizada a cada dois centímetros, por toda a extensão do osso terceiro metacarpiano, considerando o ponto zero, a região palmar do osso carpoulnar (Figuras 3A e B).

Figura 3 - (A) Régua para auxiliar a aferição do perímetro. (B) Aferição do perímetro da circunferência dos membros torácicos com o auxílio de fita métrica

b) Na palpação foram avaliados: aumento de temperatura (presente ou ausente) e de sensibilidade (presente ou ausente) no local da lesão.

c) Para analisar a dinâmica do animal foi estipulada uma escala de 0 a 5 de claudicação, segundo Stashak (2002). O grau de claudicação foi avaliado observando o passo e o trote dos animais em linha reta, sobre uma superfície plana. O grau 0 corresponde aos equinos com claudicação não perceptível sob qualquer circunstância; o grau 1, refere-se à claudicação pouco perceptível; o grau 2, engloba a claudicação pouco consistente; o grau 3 identifica a claudicação observada consistentemente ao trote, sob todas as circunstâncias; o grau 4, refere-se à claudicação óbvia, balançar da cabeça, levantar ou encurtar o passo; e o grau 5 significa claudicação óbvia, com mínima sustentação do peso na locomoção ou repouso e inabilidade para movimentar.

Também foram incluídas ao exame físico, a avaliação das seguintes variáveis: frequência cardíaca e respiratória; temperatura corporal; tempo de preenchimento capilar; coloração das mucosas; motilidade intestinal; presença de apetite; micção; defecação e dor.

4.3.5 Avaliação Ultrassonográfica

Os exames foram realizados com o ultrassom diagnóstico⁴, associado ao transdutor eletrônico linear multifrequencial⁵. Todos os exames ultrassonográficos foram realizados com o auxílio de um “standoff”, instrumento que se acopla ao transdutor do ultrassom, para diminuir as interferências entre a pele e a transdutor, permitindo uma melhor qualidade da imagem. Precedeu-se ao exame, a tricotomia da região palmar dos membros torácicos e foi usado um gel neutro como meio de contato.

⁴ ALOKA SSD-900

⁵ ALOKA UST-5710-7,5MHz

4.3.5.1 Esquema de avaliações

G1 – Precedendo às biópsias, foram realizadas avaliações ultrassonográficas dos membros dos seis cadáveres e dos dois animais vivos, para determinar os aspectos ecóicos da constituição tendínea normal.

G2 - Os exames ultrassonográficos desse grupo tiveram a seguinte sequência: antes da indução da lesão por collagenase (A0); a cada 48 horas, até a identificação de pelo menos 25% de lesão tendínea; e no 1º, 5º, 10º e 15º dia de tratamento (T1, T5, T10 e T15) pelo UST.

G3 – procedimentos semelhantes ao G2, exceto após o 10º dia de tratamento (T10), quando os exames ultrassonográficos foram realizados semanalmente até o 60º dia de tratamento (T60).

Para fins de avaliação foram utilizados os valores de A0, A10, T1 e T15 para o G2 e os dias A0, A10, T1, T20, T40 e T60 para o G3.

4.3.5.2 Critérios de avaliação ultrassonográfica

As avaliações dos tendões dos animais estudados e suas lesões tendíneas foram realizadas por toda sua extensão aos planos transversal e longitudinal. Avaliou-se:

- Ecogenicidade do tendão e da lesão tendínea (graduação de 0 a 3). O sistema de escore utilizado para ecogenicidade está descrito a seguir (Quadro 2) (RANTANEN; GENOVESE, 2003):

Escore	Ecogenicidade
0	Isoecoico
1	Levemente hipoeicoico; maior parte ecoico
2	Ecogenicidade mista (50% ecoico e 50% anecoico)
3	Maior parte anecoica ou anecoico

Quadro 2 – Escore correspondente a ecogenicidade do tecido na avaliação ultrassonográfica. (RANTANEN; GENOVESE, 2003)

- Área transversal do tendão e da lesão tendínea em cm²;
- Percentual de área lesada no interior de cada tendão (área transversal da lesão tendínea ÷ área transversal do tendão);
- Comprimento longitudinal da lesão em cm;
- Alinhamento de fibras (graduação de 0 a 3). O sistema de escore utilizado para o alinhamento de fibras está descrito a seguir (Quadro 3) (RANTANEN; GENOVESE, 2003):

Escore	Alinhamento
0	≥ 75% paralelo
1	50% a 75% paralelo
2	25% a 50% paralelo
3	≤25% paralelo

Quadro 3 – Escore correspondente ao alinhamento longitudinal das fibras de colágeno do tendão na avaliação ultrassonográfica (RANTANEN; GENOVESE, 2003)

Também foram realizados exames ultrassonográficos antes das biópsias tendíneas, com a finalidade de avaliar e determinar o local da lesão.

Todas as imagens obtidas foram congeladas e impressas por um aparelho térmico⁶, para posterior comparação entre as diferentes fases e grupos de animais do experimento.

4.3.6 Biópsia

Foram colhidas amostras de tecido tendíneo lesado dos animais do G2 e G3, das áreas previamente confirmadas pelo exame ultrassonográfico, com o auxílio de agulha (16gauge x 20cm de comprimento) e instrumento automático de biópsia⁷ (Figuras 4A e B). Também foram colhidas biópsias de tendões normais das regiões equivalentes do G1. Esse procedimento foi realizado no 15º dia após o início do tratamento (T15) no G2, objetivando a avaliação imunoistoquímica deste tecido; e no 60º dia após o início do tratamento (T60) no G3, objetivando a análise da birrefringência intrínseca do colágeno.

A região palmar do osso metacarpiano, em ambos os membros torácicos, foi tricotomizada e preparada cirurgicamente com solução de clorexidine degermante a 2%, seguida de clorexidine alcoólica a 0,5%. Os animais foram sedados com xilazina a 10% (i.v.), seguida de anestesia por infiltração local com cloridrato de lidocaína a 2%, sem vasoconstritor, no local onde posteriormente ocorreu a incisão. Com o membro apoiado no solo, foi realizada uma incisão na pele de aproximadamente 0,5cm, com o auxílio de uma lâmina de bisturi nº 11. Imediatamente, o membro torácico foi erguido por um auxiliar e a agulha posicionada sobre o tendão, na área previamente visualizada como lesada, pelo ultrassom diagnóstico. Posicionou-se o TFDS do animal entre o polegar e o dedo indicador, seguida pelo disparo do instrumento automático de biópsia, angulada a 20°. A sutura de pele foi realizada com o fio mononylon 2.0 com ponto simples interrompido. Após o término do procedimento, foi prescrito para os animais anti-inflamatório não-esteroidal. A indicação dessa medicação teve por finalidade promover ação analgésica e redutora

⁶ SONY UP 701 (895MD)

⁷ Pro-Mag™ Ultra

de edema. A substância ativa utilizada foi fenilbutazona⁸, na dose de 4,4mg/kg, uma vez ao dia, por três dias consecutivos.

Figura 4 - (A) Aparelho Pro-Mag TM Ultra e agulha. (B) Biópsia do TFDS (animal 14 – G2)

4.3.7 Processamento das Amostras

As amostras de tecido tendíneo foram fixadas em solução tamponada de formol a 4%, para avaliação imunoistoquímica e, em solução de formol a 10% para análise de birrefringência, por 24 horas.

⁸ Fenilvet® - Vansil

Em temperatura ambiente, o material foi desidratado em uma série crescente de etanol: um banho de imersão a 70%, “overnight”; dois, de etanol a 95%, por 90 minutos; seguidos de cinco banhos com álcool absoluto por duas horas cada. Em seguida, as amostras foram diafanizadas em xilol, em três séries de 90 minutos cada. Após a diafanização, as amostras foram imersas em dois banhos de parafina, sendo o primeiro com duração de duas horas e o segundo com duração de quatro horas e incluídas em Histosec®⁹.

Foram realizados cortes de 5µm de espessura nas amostras colhidas e colocados sobre lâminas com adesivo¹⁰.

4.3.8 Avaliação Imunoistoquímica

As técnicas de imunoistoquímica foram utilizadas para investigar a distribuição dos fatores de crescimento IGF-1, TGF-β1 e do antígeno PCNA, na fase de reparação tendínea.

Os fragmentos foram processados no Laboratório de imunoistoquímica do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista - Campus Botucatu.

As lâminas permaneceram na estufa entre 50° a 60°C, por 24 horas. A seguir foram desparafinizadas em dois banhos de xilol, de 30 minutos cada, seguidos de reidratação em uma série crescente de etanol: três banhos em etanol absoluto por três minutos cada, etanol a 95% e etanol a 85%, por três minutos cada. Posteriormente, as lâminas passaram por 10 lavagens em água destilada.

⁹ Merk

¹⁰ Starfrost - Knittel

4.3.8.1 Anticorpo IGF-1¹¹

Realizou-se a recuperação antigênica com o uso do calor, em banho-maria a 94°C, por 20 minutos, na solução de EDTA (pH 8,0). Seguiu-se do resfriamento das lâminas em temperatura ambiente, por 20 minutos e lavagem com água destilada. As lâminas foram bloqueadas com solução de peróxido de hidrogênio a 8% em metanol por 20 minutos, em temperatura ambiente; prosseguiu-se com 10 lavagens com água destilada e duas, com tris(hidroximetil)aminometano (TRIS - pH 7,4), por cinco minutos, cada.

O anticorpo primário IGF-1 na diluição 1:50 (Diluyente de anticorpo primário com redutor de fundo¹²) foi distribuído sobre as lâminas e essas foram incubadas por duas horas, em câmara úmida, na estufa a 37°C. Após a incubação as lâminas foram lavadas com solução de TRIS. O anticorpo secundário utilizado foi o EnVision¹³ e as lâminas encubadas por uma hora em temperatura ambiente. Após a lavagem com TRIS o material foi encubado com cromógeno diaminobenzidina (DAB¹⁴), por cinco minutos e novamente lavadas com TRIS. A contra-coloração foi realizada com hematoxilina, por três minutos e finalmente o material foi lavado em água corrente por 10 minutos.

4.3.8.2 Anticorpo TGF- β 1¹⁵

Também foi realizada a recuperação antigênica com o uso do calor, em banho-maria a 94°C, por 20 minutos na solução de EDTA (pH 8,0). Seguiu-se do resfriamento das lâminas, em temperatura ambiente, por 20 minutos e lavagem com água destilada. As lâminas foram bloqueadas com solução de peróxido de hidrogênio a 8%, em metanol, por 20 minutos, em temperatura ambiente; seguiu-se de 10 lavagens com água destilada e duas, com TRIS (pH 7,4) por cinco minutos. O

¹¹ Novozymes GroPep, Austrália, PABCa, policlonal de coelho

¹² Dako, Dinamarca, S3022

¹³ Dako, Dinamarca, K 5361

¹⁴ Dako, Dinamarca, K 3468

¹⁵ Novocastra, NCL, monoclonal de camundongo

material foi encubado com leite desnatado a 3% por uma hora para redução das reações de fundo. Após a incubação as lâminas foram lavadas com solução de TRIS.

O anticorpo primário TGF- β 1, na diluição 1:200, foi distribuído sobre as lâminas e essas foram incubadas em câmara úmida a 4°C, por 18 horas. Após a incubação as lâminas foram lavadas com solução de TRIS. O anticorpo secundário biotinilado utilizado foi o LSAB¹⁶; o material foi incubado à temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, foi novamente incubado com estreptavidina-peroxidase à temperatura ambiente por 30 minutos. Após a lavagem com TRIS, o material foi encubado com cromógeno DAB por cinco minutos e novamente lavado com TRIS. A contra-coloração foi realizada com hematoxilina de Meyer por três minutos e finalmente o material foi lavado em água corrente, por 10 minutos.

4.3.8.3 Anticorpo PCNA¹⁷

Foi realizada a recuperação antigênica com o uso do calor, três banhos em solução de citrato 10mM (pH 6,0), no microondas, em potência máxima, por cinco minutos cada. Seguiu-se do resfriamento das lâminas em temperatura ambiente, por 20 minutos e lavagem com água destilada. Todos os procedimentos seguintes foram realizados em temperatura ambiente (27°C). As lâminas foram bloqueadas com solução de peróxido de hidrogênio a 8%, em metanol, por 20 minutos; seguiu-se de 10 lavagens com água destilada e duas, com TRIS (pH 7,4), por cinco minutos. O material foi encubado em câmara úmida com leite desnatado a 3%, por 40 minutos, para redução das reações de fundo. Novamente as lâminas foram lavadas com solução de TRIS.

O anticorpo primário PCNA, na diluição 1:50, foi distribuído sobre as lâminas e essas foram incubadas por duas horas. Após a incubação as lâminas foram lavadas com solução de TRIS. O anticorpo secundário utilizado foi o EnVision e as lâminas foram encubadas por uma hora. Após a lavagem com TRIS o material foi encubado com cromógeno DAB, por cinco minutos e novamente lavado com TRIS. A

¹⁶ Dako, Dinamarca, K 0679, anti-coelho, anti-cabra e anti-camundongo

¹⁷ Dako, Dinamarca, Clone PC10, M 0879, monoclonal de camundongo

contra-coloração foi realizada com hematoxilina de Meyer por 30 segundos e finalmente o material foi lavado em água corrente, por 10 minutos.

Todas as lâminas utilizadas na imunoistoquímica foram desidratadas em uma série crescente de etanol: etanol 85%, etanol 95% e três séries de álcool absoluto, por três minutos cada. Em seguida as amostras foram diafanizadas em xilol, em três series de três minutos cada. Após a diafanização, as lâminas foram cobertas com lamínulas vedadas com resina sintética¹⁸.

4.3.8.4 Análise dos resultados

Os resultados foram analisados sob microscópio óptico binocular¹⁹, em aumento de 40x, sem que houvesse identificação do animal, membro ou grupo referente.

Para determinar a expressão dos anticorpos IGF-1 e TGF- β 1 nas amostras coletadas, todos os campos do fragmento foram analisados e, para cada campo foi determinado um escore referente à porcentagem de células positivas (Quadro 4), conforme descrito por Heller et al. (2005):

Escala	Porcentagem de células positivas
0	0%
1	< 10%
2	10 a 30%
3	30 a 60%
4	> 60%

Quadro 4 – Escala correspondente a porcentagem (%) de células positivas para expressão do respectivo anticorpo (HELLER et al., 2005)

¹⁸ Fisher Chemical/ Fisher Scientific, USA, Tolueno Permout, SP15-500

¹⁹ Leika DMR

Para determinar a expressão do anticorpo PCNA foram escolhidos quatro campos por lâmina e todos os núcleos das células marcados e não marcados foram contados. Em seguida, foi utilizada a mesma escala dos anticorpos IGF-1 e TGF- β 1.

Foram utilizados uma câmera Leica DFC 500 e um programa Leica Qwin V3 para arquivar as imagens dos materiais processados.

4.3.9 Análise da Birrefringência do Colágeno

A análise da birrefringência foi utilizada para detectar ou mensurar a variação da organização dos feixes de colágenos durante o processo de reparação, por meio de sua propriedade óptica anisotrópica.

Os fragmentos foram processados no laboratório de eletrotermofototerapia do Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos.

Cada lâmina ficou imersa em água destilada por tempo mínimo de 30 minutos com a finalidade de reidratar os fragmentos contidos na sua superfície. Em seguida, foram analisadas, sob microscopia de luz polarizada, quanto a organização, estado de agregação e orientação molecular das fibras de colágeno no tendão, pela medida da birrefringência.

Para realização das mensurações, o eixo longitudinal das fibras de colágeno, foi orientado à 45°, em relação à direção de propagação da luz polarizada. O retardo óptico foi medido, utilizando o compensador de Senarmont $\lambda/4$. Foram realizadas 10 medidas de cada animal. As medidas obtidas em graus foram transformadas para nm, multiplicando-as por 3,03.

4.3.10 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram avaliados por meio de programa computacional (Instat-Graphpad 3 Software). Após análise de variância por medidas repetidas, o teste de Tukey-Kramer foi utilizado para comparação, entre os dias, dos valores de frequência cardíaca, frequência respiratória e temperatura retal, dentro do mesmo

grupo. Para os dados não paramétricos, como dor e claudicação, utilizou-se os testes de Friedman ou Wilcoxon na identificação de diferenças dentro do mesmo grupo. Para comparação da claudicação entre membros tratados e não tratados utilizou-se o teste de Mann-Whitney.

Para avaliação do perímetro, em cada altura e ao longo do tratamento, utilizou-se novamente análise de variância por medidas repetidas seguida pelo teste de Tukey-Kramer e, para comparação entre os perímetros de membros tratados e não tratados empregou-se o teste t não pareado ou teste de Mann-Whitney. Os mesmos testes foram empregados para a comparação dos valores da área do tendão, área da lesão, porcentagem lesada da área do tendão e comprimento longitudinal da lesão.

Já as medianas dos valores de alinhamento longitudinal das fibras, ecogenicidade do tendão e da lesão foram avaliadas dentro do mesmo grupo pelo teste de Friedman e, pelo teste de Mann-Whitney para comparação entre membros tratados e não tratados.

Os valores da expressão de IGF-1, TGF- β 1, PCNA, bem como a birrefringência foram comparados entre G1, membros tratados e não tratados de G2; e entre G1, os membros tratados e não tratados de G3 respectivamente. Para tanto se utilizou o teste de Kruskal-Wallis ou Mann-Whitney.

O grau de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5% ($P < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Analgesia dos Animais

A sedação com xilazina a 10% e a anestesia por infiltração local com cloridrato de lidocaína a 2%, sem vasoconstritor, foram eficazes, tanto para realização da infiltração com a solução de collagenase, como para a biópsia. Todavia o tratamento com ultrassom terapêutico foi realizado apenas com os animais no tronco de contenção.

5.2 Infiltração por Collagenase

A infiltração intratendínea de collagenase na região central do tendão flexor digital superficial foi eficiente para a indução da tendinite em equinos. Entretanto, ambos os membros torácicos, de um animal do G2 (nº 14) e dois animais, do G3 (nº 19 e 20), novamente foram infiltrados, pois a lesão não atingiu o tamanho estipulado de 25% da área transversal do tendão, para início do tratamento.

5.3 Avaliação Clínica

A infiltração com solução de collagenase nos membros torácicos teve por consequência alterações clínicas, como aumento de volume, aumento de sensibilidade e elevação de temperatura no local da lesão em todos os animais; além disso, os animais apresentaram alterações de dinâmica e postura antálgica quando em estação.

O aumento de volume no local da lesão foi observado, tanto na inspeção, como na palpação (Figura 5), sendo interpretado como edema decorrente do

processo inflamatório instalado. Essa alteração foi notada nas primeiras 24 horas após a infiltração, permanecendo na maioria dos membros tratados e não tratados até o final do experimento, tanto nos animais do G2, como nos animais do G3.

Figura 5 – Aumento de volume no local da lesão 24 horas após a infiltração com collagenase (seta)

Os perímetros dos membros torácicos dos animais do G1, G2 e G3 (anteriores a infiltração por collagenase – A0) estão descritos nas tabelas 1 e 2. Os perímetros foram mensurados a cada dois centímetros, por toda a extensão do osso terceiro metacarpiano, considerando o ponto zero, a região palmar do osso carpoulnar.

Tabela 1 – Perímetros das circunferências (cm) dos membros torácicos direitos dos animais do G1, G2 e G3, a cada dois centímetros, no início do experimento (A0) – São Paulo – 2009

	Altura - dia A0													
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28
Animal														
1		27,8	24,0	21,8	20,0	19,0	18,8	18,8	19,0	20,2	23,0	25,6	28,2	31,3
2	29,0	26,5	22,9	21,3	20,4	19,6	18,7	18,6	18,9	19,0	19,7	21,0	23,3	25,4
3	31,0	30,0	26,0	23,7	22,3	21,5	20,9	20,8	21,0	22,2	23,5	25,0	26,5	27,8
5	28,0	24,8	22,7	20,5	20,0	19,6	19,5	19,9	20,9	20,9	21,5	23,5	26,4	27,5
6	26,3	25,0	21,8	19,3	19,3	18,8	18,9	18,8	19,2	19,6	20,9	23,5	26,5	27,0
7	27,5	24,7	21,6	20,3	19,3	19,1	19,1	19,2	19,3	19,5	20,2	21,2	24,0	25,3
8	28,5	25,9	21,5	21,0	20,1	19,7	19,7	20,0	20,1	20,4	21,1	22,3	25,1	26,5
9	28,9	26,0	22,8	21,9	21,5	21,2	21,2	21,2	21,8	22,4	29,1	29,3	29,3	28,5
10	26,2	23,8	20,2	19,2	19,0	18,8	18,7	19,0	19,2	19,8	20,2	21,7	24,8	26,8
11	28,0	25,5	21,6	20,2	19,6	19,4	19,4	19,5	20,0	20,4	22,0	22,6	26,0	28,5
12	28,6	26,4	22,2	20,5	19,8	19,6	19,6	19,6	19,8	20,2	20,9	21,9	24,5	27,2
13	26,9	24,9	21,4	20,2	20,0	19,8	19,7	19,7	20,1	20,7	22,2	25,0	26,8	26,6
14	28,7	25,8	21,5	20,5	19,7	19,5	19,5	19,8	20,0	20,3	20,9	22,4	25,5	27,7
15	27,5	24,9	22,5	20,0	19,0	18,8	18,8	18,9	19,0	19,0	19,5	20,5	23,1	26,0
16	29,6	27,6	23,3	21,6	19,9	20,0	19,9	19,8	20,0	20,3	20,9	21,5	23,3	25,8
17	28,0	25,4	21,7	20,8	20,1	19,6	19,3	19,4	19,6	20,0	20,8	22,2	24,7	26,5
18	25,8	22,4	20,0	18,8	18,4	18,5	18,9	19,2	19,2	19,2	20,0	21,5	25,0	26,0
19	27,5	24,5	22,5	21,0	19,7	19,0	19,0	19,4	19,4	19,7	20,8	22,7	26,5	27,7
20	26,8	24,3	21,4	19,8	19,1	19,0	19,0	19,0	19,4	19,7	20,3	21,7	24,6	26,0
Média	27,93	25,59	22,19	20,65	19,85	19,50	19,40	19,51	19,78	20,18	21,45	22,91	25,48	27,06
DP	1,30	1,65	1,34	1,13	0,88	0,77	0,69	0,67	0,77	0,92	2,13	2,16	1,64	1,40

Tabela 2 - Perímetros das circunferências (cm) dos membros torácicos esquerdos dos animais do G1, G2 e G3, a cada dois centímetros, no início do experimento (A0) – São Paulo – 2009

Animal	Altura - dia A0													
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28
1		21,8	19,8	18,8	19,2	18,1	18,2	18,6	18,8	19,8	22,0	23,0	27,0	27,4
2	26,1	23,1	20,9	19,5	18,8	18,6	18,5	18,6	18,9	19,4	20,6	22,4	24,9	24,6
3	30,0	30,2	27,0	23,0	21,8	20,6	19,7	19,8	19,5	20,0	20,5	21,7	23,0	27,0
4	27,0	23,5	21,5	21,0	20,7	21,1	21,1	21,3	21,8	23,0	23,7	25,3	26,7	29,0
5	27,0	23,5	21,5	21,0	20,7	21,1	21,1	21,3	21,8	23,0	23,7	25,3	26,7	29,0
6	26,2	23,4	20,7	19,8	19,6	19,0	19,3	19,5	19,8	20,5	21,6	24,3	26,7	26,3
7	26,3	23,0	19,6	18,5	18,0	18,0	18,0	18,0	18,5	19,2	20,4	23,0	25,7	27,0
8	25,9	22,0	20,4	19,3	19,2	19,0	19,3	19,3	19,8	20,0	20,5	22,0	24,9	26,1
9	29,3	27,0	23,4	21,5	21,9	20,8	20,6	20,9	21,4	21,9	22,8	24,0	26,5	28,7
10	25,7	21,7	20,0	19,0	18,8	18,8	19,0	19,2	19,5	20,5	21,5	23,3	27,2	29,1
11	28,5	26,0	23,0	21,3	19,5	19,5	19,5	19,4	19,7	19,9	20,0	22,5	25,6	27,4
12	27,6	25,5	21,8	20,4	19,8	19,8	19,9	20,1	20,6	21,6	22,6	24,0	27,2	28,8
13	26,8	24,3	21,2	20,2	19,7	19,7	19,6	19,9	20,2	20,5	22,1	24,9	27,4	27,4
14	28,8	25,7	21,4	19,9	19,3	19,2	19,3	19,4	19,6	19,8	20,5	22,3	24,5	26,8
15	27,7	24,9	21,0	19,8	19,0	18,7	18,7	18,8	18,8	19,0	19,8	21,0	24,0	26,5
16	29,3	27,4	24,3	21,4	20,3	19,9	19,8	19,5	19,8	20,0	20,7	21,3	23,2	26,0
17	28,0	25,3	23,3	20,5	20,0	19,6	19,8	20,1	20,7	21,4	22,2	24,0	26,2	27,0
18	25,8	23,3	21,4	18,8	18,3	18,1	18,2	18,4	18,5	18,6	19,3	20,5	23,5	25,3
19	28,0	25,0	22,2	21,0	20,3	20,0	20,3	20,6	21,0	21,5	22,5	24,4	26,0	27,5
20	27,0	24,8	22,0	20,5	19,5	19,4	19,0	19,0	19,0	19,5	20,0	21,0	23,5	25,0
Média	27,42	24,57	21,82	20,26	19,72	19,45	19,45	19,59	19,89	20,46	21,35	23,01	25,52	27,10
DP	1,31	2,09	1,74	1,13	1,02	0,95	0,89	0,93	1,04	1,24	1,30	1,48	1,47	1,34

Os perímetros da circunferência dos membros do G2, nas alturas 02, 04, 06, 08, 10, 18, 20, 22, 24, 26 e 28 não diferiram entre si nos membros tratados e não tratados ($P>0,05$), ou apresentaram diferenças entre os membros, no transcorrer do experimento. Diferentemente do que ocorreu nas alturas 12, 14 e 16 ($P<0,05$), onde se observou aumento em relação ao A0 (Tabelas 3, 4 e 5), logo após a infiltração por collagenase, perdurando até o final do experimento (T15).

Nas alturas 12 e 16 dos membros tratados, houve regressão do aumento da circunferência no início do tratamento, já para os membros não tratados esta regressão ocorreu somente ao final do tratamento. Entretanto, não foi observada qualquer regressão na altura 14.

Tabela 3 - Perímetros das circunferências (cm) na altura 12 dos membros tratados e não tratados dos animais do G2 – São Paulo – 2009

Dias		A0	A11	T1	T15
Membros tratados					
	Animais				
	9	21,2	21,8	22	21,4
	10	18,8	20,3	19,7	20
	11	19,4	19,6	19,4	20,2
	12	19,8	21,4	21,5	21,4
	13	19,7	20	19,8	19,6
	14	19,8	20	19,5	19,5
	Média	19,78 a	20,52 b	20,32 ab	20,35 ab
	DP	0,791	0,877	1,130	0,853
Membros não tratados					
	9	20,8	21,4	21,2	20,8
	10	18,8	19,1	18,9	18,8
	11	19,5	19,5	19,6	19
	12	19,6	21,1	21,2	20,8
	13	19,8	20,4	20,3	20,1
	14	19,8	19,8	20,1	19,9
	Média	19,72 a	20,22 b	20,22 b	19,90 ab
	DP	0,646	0,911	0,902	0,858

A = dias anteriores ao início do tratamento; T = dias posteriores ao início do tratamento. Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente em nível de $P < 0,05$.

Tabela 4 - Perímetros das circunferências (cm) na altura 14 dos membros tratados e não tratados dos animais do G2 – São Paulo – 2009

Dias		A0	A11	T1	T15
Membros tratados					
	Animais				
	9	21,2	21,8	22,3	21,7
	10	18,7	20,4	20	20,7
	11	19,4	20	20	20,2
	12	19,9	21,1	21,3	21,2
	13	19,6	20,9	20,3	20,1
	14	19,8	20,1	19,8	19,8
	Média	19,77 a	20,72 b	20,62 b	20,62 b
	DP	0,821	0,685	0,983	0,725
Membros não tratados					
	9	20,6	21,5	21,4	21
	10	19	20	19,6	19,4
	11	19,5	20	19,7	19,3
	12	19,6	20,8	21,1	20,6
	13	19,7	20,6	20,6	20,2
	14	19,8	20	20,3	20,2
	Média	19,70 a	20,48 b	20,45 b	20,12 b
	DP	0,522	0,608	0,729	0,665

A = dias anteriores ao início do tratamento; T = dias posteriores ao início do tratamento. Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente em nível de $P < 0,05$.

Tabela 5 - Perímetros das circunferências (cm) na altura 16 dos membros tratados e não tratados dos animais do G2 – São Paulo – 2009

Dias		A0	A11	T1	T15
Membros tratados					
	Animais				
	9	21,2	22	22,1	21,4
	10	19	20,5	18	20,7
	11	19,5	19,8	19,9	20,2
	12	20,1	20,9	20,9	21
	13	19,9	20,6	20,4	20
	14	19,8	20,1	20	19,8
	Média	19,92 a	20,65 b	20,22 ab	20,52 ab
	DP	0,736	0,766	1,350	0,621
Membros não tratados					
	9	20,9	21,8	21,5	21
	10	19,2	19,9	19,6	19,7
	11	19,4	19,7	19,6	19,2
	12	19,6	20,6	20,7	20,5
	13	19,7	20,4	20,3	20
	14	19,9	19,9	20	20
	Média	19,78 a	20,38 b	20,28 b	20,07 ab
	DP	0,598	0,773	0,731	0,625

A = dias anteriores ao início do tratamento; T = dias posteriores ao início do tratamento. Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente em nível de $P < 0,05$.

Também os perímetros da circunferência dos membros do G3 nas alturas 02, 04, 06, 08, 10, 18, 20, 22, 24, 26 e 28 não apresentaram diferenças entre si nos membros tratados e não tratados durante todo o experimento, ou entre eles ($P>0,05$). Entretanto, nas alturas 12, 14 e 16 foi observado aumento em relação ao A0, logo após a infiltração por collagenase (Tabelas 6, 7 e 8).

Na altura 12, dos membros tratados ocorreu diminuição da circunferência, ao final do experimento. Na altura 14, esta diminuição ocorreu nos membros não tratados. Na altura 16, ocorreu aumento do perímetro da circunferência nos membros não tratados, ao longo do experimento, e diminuição dos membros tratados ao final do tratamento.

Tabela 6 - Perímetros das circunferências (cm) na altura 12 dos membros tratados e não tratados dos animais do G3 – São Paulo – 2009

Dias		A0	A11	T1	T20	T42	T59
Membros tratados							
	Animais						
	15	18,7	19,6	19,4	19,8	19,5	19
	16	20	20,4	20,4	20,3	20,3	20,8
	17	19,6	20	20,2	20,6	20,9	20,4
	18	18,5	18,8	18,9	18,8	18,9	18,8
	19	20,5	20,4	20,9	20,3	20,5	20,4
	20	19,8	20,4	20,4	20,3	20,3	20
	Média	19,52 a	19,93 b	20,03 b	20,02 b	20,07 b	19,90 ab
	DP	0,773	0,641	0,739	0,649	0,731	0,817
Membros não tratados							
	15	18,8	18,7	18,5	19	19	19
	16	19,9	20,2	19,9	20,2	20,2	20,2
	17	19,6	20,2	20	20	20,8	20,2
	18	18,1	18,8	18,5	19	18,6	19
	19	20,5	20,9	20,9	20,5	20,3	20,1
	20	19,5	19,8	20,4	20,1	20,4	20,2
	Média	19,40 a	19,77 b	19,70 ab	19,80 b	19,88 b	19,78 b
	DP	0,844	0,864	0,994	0,642	0,873	0,608

A = dias anteriores ao início do tratamento; T = dias posteriores ao início do tratamento. Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente em nível de $P<0,05$.

Tabela 7 - Perímetros das circunferências (cm) na altura 14 dos membros tratados e não tratados dos animais do G3 – São Paulo – 2009

Dias		A0	A11	T1	T20	T42	T59
Membros tratados							
	Animais						
	15	18,7	19,6	19,5	19,8	19,5	19,2
	16	19,9	20,2	20,1	20	20,2	21
	17	19,3	20,1	20	19,8	20,5	20,2
	18	18,9	19	19,3	19	19	18,8
	19	20,6	20,6	21,7	20,7	20,8	20,5
	20	19,5	19,8	20	20	20,1	19,9
	Média	19,48 a	19,88 b	20,10 b	19,88 b	20,02 b	19,93 b
	DP	0,694	0,553	0,846	0,546	0,662	0,819
Membros não tratados							
	15	18,8	19,2	19,2	19,1	19,3	19
	16	19,8	19,9	19,7	20	19,8	20
	17	19,8	20	20	19,8	20,8	20,2
	18	18,2	19	18,9	19	18,8	19,3
	19	20,4	20,9	19,9	20,7	20,5	20,2
	20	19,5	20,1	20	19,8	20,2	19,9
	Média	19,42 a	19,85 b	19,62 b	19,73 b	19,90 b	19,77 ab
	DP	0,791	0,683	0,462	0,625	0,754	0,501

A = dias anteriores ao início do tratamento; T = dias posteriores ao início do tratamento. Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente em nível de $P < 0,05$.

Tabela 8 - Perímetros das circunferências (cm) na altura 16 dos membros tratados e não tratados dos animais do G3 – São Paulo – 2009

Dias		A0	A11	T1	T20	T42	T59
Membros							
Tratados	Animais						
	15	18,8	19,2	19,3	19,3	19,3	18,9
	16	19,8	20	20,1	29,8	20,1	21,3
	17	19,4	19,7	19,7	19,8	20,6	20
	18	19,2	19,5	19,4	19,2	19,4	19
	19	20,4	21,1	20,9	20,5	20,7	20,4
	20	19,6	19,9	20	19,8	20,1	20
	Média	19,53 a	19,90 b	19,90 b	21,40 b	20,03 b	19,93 ab
	DP	0,547	0,654	0,583	4,141	0,585	0,898
Membros							
não tratados	15	18,9	19,5	19	18,9	19,2	19
	16	19,5	19,8	19,6	19,9	19,9	19,9
	17	20,1	20,2	20	19,8	20,8	20,5
	18	18,4	19,2	19	19,1	19	19,4
	19	20,2	20,9	19,9	20,7	20,5	20,2
	20	19,7	20	20	19,7	20,3	20,2
	Média	19,47 a	19,93 b	19,58 ab	19,68 ab	19,95 b	19,87 b
	DP	0,700	0,592	0,475	0,640	0,723	0,565

A = dias anteriores ao início do tratamento; T = dias posteriores ao início do tratamento. Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente em nível de $P < 0,05$.

Apenas quatro animais do G2 apresentaram postura antálgica em estação. Esta alteração ocorreu no momento que a lesão atingiu seu maior tamanho e cessou com o início do tratamento. Esse fato refletiu no bem estar geral dos animais do G2, demonstrando dor anterior ao início do tratamento, mas diminuindo logo em seguida. Os animais do G3 não demonstraram dor durante todo o experimento.

Os aumentos de sensibilidade e temperatura na região lesada, também foram observados à palpação 24 horas após a infiltração. O aumento da sensibilidade permaneceu em média 15 dias (T15) tanto no G2, como no G3, após o início do tratamento; e o aumento de temperatura, até o final do experimento, sendo o T15 para o G2 e T60 para o G3.

A claudicação foi observada 24 horas após a administração de colagenase, variando entre os graus 1 e 4. O aumento do grau de claudicação foi gradativo, alcançando grau 5 em um animal do G3 (nº 15), quando a lesão atingiu seu maior

tamanho. A claudicação perdurou em média por 15 dias (T15) nos membros tratados e não tratados independentemente do grupo, porém, três animais apresentaram claudicação até o dia da biópsia [nº 11 (G2), 15 e 19 (G3)]. No G2, o grau de claudicação aumentou até o início do tratamento, mas ao final não foi possível observar claudicação nos animais (Tabela 9). A mediana do grau de claudicação do G3 não apresentou variação durante todo o experimento (Tabela 10).

Tabela 9 – Grau de claudicação dos membros tratados e não tratados do G2 – São Paulo – 2009

Dias		A0	A11	T1	T15
Membros tratados	Animais				
	9	0	1	2	0
	10	0	3	3	0
	11	0	3	3	3
	12	0	0	0	0
	13	1	2	2	0
	14	0	0	0	0
	Mediana	0 a	1,5 ab	2 b	0 ab
Membros não tratados	9	0	0	1	0
	10	0	2	2	0
	11	0	3	2	1
	12	0	1	1	0
	13	1	1	2	0
	14	0	0	0	0
	Mediana	0 a	1 ab	1,5 b	0 a

A = dias anteriores ao início do tratamento; T = dias posteriores ao início do tratamento.

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente em nível de $P < 0,05$.

Tabela 10 - Grau de claudicação dos membros tratados e não tratados do G3 – São Paulo – 2009

Dias		A0	A11	T1	T15	T30	T60
Membros tratados							
	Animais						
	15	0	3	4	3	1	0
	16	0	1	0	0	0	2
	17	0	2	0	0	0	0
	18	0	0	0	0	0	0
	19	4	4	4	3	3	2
	20	0	0	0	0	0	0
	Mediana	0 a	1,5 a	0 a	0 a	0 a	0 a
Membros não tratados							
	15	1	4	3	4	4	4
	16	0	3	1	0	0	0
	17	0	2	0	0	0	0
	18	0	0	0	0	0	0
	19	2	2	2	2	0	4
	20	0	0	0	0	0	0
	Mediana	0 a	2 a	0,5 a	0 a	0 a	0 a

A = dias anteriores ao início do tratamento; T = dias posteriores ao início do tratamento. Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente em nível de $P < 0,05$.

A frequência cardíaca, frequência respiratória, temperatura retal não demonstraram alterações ao longo do experimento, nos animais do G2; apenas a frequência cardíaca do G3 aumentou logo após a infiltração da collagenase, diminuindo ao final do tratamento. Não foram observadas alterações nas seguintes variáveis: tempo de preenchimento capilar; coloração das mucosas, motilidade intestinal, presença de apetite, micção e defecação.

5.4 Avaliação Ultrassonográfica

Após uma semana da infiltração com collagenase, os resultados da avaliação ultrassonográfica, longitudinal e transversal do tendão, demonstraram, na maioria dos animais, uma imagem hipocóica correspondente a área lesada. O alcance de

25% de lesão tendínea ocorreu em média 15 dias após a infiltração com collagenase. Essa lesão manteve seu padrão hipoeecóico durante os 15 dias de tratamento (T15) do G2 (Tabela 11; Figuras 6A, B e C; Figuras 7A, B e C).

Porém, a ecogenicidade da lesão no G3 apresentou um brilho maior 20 dias após o início do tratamento (T20) (Figura 8). A ecogenicidade da lesão dos membros tratados do G3 apresentou resultados aproximados à ecogenicidade do tendão normal, sendo difícil sua identificação 60 dias após o início do tratamento (T60) (Tabela 12; Figuras 9A, B e C; Figuras 10A, B e C).

Tabela 11 – Escore da ecogenicidade da lesão dos membros tratados e não tratados do G2, por avaliação ultrassonográfica – São Paulo – 2009

Dias		A0	A10	T1	T15
Membros tratados					
	Animais				
	9	0	1	2	2
	10	0	3	3	3
	11	0	3	3	3
	12	0	3	3	2
	13	0	3	3	2
	14	2	2	1	1
	Mediana	0 a	3 b	3 b	2 b
Membros não tratados					
	9	0	1	1	1
	10	0	2	1	3
	11	0	3	1	3
	12	0	2	2	2
	13	0	2	3	1
	14	1	2	1	1
	Mediana	0 a	2 b	1 b	1,5 b

A = dias anteriores ao início do tratamento; T = dias posteriores ao início do tratamento.

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente em nível de $P < 0,05$.

Figura 6 – Imagens ultrassonográficas do corte transversal do tendão do membro tratado do animal 11 do G2: (A) anterior à infiltração, (B) anterior ao início do tratamento e (C) ao final do tratamento

Figura 7 – Imagens ultrassonográficas do corte transversal do tendão do membro não tratado do animal 11 do G2: (A) anterior à infiltração, (B) anterior ao início do tratamento e (C) ao final do tratamento

Figura 8 – Mediana da ecogenicidade da lesão dos membros tratados e não tratados do G2 e G3, no decorrer da pesquisa

Tabela 12 – Escore da ecogenicidade da lesão dos membros tratados e não tratados do G3, por avaliação ultrassonográfica – São Paulo – 2009

Dias		A0	A10	T1	T20	T40	T60
Membros tratados	Animais						
	15	0	3	3	2	1	0
	16	0	2	3	2	1	1
	17	0	3	3	3	3	1
	18	0	1	1	1	1	1
	19	3	3	2	1	1	1
	20	1	1	2	1	1	1
	Mediana	0 a	2,5 ab	2,5 b	1,5 ab	1 ab	1 ab
Membros não tratados	Animais						
	15	0	3	3	2	1	1
	16	0	1	2	1	1	2
	17	0	1	2	2	1	2
	18	0	2	2	1	1	1
	19	0	3	3	1	1	1
	20	1	2	3	1	3	2
	Mediana	0 a	2 bc	2,5 b	1 abc	1 abc	1,5 c

A = dias anteriores ao início do tratamento; T = dias posteriores ao início do tratamento. Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente em nível de $P < 0,05$.

Figura 9 – Imagens ultrassonográficas do corte transversal do tendão do membro tratado do animal 15 do G3: (A) anterior à infiltração, (B) anterior ao início do tratamento e (C) ao final do tratamento

Figura 10 – Imagens ultrassonográficas do corte transversal do tendão do membro não tratado do animal 15 do G3: (A) anterior à infiltração, (B) anterior ao início do tratamento e (C) ao final do tratamento

A ecogenicidade do tendão perdeu seu brilho logo após a infiltração por collagenase. As avaliações do G2 demonstraram que a ecogenicidade do tendão após 15 dias de tratamento (T15) é diferente da ecogenicidade de um tendão normal, tanto nos membros tratados como nos não tratados ($P<0,05$) (Tabela 13). Entretanto, os tendões dos membros tratados do G3 demonstraram ecogenicidade muito próxima do tendão normal ($P>0,05$), na avaliação após 60 dias de tratamento (T60). O que não ocorreu nos membros não tratados ($P<0,05$) (Tabela 14).

Tabela 13 – Escore de ecogenicidade do tendão dos membros tratados e não tratados do G2, por avaliação ultrassonográfica – São Paulo – 2009

Dias		A0	A10	T1	T15
Membros tratados					
	Animais				
	9	1	1	1	1
	10	0	3	3	3
	11	0	2	2	2
	12	0	1	1	0
	13	1	1	1	1
	14	1	1	1	1
	Mediana	0,5 a	1 b	1 b	1 b
Membros não tratados					
	9	0	1	1	1
	10	0	1	1	1
	11	0	1	1	1
	12	0	1	1	1
	13	1	1	1	1
	14	1	1	1	1
	Mediana	0 a	1 b	1 b	1 b

A = dias anteriores ao início do tratamento; T = dias posteriores ao início do tratamento.

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente em nível de $P<0,05$.

Tabela 14 – Escore de ecogenicidade do tendão dos membros tratados e não tratados do G3, por avaliação ultrassonográfica – São Paulo – 2009

Dias		A0	A10	T1	T20	T40	T60
Membros tratados							
	Animais						
	15	0	1	3	1	1	0
	16	0	1	1	1	1	1
	17	0	1	1	1	1	1
	18	0	1	1	1	1	0
	19	1	2	2	1	1	1
	20	1	1	1	1	1	1
	Mediana	0 a	1 b	1 b	1 ab	1 ab	1 a
Membros não tratados							
	15	0	1	1	1	1	1
	16	0	1	1	1	1	1
	17	0	1	1	1	1	1
	18	1	1	1	1	1	1
	19	0	1	1	1	1	1
	20	1	1	1	1	1	1
	Mediana	0 a	1 b	1 b	1 b	1 b	1 b

A = dias anteriores ao início do tratamento; T = dias posteriores ao início do tratamento. Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente em nível de $P < 0,05$.

As tabelas 15 e 16 demonstram a área do tendão normal por toda a extensão do osso terceiro metacarpiano no dia A0, considerando o ponto zero, a região palmar do osso carpoulnar:

Tabela 15 – Área do tendão normal (cm²) do membro torácico direito por avaliação ultrassonográfica – São Paulo – 2009

	Altura - dia A0												
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26
Animais													
1		1,5	1,42	1,72	1,62	1,3	1,29	1,26	1,13	1,31	1,64	1,72	1,66
2		1,13	1,04	1,11	1,46	0,9	0,81	0,87	0,9	0,79	0,95	1	0,99
5	1,03	1,32	1,12	1,11	1,07	0,91	1,07	0,99	1,06	0,93	0,94	0,99	1,18
6	1,29	1,1	1,15	1,72	1,28	0,83	0,83	1,18	0,98	0,97	1,13	1,16	1,48
7	0,65	0,81	0,8	0,9	0,87	0,77	0,87	0,87	0,95	0,82	0,9	1,1	1,3
8	0,72	0,81	0,81	1,01	0,82	0,82	0,82	0,81	0,69	0,79	0,76	0,9	1,33
9	0,88	0,86	0,81	0,95	0,93	0,99	0,99	0,72	1,03	0,99	1,08	1,15	
10	0,91	0,9	0,83	0,66	0,67	0,71	0,79	0,76	0,81	0,85	0,8	0,79	
11	0,9	0,87	0,8	0,6	0,72	0,69	0,778	0,88	0,91	0,98	0,95	1,15	
12	0,88	0,87	0,83	0,75	0,93	0,73	0,84	0,91	0,86	1,07	0,93	1,07	
13	0,84	0,71	0,66	0,77	0,94	0,92	0,79	0,82	0,8	0,75	0,86	1,12	1,56
14	0,63	0,9	0,77	0,86	0,91	0,98	0,9	0,87	0,85	0,97	0,83	1,08	1,31
15	0,75	0,95	0,99	1,07	0,95	1	1,04	1,02	1,05	1,04	1,27	1,2	1,45
16	1	0,9	0,94	0,88	0,84	0,82	0,81	0,83	0,79	0,87	0,81	0,85	
17	0,92	0,85	1,03	1,02	0,74	0,81	0,83	0,78	0,81	0,87	0,94	1,08	
18	0,62	0,71	0,78	0,77	0,78	0,85	0,78	0,78	0,74	0,96	0,84	0,89	
19	1,27	1,2	0,97	0,94	0,95	0,96	1,02	0,93	0,95	0,96	0,89		
20	0,8	0,86	0,86	0,87	0,8	0,78	0,75	0,79	0,95	0,83	1,02		
Média	0,88	0,96	0,92	0,98	0,96	0,88	0,89	0,89	0,90	0,93	0,97	1,08	1,36
DP	0,20	0,21	0,18	0,30	0,25	0,14	0,14	0,14	0,12	0,13	0,21	0,21	0,20

Tabela 16 – Área do tendão normal (cm²) do membro torácico esquerdo por avaliação ultrassonográfica – São Paulo – 2009

Altura - dia A0													
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	
Animais													
1		1,41	1,46	1,97	1,76	1,70	1,49	1,45	1,19	1,10	1,00	1,55	1,78
2		1,14	0,87	0,87	0,78	1,05	0,85	0,66	0,70	0,80	0,74	1,04	0,91
3	1,03	1,17	1,17	1,00	1,23	1,18	1,20	0,94	1,04	1,01	0,85	1,10	1,04
4	1,28	1,32	1,14	1,26	1,13	1,11	1,19	1,21	1,24	1,31	1,72	1,32	1,87
5	1,02	1,10	1,05	0,80	1,21	1,21	1,06	0,99	0,91	1,14	0,84	0,75	1,88
6	0,87	1,09	1,10	1,27	1,16	1,39	0,92	0,86	0,78	0,91	0,81	1,16	1,14
7	0,72	0,91	0,92	0,83	0,85	0,76	0,80	0,82	0,68	0,85	0,67	0,82	1,09
8	1,10	1,17	0,92	1,10	1,01	1,07	0,99	1,04	1,04	0,98	1,16	1,12	1,12
9	0,76	0,75	0,81	0,82	0,84	0,61	0,88	0,97	0,85	1,35			
10	0,95	0,82	1,00	0,76	0,76	0,78	0,82	0,91	0,85	0,70	0,85	0,97	
11	0,99	0,94	0,78	0,76	0,89	0,86	0,87	0,85	0,99	0,88	0,84	0,92	
12	1,14	0,91	0,84	1,02	0,96	1,09	1,08	1,13	1,34	1,59	1,55	1,38	1,23
13	1,02	0,92	0,85	0,80	0,70	0,75	0,79	0,79	0,71	0,81	0,78	1,09	1,11
14	1,14	1,13	0,94	0,79	0,73	0,96	0,95	0,97	0,93	1,00	0,87	1,13	1,47
15	0,79	0,92	0,78	0,82	0,85	0,88	0,97	1,05	0,90	0,80	1,11	1,13	1,36
16	0,87	0,94	0,79	0,79	0,95	0,85	0,90	0,73	0,69	0,85	1,02	0,75	
17	0,72	0,86	0,80	0,72	0,83	0,75	0,79	1,02	1,08	1,14	1,18	1,07	
18	0,90	0,94	0,78	0,77	0,82	0,81	0,77	0,89	0,94	0,85	0,87	0,89	
19	1,09	1,21	1,15	1,10	1,14	1,00	1,02	0,91	1,17	1,08	0,95		
20	1,03	1,06	1,07	1,04	0,99	0,89	0,94	0,94	1,08	0,99	1,13		
Média	0,97	1,04	0,96	0,96	0,98	0,99	0,96	0,96	0,96	1,01	0,97	1,07	1,33
DP	0,16	0,17	0,18	0,29	0,25	0,25	0,18	0,17	0,19	0,22	0,24	0,22	0,34

As medidas das áreas transversais do tendão, da lesão, porcentagem de área lesada do tendão e comprimento longitudinal da lesão apresentaram aumento gradativo, até o início do tratamento; a partir desse momento, foi observada uma lenta diminuição desses parâmetros até o final do experimento. Contudo, os tendões dos animais do G2 não retornaram ao seu tamanho original, como também não ocorreu o desaparecimento da lesão, observando-se tanto sua área transversal (Figura 11), como seu comprimento longitudinal (Tabelas 17, 18 e 19 respectivamente). Essa informação é confirmada com a porcentagem de área lesada do tendão, que apesar de diminuir ao longo do tratamento não retornou ao índice inicial (Tabela 20; Figura 12).

Tabela 17 – Área do tendão (cm²) dos membros tratados e não tratados do G2, por avaliação ultrassonográfica – São Paulo – 2009

Dias		A0	A10	T1	T15
Membros tratados					
	Animais				
	9	0,99	1,28	1,61	1,84
	10	0,79	1,73	1,61	2,07
	11	0,78	1,55	1,48	1,71
	12	1,09	1,63	1,68	1,83
	13	0,79	0,90	0,97	1,02
	14	1,14	1,30	1,33	1,13
	Média	0,93 a	1,40 b	1,45 b	1,60 b
	DP	0,164	0,303	0,264	0,424
Membros não tratados					
	9	0,88	1,04	1,13	1,16
	10	0,82	1,06	1,10	1,09
	11	0,87	1,46	1,29	1,18
	12	0,73	1,47	1,43	1,68
	13	0,79	1,12	1,24	1,10
	14	1,07	1,20	1,29	1,24
	Média	0,86 a	1,23 b	1,25 b	1,24 b
	DP	0,117	0,194	0,120	0,222

A = dias anteriores ao início do tratamento; T = dias posteriores ao início do tratamento.

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente em nível de P<0,05.

Tabela 18 – Área da lesão (cm²) dos membros tratados e não tratados do G2, por avaliação ultrassonográfica – São Paulo – 2009

Dias		A0	A10	T1	T15
Membros tratados					
	Animais				
	9	0	0,14	0,54	0,50
	10	0	0,88	0,84	0,97
	11	0	0,49	0,54	0,74
	12	0	0,43	0,37	0,17
	13	0	0,21	0,30	0,15
	14	0,21	0,23	0,38	0,23
	Média	0,04 a	0,40 b	0,50 b	0,46 b
	DP	0,086	0,273	0,195	0,339
Membros não tratados					
	9	0	0,08	0,25	0,26
	10	0	0,14	0,35	0,28
	11	0	0,39	0,38	0,29
	12	0	0,35	0,35	0,41
	13	0	0,20	0,34	0,21
	14	0,13	0,22	0,34	0,33
	Média	0,02 a	0,23 b	0,34 b	0,30 b
	DP	0,053	0,120	0,044	0,068

A = dias anteriores ao início do tratamento; T = dias posteriores ao início do tratamento.

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente em nível de $P < 0,05$.

Tabela 19 – Comprimento longitudinal da lesão (cm) dos membros tratados e não tratados do G2, por avaliação ultrassonográfica – São Paulo - 2009

Dias		A0	A10	T1	T15
Membros					
Tratados	Animais				
	9	0	13	13	9
	10	0	19	9	13
	11	0	17	9	6
	12	0	3	5	1
	13	0	2	4	4
	14	6	7	5	5
	Média	1,00 a	10,17 b	7,50 b	6,33 ab
	DP	2,449	7,223	3,450	4,179
Membros					
não tratados					
	9	0	13	13	11
	10	0	5	5	4
	11	0	9	5	5
	12	0	3	4	5
	13	0	2	5	5
	14	4	5	4	5
	Média	0,67 a	6,17 b	6,00 b	5,83 b
	DP	1,633	4,119	3,464	2,563

A = dias anteriores ao início do tratamento; T = dias posteriores ao início do tratamento.

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente em nível de $P < 0,05$.

Tabela 20 – Porcentagem (%) da área do tendão lesada nos membros tratados e não tratados do G2, por avaliação ultrassonográfica – São Paulo – 2009

Dias		A0	A10	T1	T15
Membros tratados					
	Animais				
	9	0	11	33	27
	10	0	51	52	47
	11	0	31	36	43
	12	0	26	22	9
	13	0	23	31	15
	14	18	18	29	20
	Mediana	0 a	24,5 b	32 b	23,5 b
Membros não tratados					
	9	0	8	22	22
	10	0	13	32	26
	11	0	27	29	24
	12	0	24	24	24
	13	0	18	27	19
	14	12	18	26	27
	Mediana	0 a	18 ab	26,5 b	24 b

A = dias anteriores ao início do tratamento; T = dias posteriores ao início do tratamento.

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente em nível de $P < 0,05$.

Ao final do tratamento no G3, as áreas dos tendões dos membros tratados e não tratados se aproximaram da área de um tendão sem lesão (Tabela 21). Do mesmo modo, a área transversal da lesão quase desapareceu, tanto nos membros tratados como nos não tratados (Tabela 22; Figura 11). Sendo assim, a porcentagem de área lesada no tendão diminuiu (Figura 12), representando seu menor índice ao final do experimento (Tabela 23). Na avaliação longitudinal, a lesão diminuiu gradativamente com o início do tratamento, quase desaparecendo neste plano de avaliação (Tabela 24).

Tabela 21 – Área do tendão (cm²) dos membros tratados e não tratados do G3, por avaliação ultrassonográfica – São Paulo – 2009

Dias		A0	A10	T1	T20	T42	T59
Membros tratados							
	Animais						
	15	0,97	1,34	1,53	1,27	1,42	1,10
	16	0,82	0,99	1,06	1,23	1,08	0,91
	17	0,81	1,19	1,13	1,22	1,18	0,94
	18	0,78	0,91	0,88	0,91	1,08	0,86
	19	1,30	1,57	1,57	1,49	1,33	1,24
	20	1,01	1,15	1,06	1,11	1,17	1,17
	Média	0,95 a	1,19 b	1,21 b	1,21 b	1,21 b	1,04 ab
	DP	0,196	0,240	0,280	0,191	0,138	0,155
Membros não tratados							
	15	1,04	1,61	1,38	1,55	1,24	1,05
	16	0,85	1,03	0,95	0,96	0,97	0,83
	17	0,75	1,04	0,94	0,96	0,88	0,80
	18	0,89	0,86	0,83	1,00	0,96	0,92
	19	1,04	1,41	1,41	1,18	1,22	1,15
	20	0,90	1,32	1,24	0,96	1,22	1,22
	Média	0,91 a	1,21 b	1,13 bc	1,10 abc	1,08 abc	1,00 ac
	DP	0,113	0,281	0,250	0,236	0,162	0,172

A = dias anteriores ao início do tratamento; T = dias posteriores ao início do tratamento. Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente em nível de P<0,05.

Tabela 22 – Área da lesão (cm²) dos membros tratados e não tratados do G3, por avaliação ultrassonográfica – São Paulo – 2009

Dias		A0	A10	T1	T20	T40	T60
Membros tratados							
	Animais						
	15	0	0,33	0,56	0,35	0,25	0
	16	0	0,21	0,39	0,47	0,26	0,28
	17	0	0,13	0,33	0,42	0,30	0,40
	18	0	0,31	0,27	0,22	0,41	0,17
	19	0,34	0,67	0,62	0,41	0,25	0,09
	20	0	0,15	0,23	0,47	0,14	0,12
	Média	0,06 a	0,30 b	0,40 b	0,39 b	0,27 ab	0,18 ab
	DP	0,139	0,199	0,158	0,094	0,088	0,143
Membros não tratado							
	15	0	0,19	0,38	0,33	0,08	0,06
	16	0	0,09	0,31	0,17	0,21	0,06
	17	0	0,10	0,21	0,18	0,18	0,12
	18	0	0,36	0,22	0,18	0,26	0,26
	19	0,13	0,31	0,37	0,32	0,39	0,06
	20	0,19	0,20	0,34	0,41	0,22	0,05
	Média	0,05 a	0,21 cd	0,31 bc	0,27 bc	0,22 cd	0,10 ad
	DP	0,085	0,109	0,074	0,102	0,102	0,082

A = dias anteriores ao início do tratamento; T = dias posteriores ao início do tratamento.

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente em nível de $P < 0,05$.

Figura 11 – Médias da área da lesão (cm²) dos membros tratados e não tratados do G2 e G3, no decorrer da pesquisa

Tabela 23 – Porcentagem (%) da área do tendão lesada nos membros tratados e não tratados do G3, por avaliação ultrassonográfica – São Paulo – 2009

Dias		A0	A10	T1	T20	T40	T60
Membros tratados							
	Animais						
	15	0	25	37	27	18	0
	16	0	21	37	38	24	31
	17	0	11	29	34	25	42
	18	0	34	31	24	38	2
	19	26	43	39	27	19	7
	20	0	13	28	42	12	10
	Mediana	0 a	23 b	34 b	30,5 b	21,5 ab	8,5 ab
Membros não tratados							
	15	0	12	27	21	6	6
	16	0	8	33	18	22	7
	17	0	9	22	19	2	15
	18	0	42	26	18	27	28
	19	13	22	26	27	32	5
	20	21	15	27	43	18	4
	Mediana	0 a	13,5 a	26,5 b	20 b	20 ab	6,5 ab

A = dias anteriores ao início do tratamento; T = dias posteriores ao início do tratamento. Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente em nível de $P < 0,05$.

Tabela 24 – Comprimento longitudinal da lesão (cm) dos membros tratados e não tratados do G3, por avaliação ultrassonográfica – São Paulo – 2009

Dias		A0	A10	T1	T20	T40	T60
Membro tratado							
	Animais						
	15	0	5	5	6	1	0
	16	0	4	4	4	5	3
	17	0	3	3	3	4	5
	18	0	2	1	1	1	1
	19	5	5	5	3	2	2
	20	1	3	1	2	1	1
	Média	1,00 a	3,67 b	3,17 b	3,17 ab	2,33 ab	2,00 ab
	DP	2,000	1,211	1,835	1,722	1,751	1,789
Membro não tratados							
	15	0	5	4	2	1	1
	16	0	3	4	2	2	1
	17	0	5	3	2	1	1
	18	0	1	1	1	3	1
	19	1	1	1	3	1	1
	20	1	1	1	1	1	2
	Média	0,33 a	2,67 b	2,33 ab	1,83 ab	1,50 ab	1,17 ab
	DP	0,516	1,966	1,506	0,753	0,837	0,408

A = dias anteriores ao início do tratamento; T = dias posteriores ao início do tratamento.

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente em nível de $P < 0,05$.

Figura 12 – Porcentagem (%) da área tendínea lesada nos membros tratados e não tratados do G2 e G3, no decorrer da pesquisa.

Analisando os tendões dos animais do G2, durante toda pesquisa, não foi observada variação na mediana do alinhamento longitudinal das fibras do tendão (Tabela 25; Figuras 13A, B e C; Figuras 14A, B e C). Apesar da variação entre 0 e 3, poucos apresentaram o grau 3 de perda do paralelismo. Porém no G3 foi observada uma perda no paralelismo das fibras no local da lesão, logo após a infiltração com collagenase. Com o início do tratamento essas fibras se reorganizaram, apresentando um padrão paralelo ao final do experimento (Tabela 26; Figuras 15A, B e C; Figuras 16A, B e C).

Tabela 25 – Escore do alinhamento longitudinal das fibras nos membros tratados e não tratados do G2, por avaliação ultrassonográfica – São Paulo – 2009

Dias		A0	A10	T1	T15
Membros tratados					
	Animais				
	9	0	0	0	1
	10	0	3	3	3
	11	0	2	2	2
	12	0	2	1	0
	13	0	0	2	1
	14	2	0	0	0
	Mediana	0 a	1 a	1,5 a	1 a
Membros não tratados					
	9	0	0	0	0
	10	0	2	0	2
	11	0	1	0	2
	12	0	1	1	1
	13	0	1	0	0
	14	1	0	0	0
	Mediana	0 a	1 a	0 a	0,5 a

A = dias anteriores ao início do tratamento; T = dias posteriores ao início do tratamento.

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente em nível de $P < 0,05$.

Figura 13 – Imagens ultrassonográficas no corte longitudinal do tendão do membro tratado do animal 11 do G2: (A) anterior à infiltração, (B) anterior ao início do tratamento e (C) ao final do tratamento. Observar alinhamento das fibras.

Figura 14 - Imagens ultrassonográficas no corte longitudinal do tendão do membro não tratado do animal X do G2: (A) anterior à infiltração, (B) anterior ao início do tratamento e (C) ao final do tratamento. Observar alinhamento das fibras

Tabela 26 – Escore do alinhamento longitudinal das fibras nos membros tratados e não tratados do G3, por avaliação ultrassonográfica – São Paulo – 2009

Dias		A0	A10	T1	T20	T40	T60
Membros tratados							
	Animais						
	15	0	3	3	0	0	0
	16	0	2	2	1	0	1
	17	0	1	0	1	2	0
	18	0	0	0	0	0	0
	19	0	1	2	1	0	1
	20	0	1	0	0	0	1
	Mediana	0 a	1 b	1 b	0,5 a	0 a	0,5 a
Membros não tratados							
	15	0	1	3	0	0	0
	16	0	1	2	0	0	0
	17	0	0	0	0	0	0
	18	0	1	1	1	0	0
	19	0	2	2	1	0	0
	20	0	2	1	2	2	1
	Mediana	0 a	1 bc	1,5 bc	0,5 ab	0 ac	0 ac

A = dias anteriores ao início do tratamento; T = dias posteriores ao início do tratamento. Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente em nível de $P < 0,05$.

Figura 15 - Imagens ultrassonográficas no corte longitudinal do tendão do membro tratado do animal 15 do G3: (A) anterior à infiltração, (B) anterior ao início do tratamento e (C) ao final do tratamento. Observar alinhamento das fibras

Figura 16 - Imagens ultrassonográficas no corte longitudinal do tendão do membro não tratado do animal 15 do G3: (A) anterior à infiltração, (B) anterior ao início do tratamento e (C) ao final do tratamento. Observar alinhamento das fibras

5.5 Biópsia

5.1 Avaliação Macroscópica

Todas as amostras de tendão, dos membros tratados e não tratados, do G2 e G3 apresentavam aspecto gelatinoso, quando comparadas com as amostras do G1 (Figuras 17A e B).

Figura 17 - (A) Aspecto macroscópico da amostra de tendão normal G1. (B) Aspecto gelatinoso das amostras dos tendões do G2 e G3

5.6 Avaliação Imunoistoquímica

A avaliação imunoistoquímica foi feita pela expressão do PCNA, do IGF-1 e TGF- β 1. Os anticorpos IGF-1 e TGF- β 1 coram em marrom o citoplasma das células, que apresentam esses antígenos. Já a expressão do PCNA positiva apresenta o núcleo das células na cor marrom.

5.6.1 Anticorpo IGF-1

Quando analisada a expressão do anticorpo IGF-1, as amostras dos membros tratados do G2 não apresentaram diferença estatística com relação às amostras de tendão normal (G1) (Figuras 18A e B). Entretanto, a mediana da intensidade dos membros não tratados foram superiores às amostras dos tendões normais e tratados (Figura 18C), apresentando diferença estatística ($P < 0,05$) (Tabela 27).

Tabela 27 – Medianas dos escores de expressão positiva do IGF-1 nas células dos tendões do G1, membros tratados e não tratados do G2, com seus respectivos números de análises efetuadas – São Paulo - 2009

	Número de análises	Mediana
G1	102	2 a
G2 - membro tratado	52	2 ab
G2 - membro não tratado	52	3 b

Letras minúsculas distintas na mesma coluna diferem significativamente em nível de $P < 0,05$.

Figura 18 - Imagem microscópica da imunomarcagem do anticorpo IGF-1 das células do tendão: (A) grupo controle, G1; (B) membro tratado do G2; (C) membro não tratado do G2. A imunocoloração na foto C é mais intensa que nas fotos A e B. Citoplasma das células positivas para a expressão do IGF-1 (seta). (Aumento de 40x)

5.6.2 Anticorpo TGF- β 1

Para a expressão do TGF- β 1, os membros não tratados do G2 não apresentaram diferença estatística com relação ao tendão normal (G1) (Figuras 19A e C). Porém os membros tratados apresentaram maior expressão do TGF- β 1 (Figura 19B) em relação ao G1 e aos não tratados do G2 (Tabela 28).

Tabela 28 – Medianas dos escores de expressão positiva do TGF- β 1 nas células dos tendões do G1, membros tratados e não tratados do G2, com seus respectivos números de análises efetuadas – São Paulo - 2009

	Número de análises	Mediana
G1	107	3 a
G2 - membro tratado	59	4 b
G2 - membro não tratado	80	3 ab

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente em nível de $P < 0,05$.

Figura 19 - Imagem microscópica da imunomarcação do anticorpo TGF- β 1 das células do tendão: (A) grupo controle, G1; (B) membro tratado do G2; (C) membro não tratado do G2. A imunocoloração na foto B é mais intensa que nas fotos A e C. Citoplasma das células positivas para a expressão do TGF- β 1 (seta). (Aumento de 40x)

5.6.3 Anticorpo PCNA

No G1, não ocorreu expressão das proteínas do PCNA, no núcleo das células (Figura 20A). Um leve traço na expressão do PCNA ocorreu no núcleo das células, dos membros tratados do G2 e, um traço mais acentuado na expressão dos membros não tratados (Figuras 20B e C). Todavia, a expressão positiva para o PCNA no núcleo das células dos tendões normais do G1, dos tendões dos membros tratados e não tratados do G2 não apresentaram diferença estatística ($P>0,05$), apesar da marcação positiva em algumas células (Tabela 29).

Tabela 29 – Medianas dos escores de expressão positiva do PCNA nas células dos tendões do G1, membros tratados e não tratados do G2, com seus respectivos números de análises efetuadas – São Paulo - 2009

	Número de análises	Mediana
G1	48	0 a
G2 - membro tratado	24	0 a
G2 - membro não tratado	20	0 a

Letras minúsculas distintas na mesma coluna diferem significativamente em nível de $P<0,05$.

Figura 20 - Imagem microscópica da imunomarcagem do anticorpo PCNA das células do tendão: (A) grupo controle, G1; (B) membro tratado do G2; (C) membro não tratado do G2. Expressão positiva do PCNA no núcleo das células (seta). (Aumento de 40x)

5.7 Análise da Birrefringência do Colágeno

Os resultados demonstraram diferença estatística significativa entre os valores de G1 e dos membros não tratados do G3 e, entre os membros tratados e não tratados do G3 ($P < 0,001$). Por meio deste teste, apenas a análises do G1 e dos membros tratados do G3 apresentaram birrefringência igual ($P > 0,05$).

Quanto maior o valor OR observado na birrefringência, melhor é o resultado do tratamento. Os dados do presente estudo revelaram que a maior intensidade da birrefringência está relacionada com os maiores valores de OR dos tendões dos animais do G1 e dos membros tratados do G3. Os valores OR desses grupos foram maiores que os valores atribuídos para os membros não tratados do G3, ou seja, o G3 apresentou os menores valores de birrefringência (Tabela 30).

Na análise qualitativa observou-se a concentração, estado de agregação, orientação e deposição das fibras do colágeno. Comparando as imagens dos membros tratados e não tratados do G3, podemos observar resultado qualitativo melhor nos membros tratados quando comparados com os tendões do G1. A imagem dos tendões não tratados do G3 apresentou características inferiores na orientação e agregação das fibras de colágeno quando comparadas às demais amostras.

A figura 21A representa as amostras do G1. Observamos organização, alinhamento e paralelismo das fibras tendíneas quando observadas sob microscopia de luz polarizada. A figura 21B representa as amostras dos tendões que sofreram tendinite e receberam irradiação por ultrassom terapêutico. E a figura 21C representa as amostras dos tendões com tendinite induzida por collagenase, com pouca birrefringência.

Tabela 30 – Medianas dos retardos ópticos (η m) dos tendões do G1, membros tratados e não tratados do G3, com seus respectivos números de análises efetuadas – São Paulo - 2009

	Número de análises	Mediana
G1	390	10,90 a
G3 - membro tratado	180	12,12 a
G3 - membro não tratado	180	9,99 b

Letras minúsculas distintas na mesma coluna diferem significativamente em nível de $P < 0,05$.

Figura 21 - Análise quantitativa da birrefringência das amostras dos tendões do (A) G1, (B), membros tratados do G3 e (C) membros não tratados do G3, com seu eixo longitudinal orientado a 45° em relação a direção de propagação da luz polarizada. (Aumento de 20x)

6 DISCUSSÃO

Com o intuito de padronizar lesões tendíneas que reproduzissem a tendinite de ocorrência natural, Santos (2004) explorou o emprego da collagenase de origem bacteriana, como possibilidade de induzir a lesão. Segundo Freitas (2004) e Williams et al. (1984), as alterações clínicas, ultrassonográficas e histopatológicas da tendinite induzida são coincidentes àquelas observadas nas tendinites de ocorrência natural. Assim como no presente experimento, outros autores mostraram modelos eficientes na indução da tendinite experimental do TFDS de equinos (WILLIAMS et al., 1984; SPURLOCK et al., 1989; ALVES et al., 2001a, b; MARXEN et al., 2003, 2004; FREITAS, 2004; SANTOS, 2004; BARREIRA, 2005; OLIVEIRA, 2008;).

6.1 Avaliação Clínica

As alterações clínicas observadas nas primeiras 24 horas, após a infiltração com collagenase, como aumento de volume, de sensibilidade e de temperatura no local da lesão, constatadas em todos os animais deste trabalho assemelham-se aos relatos de Palmer et al. (1994) sobre tendinite aguda do TFDS de ocorrência natural. Além disso, Williams et al. (1984) afirmaram que as infiltrações da collagenase bacteriana na matriz do TFDS resultam em um rápido desenvolvimento de inflamação local e edema, também coincidindo com os aspectos evidenciados neste trabalho. O aumento de volume do tendão nas alturas 12,14 e 16 cm, tanto no G2 como no G3 foi interpretado como edema e hemorragia decorrente do processo inflamatório instalado, que na maioria dos animais permaneceu até o final do experimento (T60). Tempo este superior ao relatado por outros autores; no estudo de Fernandes et al. (2003), o edema persistiu até o 40º dia; nos achados de Alves et al. (2001b) o edema durou em média 45 dias; já Barreira (2005) relatou um período de 48 dias. Entretanto, estão referidos na literatura períodos mais prolongados da permanência do aumento de volume, como observados

por Oliveira (2008) durante 120 dias; e constatados por Marxen et al. (2004), período de 150 dias de experimento. O maior período encontrado na literatura foi descrito por Williams et al. (1984), aumento de volume do tendão por período de 14 meses, após a indução da tendinite com colagenase.

Segundo Webbon (1973), os processos inflamatórios, responsáveis pelo aumento de sensibilidade e temperatura, desenvolvidos nas tendinites agudas, são resultantes da ação de enzimas que levam à ruptura fibrilar, hemorragia e exsudação. Neste trabalho foi referido o aumento de sensibilidade e de temperatura à palpação do local da lesão nas primeiras 24 horas. Esses aspectos foram divergentes das observações de Marxen et al. (2004), que descreveram um aumento significativo na dor e na temperatura do tendão com 48 horas.

Em discordância com as referências de outros autores, o trabalho em questão demonstrou que a sensibilidade na região lesada permaneceu em média por 15 dias após o início do tratamento, aproximadamente 30 dias após a indução da lesão, nos membros tratados e não tratados. Alves et al. (2001b) descreveram a presença de resposta positiva à palpação até o 45º dia de experimento; Barreira (2005), até o 48º dia; e Oliveira (2008) em média por 65 dias.

No presente experimento, o aumento de temperatura permaneceu nos membros tratados e não tratados até o final do tratamento (T60). No estudo de Alves et al. (2001b) essa alteração permaneceu em média por 45 dias. Freitas (2004) e Marxen et al. (2004) observaram alteração de sensibilidade à palpação e aumento de volume no local da lesão, por 90 dias.

Todos os animais deste experimento apresentaram claudicação, variando de grau 1 a 4, 24 horas após a inoculação da colagenase, com remissão em média aos 15 dias após o início do tratamento. Esses dados estão de acordo com os de Foland et al. (1992) que relataram o aparecimento imediato de claudicação moderada após a aplicação da colagenase; e Freitas (2004) que observou claudicação com grau 2 a 4, 24 horas após a indução com colagenase. Diferentes dos achados anteriores, Williams et al. (1984) referem que a claudicação se desenvolveu dentro de seis horas, permanecendo por três semanas. Também os dados apresentados nesse trabalho são muito similares aos de Alves et al. (2001b), que observaram claudicação até grau 5, por

um período de 15 dias nos grupos tratados e não tratados. Do mesmo modo, Santos (2004) observou em seu estudo claudicação, na maioria dos animais, por 30 dias. Conforme Gillis (1997), a claudicação deve estar ausente após um período curto de repouso e, permanecer apenas no período de cicatrização do tendão. Porém os resultados desse experimento discordam com os descritos anteriormente por Marxen et al. (2004), que apesar de observar claudicação grau 2-3 com 24 horas após a indução da lesão, esta alteração diminuiu gradualmente, permanecendo até 45 dias, quando todos os cavalos não apresentaram mais claudicação. E também discordantes dos relatos de Oliveira (2008) que observou o final da claudicação no 45º dia após a infiltração; do trabalho de Barreira (2005), que referiu a claudicação até grau 3 por até 48 dias, mas após 60 dias não observou mais claudicação nos animais.

As diferenças encontradas nas avaliações clínicas dos diversos trabalhos citados podem ser justificadas pelas alterações de concentração da collagenase utilizada no momento da infiltração, ou mesmo pela diferença no tamanho da lesão inicial.

6.2 Avaliação Ultrassonográfica

A avaliação ultrassonográfica mostrou-se eficiente, tanto no auxílio dos procedimentos de indução da lesão e de biópsia, como no acompanhamento da cicatrização tendínea.

As lesões por collagenase induzidas no centro do terço médio do TFDS tiveram a finalidade de mimetizar as tendinites de ocorrência natural observadas por Webbon (1977). Por isso a justificativa do procedimento ser conduzido por ultrassom.

Após a infiltração com collagenase, o tamanho da lesão pode apresentar variações. Conforme Crass et al. (1992) e Marr et al. (1993a), as diferenças observadas entre os animais, provavelmente estão relacionadas à severidade das lesões definidas inicialmente pelas avaliações clínica e ultrassonográfica. Além disso, Palmer et al. (1994) ressaltaram a possibilidade da variação na resposta individual dos animais, tornando-se difícil prever o comportamento da lesão. Freitas (2004) da mesma forma

descreve esta dificuldade em seu trabalho. Também essa variabilidade de condutas foram observadas no presente estudo, essa diferença foi corrigida estipulando o tamanho mínimo de 25% de área lesada para o início do tratamento.

Os resultados ultrassonográficos, após uma semana da infiltração com colagenase, estão de acordo com os achados de Alves et al. (2001b), Marxen et al. (2004), Barreira (2005) e Oliveira (2008), porém diferem dos registrados por de Henry et al. (1986) que não obtiveram imagem nítida, após uma semana de ocorrência da lesão.

As avaliações ultrassonográficas seriadas foram utilizadas para acompanhar o processo de cicatrização da lesão. As lesões mais severas foram identificadas entre o 3º e o 43º dia após a infiltração. Marxen et al. (2004) fez a mesma observação entre o 7º e o 23º dia e; Freitas (2004) entre o 3º e o 15º dia após a indução da lesão.

Depois de atingir seu maior tamanho, a lesão demonstra aumento de ecogenicidade. Neste estudo, os membros tratados do G3 demonstraram ecogenicidade muito próxima do tendão normal, na avaliação após 60 dias de tratamento (T60). No estudo de Alves (1998), a redução da área lesada ocorreu aos 150 dias, ficando próximo do tendão sadio. Já Freitas (2004) acompanhou os animais por 90 dias e, durante este período ainda observou a presença das lesões. Oliveira (2008) demonstrou que 120 dias de acompanhamento não foram suficientes para que as lesões atingissem a normalidade do padrão ecóico.

A avaliação ultrassonográfica, revelou aumento mais precoce na ecogenicidade das lesões nos membros tratados, sugerindo um aumento na deposição do colágeno comparado com os membros não tratados. Esses achados conferem àqueles encontrados por Henry et al. (1986), que descreveram o aumento mais significativo da ecogenicidade das lesões com a produção de colágeno, resultante da organização dos fibroblastos durante o processo de cicatrização. Esses dados evidenciam uma correlação direta entre a quantidade de colágeno e a intensidade da ecogenicidade.

Também se observou paralelismo das fibras após 60 dias de tratamento (T60); divergindo do estudo de Barreira (2005) realizado com células-tronco sem alcançar esse resultado após 48 dias. Não ocorreu alinhamento das fibras no trabalho realizado por Freitas (2004), 90 dias após indução da lesão. Segundo Van Schie et al. (2001), o alinhamento dos feixes ao longo do eixo longitudinal do tendão foi observado após um

ano, refletido em imagens ultrassonográficas homogêneas e alinhadas. Gillis (1996) afirma que seriam necessários pelo menos 90 dias para avaliar essa característica da morfologia tendinea.

6.3 Biópsia

A biópsia realizada por meio do instrumento automático Pro-Mag™ Ultra mostrou-se simples, prática e eficiente. A mesma opinião foi demonstrada por Freitas (2004), que apesar de achar dificuldade na manipulação do fragmento colhido por meio da biópsia, concordou que a amostra foi suficiente para realizar todos os testes.

6.4 Avaliação imunoistoquímica

A intensidade da expressão do IGF-1 e TGF- β varia com os estágios da regeneração do tendão (YEUNG et al., 2004).

Os resultados dessa pesquisa demonstraram que a expressão do IGF-1 nos membros não tratados foi superior aos membros tratados e aos tendões normais (G1), aos 15 dias de tratamento (T15). Segundo Dowling et al. (2000), o nível de proteína do IGF-1 diminui do início até duas semanas após a lesão, quando aumenta até um platô entre quatro e oito semanas. Já Sciori et al. (1998) demonstraram que o nível do mRNA do IGF-1 é cinco vezes maior, três semanas após a lesão e que diminui com seis a 14 semanas. Considerando que o tratamento no presente estudo iniciou-se, em média, 15 dias após a lesão, perdurando por 15 dias (momento da biópsia), os resultados referem-se aos achados de IGF-1 aos 30 dias após a lesão. Logo, a expressão de IGF-1 nos membros não tratados coincide com as informações de Dowling et al. (2000), ou seja, mostra-se elevada, ou em platô elevado as quatro semanas. Contudo, a

expressão de IGF-1 dos membros tratados coincide com as observações de Sciori et al. (1998), ou seja, em diminuição.

Essas observações demonstram que o UST acelerou a cicatrização do tendão, pois as amostras dos membros tratados apresentaram-se em uma fase posterior da cicatrização em comparação com as amostras dos membros não tratados.

Ainda os membros tratados apresentaram maior expressão do TGF- β 1 em comparação com os membros não tratados, aos 15 dias de tratamento (T15), quatro semanas após indução da lesão. Os achados de Dowling et al. (2000) revelam que os níveis da proteína do TGF- β iniciam seu aumento após uma semana e tem o pico em quatro semanas, após a lesão. Entretanto, Ngo et al. (2001) observaram pico no 14º dia após a lesão e, a diminuição no 56º dia, o que pode explicar o fato da expressão de TGF- β 1 nos membros não tratados apresentarem valores semelhantes aos encontrados em G1.

O trabalho de Leung et al. (2006) demonstrou que o UST pulsado utilizado no tratamento do ligamento colateral medial em ratos aumentou a expressão do TGF- β 1. Ainda, Wen et al. (2006) evidenciaram que o tratamento com ultrassom estimulou a secreção de TGF- β *in vitro*. Nesse trabalho observou-se que o aumento da expressão do TGF- β 1 está correlacionado com o tratamento do UST no modo pulsado, utilizado nos animais do G2.

Machado et al. (2000) encontraram proliferação celular, infiltrado inflamatório e neoformação vascular, seis semanas após a formação da lesão. Esses achados foram confirmados por Fernandes et al. (2003), que observaram organização tecidual compatível com a fase proliferativa da tendinite. A avaliação realizada na presente pesquisa com o marcador PCNA, visando identificar a presença de proliferação celular nesta fase da cicatrização tendínea, não apresentou resultados concordantes com os dados referidos acima. Não foi observada diferença significativa entre o G1 e os membros tratados e não tratados do G2 para a expressão do PCNA.

Além disso, Wen et al. (2005) referiram o aumento da expressão da proteína do PCNA nas células do tendão, *in vitro* pelo o ultrassom.

Os níveis de proteína do PCNA avaliados pela imunoistoquímica foram muito baixos devido a desnaturação da proteína ocorrida em algum momento no

processamento das amostras. Provavelmente essa alteração tenha sido responsável pela inobservância de elevados níveis de expressão do PCNA esperados.

6.5 Análise da Birrefringência do Colágeno

Vidal (1990) relata ser por meio das propriedades físicas (birrefringência), a melhor maneira para se detectar e descrever a orientação das fibras de colágeno. Diversos trabalhos referidos na literatura (VIDAL; CARVALHO, 1990; CUNHA et al., 2001; SANTOS, 2004; KOEKE et al., 2005) demonstram que a microscopia de luz polarizada é um método eficiente, qualitativamente e quantitativamente, para examinar a organização, o estado de agregação e a ordem molecular das fibras do colágeno.

Baseado nos dados selecionados acima, analisou-se qualitativamente e quantitativamente os resultados desse trabalho, demonstrando que os valores de retardo óptico (OR) foram maiores para as amostras do G1 e dos membros tratados, quando comparados com as amostras dos membros não tratados do G3. Já Koeke et al. (2005) afirmam que os maiores valores para o OR ocorrem nos tendões que não sofreram nenhum tipo de lesão, devido ao alto grau de agregação e organização das fibras de colágeno. O presente trabalho demonstrou que os menores valores de OR encontrados nos membros não tratados do G3 ocorreram pelo baixo grau de organização e agregação das fibras de colágeno. Este fato já era esperado por representar a cicatrização natural do tendão.

Os achados demonstram equivalência dos valores estatísticos de OR para os membros tratados do G3, comparados com os valores do G1, indicando boa organização das fibras de colágeno no local da cicatrização. Em contraste com nossos resultados, Santos (2004) não observou diferença estatística significativa na birrefringência entre tendões após 150 dias de tratamento com PSGAG em comparação com solução salina. Também foi observado que, a média dos valores do retardo óptico (28,41 η m) do grupo controle no estudo de Santos (2004), foi superior a mediana (10,90 η m) apresentada pelo grupo controle (G1) no presente estudo. Supõe-se que

isso ocorreu devido divergência da morfologia tendínea das raças, modalidade atlética dos animais ou técnica de biópsia utilizada para obtenção do fragmento. Todos esses fatores podem interferir na ordem molecular do tendão.

Segundo Vidal (1987b) durante o processo de regeneração, existe um aumento na intensidade no brilho na imagem de birrefringência, revelando o grau de agregação e ordem molecular. Enwemeka e Spielholz (1992) junto com Vilarta e Vidal (1989) propuseram que os feixes de colágeno atuam como transmissores de sinais para as células via piezoelectricidade; promovem a organização e agregação das fibras de colágeno no processo de reparo do tendão devido as características piezoelétricas do UST, às compressões mecânicas no tecido alvo, induzindo trocas elétricas nas superfícies externas e gerando potenciais elétricos de baixa amplitude.

6.6 Tratamento por Ultrassom Terapêutico

Constatou-se que a irradiação do UST com a frequência de 1 MHz e intensidade de $0,5 \text{ W/cm}^2$ (SATA), no modo pulsado (100 Hz, ciclo de trabalho 20%), por cinco minutos alcançou bons resultados em outros trabalhos; coincidentes com outros estudos presentes na literatura (CUNHA et al., 2001; KOEKE et al., 2005). Outra referência literária (MORCOS; ASWAD, 1978) encontrou melhora na cicatrização em tendões, após o tratamento com “splitting” associado à terapia por ultrassom no modo contínuo.

O tratamento aplicado nesse trabalho foi instituído aproximadamente 15 dias após a indução da lesão; segundo Porter (1991b) o ultrassom é benéfico quando aplicado com intensidade baixa, duas semanas após a formação da lesão, período que inicia a formação de colágeno e a infiltração fibroblástica; ela afirma que as aplicações do ultrassom no início do processo de reparo podem retardar a cicatrização. Entretanto, Cunha et al. (2001) e Koeke et al. (2005) afirmam que a utilização do UST no modo pulsado aumenta a síntese e a deposição de fibras de colágeno no início do reparo do tendão.

Hashish et al. (1986) observaram a diminuição da dor após o tratamento com UST. Comparando os resultados deste trabalho com os resultados de Alves et al. (2001b), Barreira (2005) e Oliveira (2008), o tratamento com UST diminuiu a sensibilidade no local da lesão pelo menos 30 dias antes, dos tratamentos instituídos pelos autores referidos.

Qualquer tratamento que resulta em imagens ultrassonográficas isoecoicas, alinhamento axial das fibras de colágeno, estabilização da área transversal de superfície, e mínima reação fibrosa paratendínea são eficientes (PALMER et al., 1994). Todas essas características foram alcançadas com o tratamento instituído nessa pesquisa, confirmando sua eficiência.

Os resultados alcançados no presente trabalho, tanto pela avaliação ultrassonográfica como pela birrefringência do colágeno, demonstraram melhor agregação, organização e alinhamento das fibras de colágeno nos membros tratados. Estes resultados corroboram com o estudo de Cunha et al. (2001) onde o tratamento com ultrassom no modo pulsado demonstrou melhor agregação e alinhamento das fibras no eixo azimutal do tendão de Aquiles de ratos. Do mesmo modo, Marxell (1992) afirma que altas doses contínuas de ultrassom podem promover a maturação de tendões para um nível que as fibras de colágeno são remodeladas e reorientadas progressivamente ao longo das linhas de tensão.

Observando os resultados obtidos foi possível afirmar que o tratamento com UST acelerou a taxa da síntese do colágeno no local da lesão e de regeneração do tendão. Ramirez et al. (1997) propuseram que a aceleração da taxa de cicatrização do tendão pelo ultrassom ocorreu devido o aumento de colágeno e síntese de proteínas pelos fibroblastos. Além disso, o ultrassom demonstrou aumento da taxa de reparo em tendões de Aquiles de ratos (JACKSON et al., 1991; CUNHA et al., 2001) e aumento na síntese de colágeno no local da lesão (CUNHA et al., 2001).

O presente trabalho considerou que os critérios de avaliação utilizados no acompanhamento do processo de reparação da lesão tendínea induzida quimicamente em equinos, permitiram demonstrar que os membros irradiados com ultrassom terapêutico apresentaram um resultado superior quando comparados com os membros que não receberam o tratamento. Foi possível observar que a interação das ondas de

ultrassom, com as moléculas de colágeno provocaram uma reação de estímulo favorável no processo de cicatrização, desde os estágios iniciais.

Esses fatos permitiram que o tratamento com ultrassom terapêutico, associado ao exercício controlado e as avaliações ultrassonográficas seriadas contribuíssem para a aceleração do processo de reparação tendinea.

Williams et al. (1984) afirmaram ser evidente que a cicatrização do tendão é um longo processo e que a restituição normal da sua estrutura requer mais de um ano para ocorrer. Essa afirmação discorda dos resultados encontrados nesse trabalho; apesar dos membros tratados do G2 evidenciarem nas avaliações ultrassonográficas que o tratamento por 15 dias foi insuficiente, os resultados dos membros do G3 tratados por 60 dias demonstraram que o tendão lesado obteve características muito próximas de um tendão normal.

Ainda se fazem necessárias pesquisas utilizando o ultrassom terapêutico com a finalidade de estabelecer o melhor protocolo para este tipo de tratamento.

7 CONCLUSÃO

Nas condições em que este experimento foi desenvolvido conclui-se que:

- ✓ A avaliação clínica não foi capaz de evidenciar diferenças na resolução da tendinite entre os membros tratados e não tratados por ultrassom terapêutico;
- ✓ A avaliação ultrassonográfica comprovou ser um método eficiente para monitorar o processo de cicatrização da tendinite induzida quimicamente, demonstrando que 15 dias de tratamento com UST não foram suficientes, e 60 dias de tratamento promoveram a regeneração tendínea;
- ✓ A expressão de PCNA não mostrou ser um método eficaz de avaliação de cicatrização tendínea;
- ✓ O UST alterou a expressão de IGF-1 e TGF- β 1 na fase inicial de cicatrização tendínea;
- ✓ Por meio dos valores de birrefringência constatou-se melhora da organização e agregação das fibras do colágeno no processo de reparação tendínea, nos membros tratados por UST;
- ✓ A irradiação do UST com a frequência de 1 MHz e intensidade de 0,5 W/cm² (SATA), no modo pulsado (100 Hz, ciclo de trabalho 20%), por cinco minutos, é um método eficaz para acelerar a regeneração do tendão, assim como para melhorar a organização de suas fibras de colágeno.

REFERÊNCIAS

ABRAHAMSSON, S. O.; LUNDBORG, G.; LOHMANDER, L. S. Recombinant human insulin-like growth factor-I stimulates in vitro matrix synthesis and cell proliferation in rabbit flexor tendon. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 9, p. 495-502, 1991.

ALBRECHTSEN, S. J.; HARVEY, J. S. Dimethyl sulfoxide: biomechanical effects on tendons. **American Journal of Sports and Medicine**, v. 10, p. 177-179, 1982.

ALEXANDER, R. M. **Elastic mechanisms in animal movement**. Cambridge: Cambridge University Press, 1988. 141 p.

ALVES, A. L. G. **Influência da beta-aminopropionitrila associada à atividade física na reparação de eqüinos após agressão pela collagenase: análise ultra-sonográfica e morfológica**. 1998. 92 f. Tese (Doutorado em Medicina) - Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1998.

ALVES, A. L. G.; RODRIGUES, M. A. M.; AGUIAR, A. J. A.; THOMASSIAN, A.; NICOLETTI, J. L. M.; HUSSNI, C. A.; BORGES, A. S. Effects of beta-aminopropionitrile fumarate and exercise on equine tendon healing: gross and histological aspects. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 21, n. 7, p. 335-340, 2001a.

ALVES, A. L. G.; RODRIGUES, M. A. M.; BORGES, A. S.; NICOLETTI, J. L. M.; THOMASSIAN, A.; HUSSNI, C. A. Influência do fumarato de beta-aminopropionitrila associada ao exercício na cicatrização tendínea eqüina – Avaliação clínica e ultra-sonográfica. **Revista de Educação Continuada**, v. 4, n. 1, p. 19-27, 2001b.

ASHEIM, A.; KNUDSON, O. Percutaneous tendon splitting. In: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 13., 1967, Colorado. **Proceedings...** Colorado: AAEP, 1967. p. 255-262.

BAKER, K. G.; ROBERTSON, V. J.; DUCK, F. A. A review of therapeutic ultrasound: biophysical effects. **Physical therapy**, v. 81, n. 7, p.1351-1358, 2001.

BANKS, W. J. Sistema músculo esquelético. In: _____. **Histologia veterinária aplicada**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1992. p. 289-317.

BARNETT, C. H.; DAVIES, D. V.; MCCONAILL, M. A. **Synovial joints**: theirs structure and Mechanics. London: Longmans Green, 1961. 304 p.

BARREIRA, A. P. B. **Implante autólogo de células mesenquimais no tratamento de tendinites induzidas em eqüinos**: avaliação clínica, ultra-sonográfica, histopatológica e imunoistoquímica. 2005. 82 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2005.

BERTOLAMI, C. N.; DONOFF, R. B. Hyaluronidase activity during open wound healingin rabbits: a preliminary report. **Journal of Surgery Research**, v. 25, p. 256-259, 1978.

BIRCH, E. L.; BAILEY, J. V. B.; BAILEY, A. J.; GOODSHIP, A. E. Age-related changes to the molecular and cellular components of equine flexor tendons. **Equine Veterinary Journal**, v. 31, n. 5, p. 391-396, 1999.

BIRCH, E. L.; BAILEY, A. J.; GOODSHIP, A. E. Macroscopic degeneration of equine superficial digital flexor tendon is accompanied by change in extracellular matrix compositon. **Equine Veterinary Journal**, v. 30, n. 6, p. 534-539, 1998.

BLACK, J. Electrical stimulations of hard and soft tissues in animal models. **Clinics in Plastic Surgery**, v. 12, p. 243-257, 1985.

BRAMLAGE, L. R. Superior check ligament desmotomy as a treatment for superficial digital flexor tendonitis. In: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 32., 1986, Nashville. **Proceedings...** Nashville: AAEP, 1986. p. 365-369.

BRAYTON, C. F. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. **The Cornell Veterinarian** v. 76, p. 61-90, 1986.

BYL, N. N.; MCKENZIE, A. L.; WONG, T.; WEST, J.; HUNT, T. K. Incisional wound healing: a controlled study of low and high dose ultrasound. **The Journal of Orthopaedic and Sports Physical Therapy**, v. 18, p. 619-628, 1993.

CRASS, J. R.; GENOVESE, R. L.; RENDER, J. A.; BELLON, E. M. Magnetic resonance, ultrasound, and histopathologic correlation of acute and healing equine tendon injuries. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v. 33, p. 206-216, 1992.

CUNHA, A.; PARIZOTTO, N. A.; VIDAL, B. C. The effect of therapeutic ultrasound on repair of the achilles tendon (tendo calcaneus) of the rat. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 27, n. 12, p. 1691-1696, 2001.

DAHLGREN, L. A.; MOHAMMED, H. O.; NIXON, A. J. Temporal expression of growth factors and matrix molecules in healing tendon lesions. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 23, n. 1, p. 84-92, 2005.

DAHLGREN, L. A.; NIXON, A. J.; BROWER-TOLAND, B. D. Effects of β -aminopropionitrile on equine tendon metabolism in vitro and on effects of insulin-like growth factor-I on matrix production by equine tenocytes. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 10, p. 1557-1562, 2001.

DENOIX, J. M. Diagnostic techniques for identification and documentation of tendon and ligament injuries. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 10, n. 2, p. 365-407, 1994a.

DENOIX, J. M. Functional anatomy of tendons and ligaments in the distal limbs (manus and pes). **The Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 10, n. 2, p. 273-322, 1994b.

DENOIX, J. M. Functional anatomy of tendons and ligaments in the distal limbs (manus and pes). In: DUBAI INTERNATIONAL EQUINE SYMPOSIUM, 1996, Dubai. **Proceedings...** [Dubai]: Mathews R. Rantanen Design, 1996. p. 23-53.

DOWLING, B. A.; DART, A. J.; HODGSON, D. R.; SMITH, R. K. W. Superficial digital flexor tendonitis in the horse. **Equine Veterinary Journal**, v. 32, n. 5, p. 369-378, 2000.

DYSON, M.; POND, J. B.; JOSEFH, J.; WARWICK, R. The stimulation of tissue regeneration by means of ultrasound. **Clinical Science**, v. 35, p. 273-285, 1968.

DYSON, S. J. Treatment of superficial flexor tendinitis: a comparison of conservative management, sodium hyaluronate, and glycosaminoglycan polysulfate. In: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 43., 1997, Phoenix. **Proceedings...** Lexington: AAEP, 1997. p. 297-300.

ENWEMEKA, C. S. The effects of therapeutic ultrasound on tendon healing. **American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation**, v. 68, n. 6, p. 283-287, 1989.

ENWEMEKA, C. S.; RODRIGUEZ, O.; MENDONSA, S. The biomechanical effects of low-intensity ultrasound on healing tendons. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 16, n. 8, p. 801-807, 1990.

ENWEMEKA, C. S.; SPIELHOLZ, N. I. Modulation of tendon growth and regeneration by electrical currents and fields. In: NELSON, R.; CURRIER, D. P. **Dynamics of human biologic tissues**. Philadelphia: F. A. Davis Publishers, 1992. p. 231-254.

FALANGA, V.; QIAN, S. W.; DANIELPOUR, D.; KATZ, M. H.; ROBERTS, A. B.; SPORN, M. B. Hypoxia upregulates the synthesis of TGF- β 1 by human dermal fibroblasts. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 97, p. 634-637, 1991.

FERNANDES, M. A. L.; ALVES, G. E. S.; SOUZA, J. C. A. Efeito do ultra-som terapêutico em tendinite experimental de eqüinos: estudo clínico, ultra-sonográfico e histopatológico de dois processos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 1, p. 27-34, 2003.

FOLAND, J. W.; TROTTER, G.; POWERS, B. E.; WRIGLEY, R. H.; SMITH, F. W. Effect of sodium hyaluronate in collagenase induced superficial digital flexor tendinitis in horses. **American Journal Veterinary Research**, v. 52, p. 2371-2376, 1992.

FRANCIS, C. W.; ONUNDARSON, P. T.; CARSTENSEN, E. L.; BLINC, A.; MEITZER, R. S. Enhancement of fibrinolysis by ultrasound. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 90, p. 2063-2068, 1992.

FRANK, C.; SHRIVE, N.; HIRAOKA, H.; NAKAMURA, N.; KANEDA, Y.; HART, D. Optimisation of the biology of soft tissue repair. **Journal of science and medicine in sport**, v. 2, n. 3, p. 190-210, 1999.

FREAN, S. P.; LEES, P. Effects of polysulfated glycosaminoglycan and hyaluronan on prostaglandin E₂ production by cultured equine synoviocytes. **American Journal of Veterinary Research**, v. 61, p. 499-505, 2000.

FREITAS, J. M. R. **Estudo da viabilidade e utilidade de biópsias tendíneas seriadas em eqüinos como meio de diagnóstico e monitoração da tendinite**. 2004. 55 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

FRIEDAR, S. A pilot study: the therapeutic effect of ultrasound following partial rupture of Achilles tendons in male rats. **The Journal of Orthopaedic and Sports Physical Therapy**, v. 10, p. 39-46, 1988.

GARTNER, C. Laser treatment for therapy of resistant tendinitis. **Laser in Surgery and Medicine**, v. 7, p. 79, 1987.

GENOVESE, R. L. Sonographic response to intralesional therapy with β -aminopropiionitrile fumarate for clinical tendon injuries in horses. In: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 38., 1992, Orlando. **Proceedings...** Orlando: AAEP, 1992. p. 265-272.

GENOVESE, R. L.; RANTANEN, N. W.; HAUSER, M. L.; SIMPSON, B. S. Diagnostic ultrasonography of equine limbs. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 2, n. 1, p. 145-226, 1986.

GILLIS, C. L. Rehabilitation of Tendon and Ligament Injuries. In: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 43., 1997, Phoenix. **Proceedings...** Lexington: AAEP, 1997. p. 306-309.

GILLIS, C. L. Tendon and Ligament Rehabilitation. In: DUBAI INTERNATIONAL EQUINE SYMPOSIUM, 1996, Dubai. **Proceedings...** [Dubai]: Mathews R. Rantanen Design, 1996. p. 417-421.

GILLIS, C. L.; MEAGHER, D. M.; POOL, R. R.; STOVER, S. M.; CRAYCHEE, T. J.; WILLITS, N. Ultrasonographically detected changes in equine superficial digital flexor tendons during the first months of race training. **American Journal of Veterinary Research**, v. 54, n. 11, p. 1797-1802, 1993.

GILLIS, C. L.; POOL, R. R.; MEAGHER, D. M.; STOVER, S. M.; REISER, K.; WILLITS, N. Effect of maturation and aging on the histomorphometric and biochemical characteristics of equine superficial digital flexor tendon. **American Journal of Veterinary Research**, v. 58, p. 425-430, 1997.

GOODSHIP, A. E. The pathophysiology of flexor tendon injury in the horse. **Equine Veterinary Education**, v. 5, n. 1, p. 23-29, 1993.

GOODSHIP, A. E.; BIRCH, H. L. The pathophysiology of flexor tendons in the equine athlete. IN: DUBAI INTERNATIONAL EQUINE SYMPOSIUM, 1996, Dubai. **Proceedings...** [Dubai]: Mathews R. Rantanen Design, 1996. p. 83-107.

GOODSHIP, A. E.; BIRCH, H. L.; WILSON, A. M. The pathobiology and repair of tendon and ligament injury. **The Veterinary Clinics of North America: Equine practice**, v. 10, n. 2, p. 323-349, 1994.

HARR, G. T. Therapeutic ultrasound. **European Journal of Ultrasound**, v. 9, p. 3-9, 1999.

HARVEY, W.; DYSON, M.; POND, J. B.; GRAHAME, R. The stimulation of protein synthesis in human fibroblasts by therapeutic ultrasound. **Rheumatology and Rehabilitation**, v. 14, p. 237, 1975.

HASHISH, I.; HARVEY, W.; HARRIS, M. Anti-inflammatory effects of ultrasound therapy: evidence for a major placebo effect. **British Journal of Rheumatology**, v. 25, p. 77-81, 1986.

HAYES, K. W. **Manual for physical agents**. 4th. ed. Norwalk: Appleton & Lange, 1993. 169 p.

HAWKINS, D. L.; TURNER, T. A. Physical examination of the musculoskeletal system in the equine athlete. IN: DUBAI INTERNATIONAL EQUINE SYMPOSIUM, 1996, Dubai. **Proceedings...** [Dubai]: Mathews R. Rantanen Design, 1996. p. 119-137.

HELLER, D. A.; CLIFFORD, C. A.; GOLDSCHMIDT, M. H.; HOLT, D. E.; MANFREDI, M. J.; SORENMO, K. U. Assessment of cyclooxygenase-2 expression in canine hemangiosarcoma, histiocytic sarcoma, and mast cell tumor. **Veterinary Pathology**, n. 42, v. 3, p. 350–353, 2005.

HENNINGER, R. Treatment of superficial digital flexor tendinitis. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 10, n. 2, p. 409-424, 1994.

HENRY, G. A.; PATTON, C. S.; GOBLE, D. O. Ultrasonographic evaluation of iatrogenic injuries of the accessory (carpal check) ligament and superficial digital flexor tendon. **Veterinary Radiology**, v. 27, p. 132-140, 1986.

JACKSON, B. A.; SCHWANE, J. A.; STARCHER, B. C. Effects of ultrasound therapy on the repair of Achilles tendon injuries in rats. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 23, n. 2, p. 171-176, 1991.

JONES, A. J.; BEE, J. A. Age- and position-related heterogeneity of equine tendon extracellular matrix composition. **Research in veterinary science**, v. 48, p. 357-364, 1990.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1999. 427 p.

KOEKE, P. U.; PARIZOTTO, N. A.; CARRINHO, P. M.; SALATE, A. C. B. Comparative study of the efficacy of the topical application of hydrocortisone, therapeutic ultrasound and phonophoresis on the tissue repair process in rat tendons. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 31, n. 3, p. 345-350, 2005.

KRAUS-HANSEN, A. E.; FACKELMAN, G. E.; BECKER, C. Preliminary studies on the vascular anatomy of the equine superficial digital flexor tendon. **Equine Veterinary Journal**, v. 24, n. 1, p. 46-51, 1992.

LEUNG, M. C. P.; NG, G. Y. F.; YIP, K. K. Therapeutic ultrasound enhances medial collateral ligament repair in rats. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 32, n. 3, p. 449-452, 2006.

LI, J. K.; CHANG, W. H.; LIN, J. C.; RUAAN, R. C.; LIU, H. C.; SUN, J. S. Cytokine release from osteoblasts in response to ultrasound stimulation. **Biomaterials**, v. 24, p. 2379-2385, 2003.

MACHADO, M. V. M.; VULCANO, L. C.; HUSSNI, C. A.; ALVES, A. L. G. Efeito da laser terapia em tendinite experimental no tendão flexor digital superficial em eqüinos: estudo histológico e ultra-sonográfico. **Archives of Veterinary Science**, v. 5, p. 111-115, 2000.

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. **Veterinary Records**, v. 132, p. 476, 1993a.

MARR, C. M.; MCMILLAN, I.; BOYD, J. S.; WRIGHT, N. G.; MURRAY, M. Ultrasonographic and histopathological findings in equine superficial digital flexor tendon injury. **Equine Veterinary Journal**, v. 25, p. 23-29, 1993b.

MARXEN, S.; LACERDA-NETO, J. C.; CANOLA, J. C.; MORAES, J. R. E.; RIBEIRO, G. Efficacy of polysulphated glycosaminoglycan in the intratendinous treatment of experimental equine tendinitis. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, v. 20, n. 1, p. 43-46, 2003.

MARXEN, S.; LACERDA-NETO, J. C.; MORAES, J. R. E.; RIBEIRO, G.; QUEIROZ-NETO, A. Intralesional polysulphated glycosaminoglycan as treatment of equine collagenase induced tendinitis: clinical, ultrasonographic and histopathologic evaluation. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 6, p. 701-708, 2004.

MAST, B. A. Healing in other tissues. **The Surgical Clinics of North America**, v. 77, n. 3, p. 529-547, 1997.

MAXWELL, L.; COLLECUTT, T.; GLEDHILL, M.; SHARMA, S.; EDGAR, S.; GAVIN, J. B. The augmentation of leucocyte adhesion to endothelium by therapeutic ultrasound. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 20, n. 4, p. 383-90, 1994.

MICHLOVITZ, S. L.; **Thermal agents in rehabilitation**. 2. ed. Philadelphia: Davis, 1990. 300 p.

MIKAIL, S. C. **Avaliação da terapia por laser de arsenito de gálio em tendinite de cavalos Puro Sangue Inglês de corrida**. 2008. 131 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

MOLLOY, T.; WANG, Y.; MURRELL, G. The role of growth factors in tendon and ligament healing. **Sports Medicine**, v. 33, p. 381-394, 2003.

MORCOS, M. B.; ASWAD, A. Histological studies of the effects of ultrasonic therapy on surgically split flexor tendons. **Equine Veterinary Journal**, v. 10, n. 4, p. 267-269, 1978.

MORRIS, G. F.; MATHEWS, M. B. Regulation of proliferating cell nuclear antigen during cell cycle. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, p. 13856-13862, 1989.

MORTIMER, A. J.; DYSON, M. The effect of therapeutic ultrasound on calcium uptake in fibroblasts. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 14, p. 499-506, 1988.

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. **American Journal of Veterinary Research**, v. 58, p. 103-109, 1997.

NIMNI, M. E.; HARKNESS, R. D. Molecular structure and functions of collagen. In: NIMNI, M.E. **Collagen**. Boca Raton: CRC Press, 1988. v. 1, p. 3-61.

NGO M.; PAHM, H.; LONGAKER, M. T.; Chang, J. Differential expression of transforming growth factor-beta receptors in a rabbit zone II flexor tendon wound healing model. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 108, p. 1260-1267, 2001.

OIKAWA, M. Japanese approaches to tendinitis. In: ANNUAL FALL SYMPOSIUM ON RECENT ADVANCES IN CLINICAL VETERINARY MEDICINE, 13., Davis. **Proceedings...** Davis: University of California, 2000a. p. 68-73.

OIKAWA, M. The Japanese experience with breakdowns. In: ANNUAL FALL SYMPOSIUM ON RECENT ADVANCES IN CLINICAL VETERINARY MEDICINE, 13., Davis. **Proceedings...** Davis: University of California, 2000b. p. 63-67.

OIKAWA, M.; KASASHIMA, Y. The japanese experience with tendonitis in racehorses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.13, n. 2, p. 41-56, 2002.

OLIVEIRA, P. G. G. **Implante autólogo de células mononucleares provenientes de medula óssea no tratamento de tendinites induzidas experimentalmente em eqüinos: avaliação a longo prazo – 120 dias.** 2008. 127 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

PALMER, S. E.; GENOVESE, R.; LONGO, K. L.; GOODMAN, N.; DYSON, S. Practical management of superficial digital flexor tendinitis in the performance horse. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 10, n. 2, p. 425-481, 1994.

PARRY, D. A. D.; CRAIG, A. S.; BARNES, G. R. G. Tendon and ligament from the horse: an ultrastructural study of collagen fibrils and elastic fibrils as a function of age. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 203, p. 293-303, 1978.

PARTRIDGE, C. J. Evaluation of the efficacy of ultrasound. **Physiotherapy**, v. 73, p. 166-168, 1987.

PATTERSON-KANE, J. C.; FIRTH, E. X.; GOODSHIP, A. E.; PARRY, D. A. D. Age-related differences in collagen crimp patterns in the superficial digital flexor tendon core region of untrained horses. **Australian Veterinary Journal**, v. 75, p. 39-44, 1997.

PATTERSON-KANE, J. C.; WILSON, A. M.; FIRTH, E. C.; PARRY, D. A. D.; GOODSHIP, A. E. Exercise-related alterations in crimp morphology in the central regions of superficial digital flexor tendons from young Thoroughbreds: a controlled study. **Equine Veterinary Journal**, v. 30, n. 1, p. 61-64, 1998.

POOL, R. R. Pathologic changes in tendinitis of athletics horses. IN: DUBAI INTERNATIONAL EQUINE SYMPOSIUM, 1996, Dubai. **Proceedings...** [Dubai]: Mathews R. Rantanen Design, 1996. p. 109-117.

POOL, R. R. Pathology of tendons and ligaments. **Equine Veterinary Science**, n. 22, p. 145-148, 1992.

POOL, R. R.; WHEAT, J. D.; FERRARO, G. L. Corticosteroid therapy in common joint and tendon injuries in the horse. Parte II. Effects on tendons. . In: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 26., 1980, Anaheim. **Proceedings...** Anaheim: AAEP, 1980. p. 407-410.

PORTER, M. Therapeutic lasers. **Equine Veterinary Science**, v. 12, p. 49-56, 1992.

PORTER, M. Therapeutic Ultrasound. **Equine Veterinary Science**, v. 11, n. 4, p. 243-245, 1991a.

PORTER, M. Therapeutic Ultrasound. **Equine Veterinary Science**, v. 11, n. 5, p. 294-299, 1991b.

PORTER, M. Therapeutic Ultrasound. **Equine Veterinary Science**, v. 11, n. 6, p. 357-362, 1991c.

PORTER, M. Therapeutic Ultrasound. In: PORTER, M.; TURNER, T. A. **The new equine sports therapy**. Lexington: The blood-horse, 1998. p. 125-152.

POSTKETHWAITE, A. E.; KESKI-OJA, J.; MOSES, H. L.; KANG, A. H. Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by transforming growth factor β . **Journal of Experimental Medicine**, v. 165, p. 251-256, 1987.

PROSPERI, E. Multiple roles of the proliferating cell nuclear antigen: DNA replication, repair and cel cycle control. **Progress in Cell Cycle Research**, v. 3, p. 193-210, 1997.

RAMIREZ, A.; SHWANE, J. A.; MCFARLAND, C. The effect of ultrasound on collagen synthesis and fibroblast proliferation in vitro. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 29, p. 326-332, 1997.

RANTANEN, N. W. Principles of magnetic resonance, computed tomographic, ultrasonographic and scintigraphic imaging of the soft tissues of horses. In: DUBAI INTERNATIONAL EQUINE SYMPOSIUM, 1996, Dubai. **Proceedings...** [Dubai]: Mathews R. Rantanen Design, 1996. p. 155-175.

RANTANEN, N. W. The use of diagnostic ultrasound in limb disorders of the horse: a preliminary report. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 2, p. 62-64, 1982.

RANTANEN, N. W.; JORSENSEN, J. S.; GENOVESE, R. L. Ultrasonographic evaluation of the equine limb: technique. In: ROSS, M. W.; DYSON, S. J. **Diagnosis and management of lameness in the horse**. Missouri: Saunders, 2003. p. 166-188.

RASHMIR-RAVEN, A. M.; COYNE, C. P.; FENDWICK, B. W.; GAUGHAN, E. M.; ANDREWS, G. A.; DEBOWES, R. M. Inhibition of complement activity by polysulphated glycosaminoglycans. **American Journal of Veterinary Research**, v. 53, p. 90-93, 1992.

REEF, V. B. **Equine diagnostic ultrasound**. Philadelphia: Saunders, 1998. 560 p

REEF, V. B.; MARTIN, B. B.; STEBBINS, K. Comparison of ultrasonographic, gross, and histologic appearance of tendon injuries in performance horses. In: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 35., 1989, San Diego. **Proceedings...** Lexington: AAEP, 1989. p. 279.

REHER, P.; ELBESHIR, E-N. I.; HARVEY, W.; MEGHJI, S.; HARRIS, M. The stimulation of bone formation in vitro by therapeutic ultrasound. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 23, n. 8, p. 1251-1258, 1997.

ROBERTS, M.; RUTHERFORD, J. H.; HARRIS, D. The effect of ultrasound on flexor tendon repairs in the rabbit. **The Hand**, v. 14; p. 17-10, 1982.

ROBERTSON, V. J.; BAKER, K. G. A review of therapeutic ultrasound: effectiveness studies. **Physical Therapy**, v. 81, n. 7, p.1339-1350, 2001.

ROBINSON, S. E.; BUONO, M. J. Effect of continuous-wave ultrasound on blood flow in skeletal muscle. **Physical Therapy**, v. 75, n. 2, p. 145-150, 1995.

SACHS, F. Mechanical transduction by membrane ion channels: a mini review. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 104, p. 57-60, 1991.

SACHS, F. Mechanical transduction in biological systems CRC. **Critical Reviews in Biomedical Engineering**, v. 16, p. 141-169, 1988.

SANTOS, J. A. P. M. **Análise da birrefringência intrínseca do colágeno em tendões de eqüinos submetidos a tendinite**. 2004. 42 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

SCIORE P.; BOYKIW, R.; HART, D. A. Semi-quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction analysis of mRNA for growth factors and growth factor receptors from normal and healing rabbit medial collateral ligament tissue. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 16, p. 429-437, 1998.

SCOTT, J. E. Proteoglycan-collagen interactions. **Ciba Foundation Symposium**, v. 124, p. 104-124, 1986.

SCOTT, A.; COOK, J. L.; HART, D. A.; WALKER, D. C.; DURONIO, V.; KHAN, K. M. Tenocyte responses to mechanical loading in vivo: a role for local insulin-like growth factor 1 signaling in early tendinosis in rats. **Arthritis & Rheumatism**, v. 56, n. 3, p. 871-881, 2007.

SILVER, I. A.; BROWN, P. N.; GOODSHIP, A. E.; LANYAON, L. E.; MCCULLAGH, K. P.; PERRU, G. C.; WILLIAMS, I. F. A clinical and experimental study of tendon injury, healing and treatment in the horse. **Equine Veterinary Journal**, v.1, p. 5-22, 1983. Supplement.

SKUTEK, M.; VAN GRIENSVEN, M.; ZEICHEN, J.; BRAUER, N.; BOSH, U. Cyclic mechanical stretching modulates secretion pattern of growth factors in human tendon fibroblasts. **European Journal of Applied Physiology**, v. 86, p. 48-52, 2001.

SMITH, R. K. W. A case of superficial digital flexor tendonitis: ultrasonographic examination and treatment with intralesional polysulfated glycosaminoglycans. **Equine Veterinary Education**, v. 4, p. 280-285, 1992.

SMITH, R. K. W.; BIRCH, H.; PATTERSON-KANE, J. FIRTH, E. C.; WILLIAMS, L.; CHERDCHUTHAM, W.; VAN WEEREN, W. R.; GOODSHIP, A. E. Should equine athletes commence training during skeletal development?: changes in tendon matrix associated with development, ageing, function and exercise. **Equine Veterinary Journal**, v. 30, p. 201-209, 1999. Supplement.

SMITH, R. K. W.; WEBBON, P. M. The physiology of normal tendon and ligament. In: DUBAI INTERNATIONAL EQUINE SYMPOSIUM, 1996, Dubai. **Proceedings...** [Dubai]: Mathews R. Rantanen Design, 1996. p. 55-81.

SMITH, R. K. W.; WILLIAMS, L.; CAUVIN, E.; MAY, S. A. TGF β -1 stimulates cartilage oligomeric matrix protein (COMP) synthesis by tenocytes in vitro – a hypothesis for tendon failure. In: AMERICAN COLLEGE OF VETERINARY SURGEONS SYMPOSIUM, 8., 1998, Chicago. **Proceedings...** 1998, p. 518.

SPEED, C. A. Therapeutic ultrasound in soft tissues lesions. **Rheumatology**, v. 40, p. 1331-1336, 2001.

SPURLOCK, G. H.; SPURLOCK, S. L.; PARKER, G. A. Evaluation of Hylartin V therapy for induced tendonitis in the horse. **Equine Veterinary Science**, v. 9, n. 5, p. 242-246, 1989.

STASHAK, T. S. **Adams' lameness in horse**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002. 1174 p.

STASHAK, T. S. Emergency evaluation of soft tissue injury. In: DUBAI INTERNATIONAL EQUINE SYMPOSIUM, 1996, Dubai. **Proceedings...** [Dubai]: Mathews R. Rantanen Design, 1996. p. 177-205.

STEISS, J. E. Physical therapy modalities: therapeutic ultrasound and phonophoresis. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 22, p. 690-693, 2000.

TAYLOR, C. Standardization in immunohistochemistry: the role of antigen retrieval in molecular morphology. **Biotechnic & Histochem**, v. 81, n. 1, p. 3-12, 2006.

TROTTER, G. W. Polysulfated glycosaminoglycan (Adequan). In: MCILWRAIGHT, C. W.; TROTTER, G. W. **Joint disease in the horse**. Philadelphia: Saunders, 1996. p. 279-280.

TURNER, S. M.; POWELL, E. S.; NG, C. S. S. The effect of ultrasound on the healing of repaired cockerel tendon: is collagen cross-linkage a factor? **The Journal of Hand Surgery**, v. 14b, p.428-433, 1989.

TURNER, T. A. Alternative methods of soft tissue imaging. . In: DUBAI INTERNATIONAL EQUINE SYMPOSIUM, 1996, Dubai. **Proceedings...** [Dubai]: Mathews R. Rantanen Design, 1996. p. 165-176.

VAN SCHIE, H. T. M.; BAKKER, E. M.; JONKER, A. M.; VAN WEEREN, P. R. Efficacy computerized discrimination between structure-related and non-structure-related echoes in ultrasonographic images for the quantitative evaluation of the structural integrity of superficial digital flexor tendons in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 7, p. 1159-1166, 2001.

VIDAL, B. C. Evaluation of the carbohydrate role in the molecular order of collagen bundles: Microphotometric measurements of textural birefringence. **Molecular and Cellular Biology**, v. 32, n. 5, p. 527-535, 1986.

VIDAL, B. C. Matriz extracelular. In: VIDAL B. C.; MELLO, M. L. S. **Biologia celular**. Rio de Janeiro: Livraria Ateneu, 1987a. p. 273-303.

VIDAL, B. C. Métodos em Biologia Celular. In: VIDAL B. C.; MELLO, M. L. S. **Biologia celular**. Rio de Janeiro: Livraria Ateneu, 1987b. p. 5-34.

VIDAL, B. C.; CARVALHO, H. F. Aggregational state on molecular order of tendons as a function of age. **Matrix**, v. 10, p. 48-57, 1990.

VIDAL, B. C.; MELLO, M. L. S.; GODO, C.; CASEIRO, A. C. ABUJADI, J. M. Anisotropic properties of silver plus gold-impregnated collagen bundles: ADB and form birefringence curves. **Annales d'Histochimie**, v. 20, p. 15-25, 1975.

VILARTA, R.; VIDAL, B. C. Anisotropic, and biomechanical properties of tendons as a function modified exercises, and denervation. Aggregation and macromolecular order in collagen bundles. **Matrix**, v. 9, p. 55-56, 1989.

WAHL, S. M.; HUNT, D. A.; WAKEFIELD, L. M.; MCCARTNEY-FRANCIS, N.; WAHL, L. M.; ROBERTS, A. B.; SPORN, M. B. Transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production. **Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, p. 5788-5792, 1987.

WALTER, A. BAPN. **The Horse**, v. 9, p. 31-34, 1996.

WANG, N.; BUTLER, J.; INGBER, D.E. Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. **Science**, v. 260, p. 1124-1127, 1993.

WEBBON, P. M. equine tendon stress injuries. **Equine Veterinary Journal**, v. 5, p. 58-63, 1973.

WEBBON, P. M. A post mortem study of equine digital flexor tendon. **Equine Veterinary Journal**, v. 9, p. 61-67, 1977.

WEN-CHUNG TSAI; CHIH-CHIN HSU; FUK-TAN TANG; SHIH-WEI CHOU; YING-JEN CHEN; JONG-HWEI S. PANG. Ultrasound stimulation of tendon cell proliferation and upregulation of proliferating cell nuclear antigen. **Journal of Orthopaedic Research**, v.23, p. 970-976, 2005.

WEN-CHUNG TSAI; FUK-TAN TANG; WONG, M-K.; YEN, H-C.; PANG, J-H. Decreased expression of proliferating cell nuclear antigen is associated with dexamethasone inhibition of the proliferation of rat tendon fibroblasts. **Journal of Rheumatology**, v. 29, p. 2397-2402, 2002.

WEN-CHUNG TSAI; JONG-HWEI S. PANG; CHIH-CHIN HSU; NGOK-KIU CHU; MIAO-SUI LIN; CHING-FANG HU. Ultrasound stimulation of types I and III collagen expression of tendon cell and upregulation of transforming growth factor β . **Journal of Orthopaedic Research**, v. 24, n. 6, 1310-1316, 2006.

WILLIAMS, I. F.; MCCULLAGH, K. G.; GOODSHIP, A. E.; SILVER, I. A. Studies on the pathogenesis of equine tendonitis following collagenase injury. **Research in Veterinary Science**, v. 36, p. 326-338, 1984.

WILMINK, J; WILSON, A. M.; GOODSHIP, A. E. Functional significance of the morphology and micromechanics of collagen fibers in relation to partial rupture of the superficial digital flexor tendon in racehorses. **Research in Veterinary Science**, v. 53, p. 354-359, 1992.

WILSON, A. M.; GOODSHIP, A. E. Exercise-induced hyperthermia as a possible mechanism for tendon degeneration. **Journal of Biomechanics**, v. 27, n. 7, p. 899-905, 1994.

WILTINK, A.; NIJWEIDE, P. J.; OOSTERBAAN, W. A.; HEKKENBERG, R. T.; HELDERS, P. J. M. Effect of therapeutic ultrasound on endochondral ossification. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 21, n. 1, p. 121-127, 1995.

XIONG, Y.; ZHANG, H.; BEACH, D. D tyoe of cycins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. **Cell**, v. 71, p. 802-809, 1992.

YAMAUCHI, M.; MECHANIC, G. L. Cross-linking of collagen. In: NIMNI, M. E. **Collagen**. Boca Raton: CRC Press, 1988. v. 1, p. 157-172.

YAMAGUCHI, Y.; MANN, D. M.; RUOSLAHTI, E. Negative regulation of transforming growth factor – β by the proteoglycan decorin. **Nature**, v. 346, p. 281-281, 1990.

YEUNG-JEN CHEN; CHING-JEN WANG; KUENDER D. YANG; YUR-REN KUO; HUI-CHEN HUANG; YU-TING HUANG; YI-CHIH SUN; FENG-SHENG WANG. Extracorporeal shock waves promote healing of collagenase-induced Achilles tendinitis and increased TGF- β 1 and IGF-1 expression. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 22, p. 854-861, 2004.

YOSHIKAWA, H.; OISHI, H.; UEKI, H.; MURANAKA, M.; OYAMADA, T.; YOSHIKAWA, T. Distribution of C cells of fractured racehorses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 13, p. 9-17, 2002.

YOSHIKAWA, H.; UEKI, H.; MURANAKA, M.; OYAMADA, T.; YOSHIKAWA, T. Distribution of C cells in thyroids and association with age and sex in racing horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.13, p. 39-45, 2001.

YOUNG, S. R.; DYSON, M. Effect of therapeutic ultrasound on the healing of full-thickness excised skin lesions. **Ultrasonics**, v. 28, p. 175–180, 1990a.

YOUNG, S. R.; DYSON, M. Macrophage responsiveness to therapeutic ultrasound. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 16, n. 8, p. 809-816, 1990b.

YOUNG, S. R.; DYSON, M. The effect of therapeutic ultrasound on angiogenesis. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 16, n. 3, p. 261-269, 1990c.

YOVICH, J. V.; TROTTER, G. W.; MCILWAITH, C. W. Pharmacologic properties of polysulfated glycosaminoglycan (Adecan) and its application to treatment of equine degenerative joint disease. In: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 33., 1987, New Orleans. **Proceedings...** New Orleans: AAEP, 1987. p. 707-713.

ZAPF, J.; SCHMID, C. H.; FROESCH, E. R. Biological and immunological properties of insulin-like growth factors I and II. **Clinics in Endocrinology and Metabolism**, v. 13, p. 3-30, 1984.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. 4th. ed. New Jersey: Prentice Hall, 1999. 938 p.