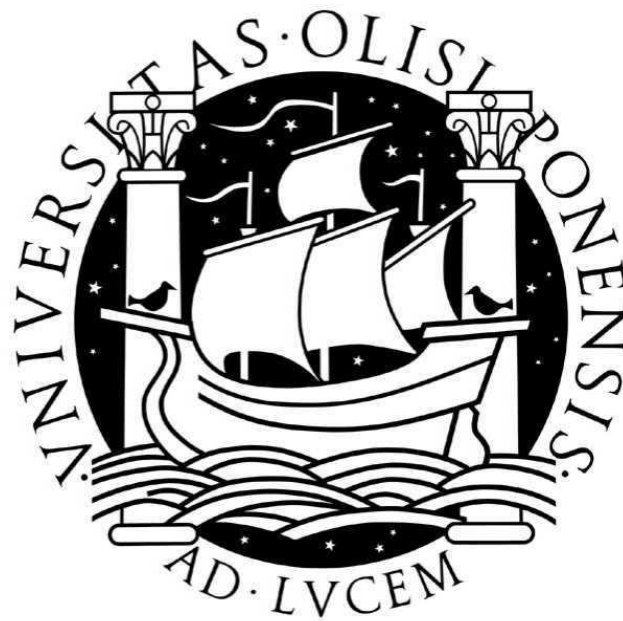


Universidade de Lisboa

Faculdade de Ciências

Departamento de Biologia Animal



**Caracterização funcional, histológica e celular da
longa porção do bicípete em doentes com
tendinopatia**

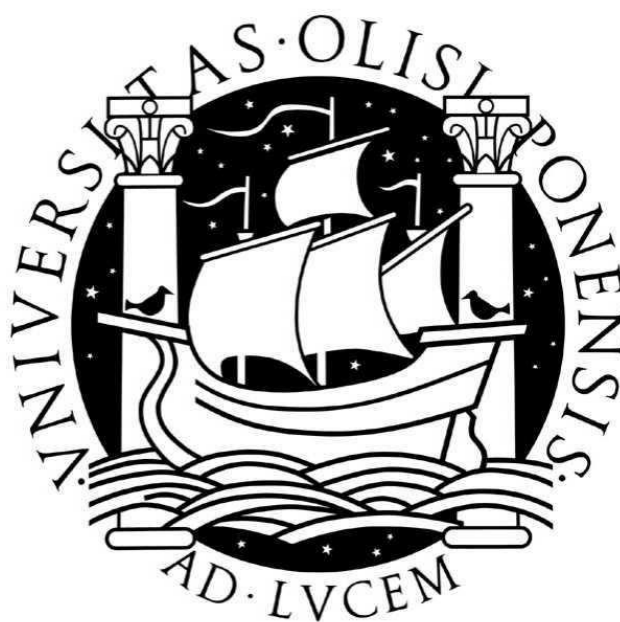
Ana Rita Farinho

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente
2010

Universidade de Lisboa

Faculdade de Ciências

Departamento de Biologia Animal



Tese de Mestrado orientada por
Professora Doutora Helena Canhão - Unidade de Investigação em Reumatologia do
Instituto de Medicina Molecular da Faculdade de Medicina e Serviço de Reumatologia e
doenças ósseas metabólicas do Hospital de Santa Maria
Professora Doutora Gabriela Rodrigues – Departamento de Biologia Animal da
Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

Ana Rita Farinho

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

2010

Agradecimentos

Antes de mais queria agradecer ao Professor João Eurico por me ter recebido como estudante de mestrado nesta unidade e me ter ajudado e disponibilizado sempre para me ajudar.

À minha orientadora, Professora Helena Canhão por me ter aceite também desde o 1º dia e por ter acreditado em mim para este projecto. Pelas ajudas trocadas por emails e telefonemas a qualquer hora...Obrigada!

Um grande Obrigada também à minha orientadora, Professora Gabriela Rodrigues por ser sempre um exemplo de professora para mim e me ter ajudado sempre.

Mil Obrigadas à grande equipa da Unidade! À Joana e à Inês porque sempre foram o meu apoio em todos os passos que dei no laboratório, me terem ajudado com o projecto e principalmente por me terem ensinado tanto! Inês, vais ser sempre minha Veterana! À Ana Maria Rodrigues porque sabe de tendão e por me bater tanto na cabeça: “Tens de saber a clínica”! Bruno porque tu serás sempre o mestre da histologia, obrigada por tudo o que me ensinaste. À Ana muito obrigada por teres aparecido na minha vida e me aturares desde o início, foste sempre o grande apoio. Às grandes Ritinhas... porque são um exemplo de pessoa e grandes profissionais! Obrigada à Diana (por tudo o que ensinaste), à Inês Aleixo e a todos os que me possa ter esquecido...Obrigada à Andreia (Histologia), à Joana Tato por tudo o que me ensinaram e a todos os amigos do IMM que me proporcionaram bons momentos!

A todos os meus amigos, amigos do Alentejo e de escola por me apoiarem mesmo à distância. À Teresa por seres a melhor amiga desde que aprendemos a ler! À Inês porque a amizade se mantém mesmo sem te ver e a todos os amigos da faculdade! Obrigada também a todas as meninas da Resi, Andreia e Karina (porque sempre acreditei que iam ser grandes enfermeiras), à Nina e à Vera (pelas nossas conversas multidisciplinares), à Marina, Lucy e Anita porque são amigas demais! À grande Cris e a todas as meninas que viveram lá bons tempos!

Ao meu grande amor...por me entenderes tão bem, por sermos tão iguais e por me apoiares em tudo! Obrigada por seres tão positivo, orgulho-me de ti!

Obrigada também a toda a minha família (tios, primos) por todo o apoio, às minhas 3 avós (sim sou uma privilegiada), ao meu irmão por sermos tão diferentes e tão iguais!

Aos meus pais por terem sempre acreditado em mim mesmo quando eu não acreditava!
A mãe que sempre me disse “Tu és capaz” e ao meu pai porque só nós nos entendemos... Vocês sempre foram o meu exemplo!

Obrigada por tudo!

“A Ciência não pode resolver o mistério final da natureza. E isto porque, em última análise, somos parte do mistério que tentamos resolver”

Max Plank (Físico)

Lista de Abreviaturas

ADAMTS -*Metalloproteinase with thrombospondin motifs*-
Metaloproteinases com Motivos de Trombospondina

BSA- *Bovine Serum Albumin*-
Albumina de Soro Bovino

B2M- β 2-Microglobulina

cDNA - *complementary Deoxyribonucleic Acid* - Ácido Desoxirribonucleico
Complementar

COLI- Colagénio tipo I

COLIII- Colagénio tipo III

C_T - *Cycle threshold*- Limiar de Ciclo

DAB- Diaminobenzidina

DMEM - *Dulbecco's modified Eagle's Medium*

DMSO- Dimetilsulfóxido

dUTPs- Nucleótidos Trifosfatados

EVA da dor- Escala Visual Analógica da dor

FBS- *Fetal bovine serum*- Soro fetal bovino

HRP- *Horseradish Peroxidase*-
Peroxidase

HSM- Hospital de Santa Maria

IL -*Interleukin* – Interleucina

LPB- Longa porção do bicípete

LPS- Lipopolissacárido de *Escherichia coli*

MMP - *Matrix metalloproteinase* -
Metaloproteinase de matriz

NGF- *Nerve Growth Factor*

TdT- Transferase Terminal
deoxynucleotidil

TIMP- *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*- Inibidores de
Metaloproteinases de Tecido

TNF- *Tumor Necrosis Factor*- Factor de
crescimento tumoral

RENDA- Registo Nacional de Não
Dadores

RPMI- *Roswell Park Memorial Institute medium*

TGF- β 1- *Transforming Growth Factor beta 1*

TNC- Tenascina C

VEGF- *Vascular Endothelial Growth Factor* - Factor de Crescimento
Endotelial Vascular

SPSS- *Statistical Package for the Social Sciences*

Índice

Agradecimentos	1
Índice	4
1. Resumo	6
2. Abstract	7
3. Introdução	8
4. Material e métodos	13
4.1. População de estudo	13
4.2. Processamento das amostras	13
4.4. Preparação das amostras para cortes histológicos	15
4.4.1. Colorações histológicas	15
4.4.2. Imunohistoquímica	16
4.5. Apoptose	17
4.6. Cultura primária de células de tendão	17
4.7. Expressão génica	19
4.7.1. Extracção de RNA	19
4.7.2. Síntese de cDNA	19
4.8. Análise estatística	22
5. Resultados	23
5.1. Características da população em estudo	23
5.2. Caracterização macroscópica do tendão	23
5.3. Microscopia electrónica de varrimento do tendão	24
5.4. Avaliação microscópica da LPB	25
5.4.1. Análise histológica do tecido	25
5.4.2. Substância P	29
5.4.3. Morte celular programada	30
5.5. Análise da expressão génica	32
5.5.1. Matriz extracelular	32
5.5.2. VEGF e NGF	35
5.5.3. Citocinas	37
6. Discussão	40
7. Bibliografia	45

Anexos	48
Anexo A.1 Protocolo Clínico	48
Anexo A.2 Coloração Hematoxilina-Eosina	50
Anexo A.3 Coloração Wright Giemsa	51
Anexo A.4 Concentração RNA	52

1. Resumo

A longa porção do bicípete (LPB) surge muitas vezes afectada nas situações em que há patologia dos tendões da coifa dos rotadores. Actualmente, a tenotomia da LPB é prática comum nestes casos observando-se melhoria da dor e de função articular. Este trabalho teve como objectivo caracterizar a matriz extracelular da LPB em doentes com tendinopatia e a expressão génica de células do tendão *in vitro*. Foram colhidas amostras de 10 doentes com patologia degenerativa do ombro, 5 doentes com patologia traumática e 8 indivíduos saudáveis. A matriz extracelular foi estudada através de colorações histológicas e marcação para a substância P, tanto na extremidade proximal como distal do tecido. Por outro lado, foi estudada a expressão génica de proteínas essenciais ao metabolismo das células do tendão e testado o efeito de um corticóide.

Neste trabalho observou-se que a matriz extracelular do tendão dos doentes com patologia degenerativa evidencia menor organização da matriz, quer através de estudos histológicos quer pelos baixos níveis de expressão génica dos colagénios tipo I e III, tenascina C, entre outros. O estímulo com TGF- β 1 induziu alterações na expressão dos colagénios. Por outro lado o efeito da dexametasona foi nulo. Nos doentes com patologia traumática foi ainda observado um aumento de celularidade e vasos sanguíneos, o que está em concordância com os níveis de expressão de VEGF.

Como comentário final, podemos dizer que não foram detectadas diferenças nas extremidades proximal e distal do tecido. Além disso, e ao contrário do que se poderia esperar, a dexametasona não altera a expressão génica mas o estímulo com TGF- β 1 estimula a remodelação de matriz. Este trabalho foi pioneiro na caracterização da longa porção do bicípete em doentes com tendinopatia e pode ser assim utilizado como base para estudos futuros.

Palavras-Chave: Longa porção do bicípete, tendinopatia, matriz extracelular, tenócitos, tenoblastos

2. Abstract

The long head of biceps (LHB) can be affected in cases of rotator cuff pathology. In fact, tenotomy of the LHB is a standard procedure in shoulder surgery and leads to significant pain release and improvement of joint mobility. The aim of this project was to characterize extracellular LHB matrix in tendinopathy patients and to assess tendon cells gene expression. LHB samples from 10 patients with degenerative process and 5 patients with a traumatic event were collected. Histological staining allowed the study of the matrix organization and composition. The P substance was accessed by immunohistochemistry in both proximal and distal portions of the tissue. Additionally the tendon cells metabolism was assessed by gene expression.

The histological studies, together with the low levels of collagen type I, III and tenascin C gene expression, indicate that patients with degenerative disease have a more disorganized extracellular matrix than the others groups. However, TGF- β 1 stimulation induced an increase on the levels of collagen type I and III expression in patients with degenerative disease. On the other hand, dexamethasone did not change gene expression levels. The group of patients with traumatic event showed an increase in cell and blood vessels number, which is in accordance with higher expression of VEGF.

Taken together, these results have shown that there were no differences between the proximal and distal parts of the tissue. Moreover, as opposed to the clinical findings, dexamethasone did not produce any effect, but TGF- β 1 stimulated an increase in the expression of matrix remodeling genes. This work was pioneer in the study of LHB in patients with tendinopathy, which will allow future studies to develop new and more efficient therapeutics.

Key-Words: The long head of biceps, tendinopathy, extracellular matrix, tenocytes, tenoblasts

3. Introdução

O tendão é um tecido constituído por células (tenoblastos e tenócitos) e por tecido conjuntivo denso que confere resistência ao tecido. A matriz que o compõe é formada essencialmente por colagénio tipo I, sendo o colagénio tipo III o segundo tipo mais frequente, mas também por proteoglicanos e proteínas não-colagénicas [1]. Os proteoglicanos e glicoproteínas são essenciais para garantir a ligação entre as fibras de colagénio e manter a estrutura da matriz. A tenascina C é uma glicoproteína que se encontra apenas nas zonas de inserção do tendão com o osso e o músculo e tem um papel importante no alinhamento e orientação das fibras de colagénio [2].

Estruturalmente as moléculas de colagénio tipo I organizam-se em níveis crescentes de complexidade começando pela fibrilha que é composta por moléculas de tropocolagénio que se entrecruzam. Por sua vez, as fibrilhas alinham-se constituindo as fibras de colagénio que se agregam em feixes de fibras rodeados por uma bainha denominada de endotendão (figura 3.2) [2].

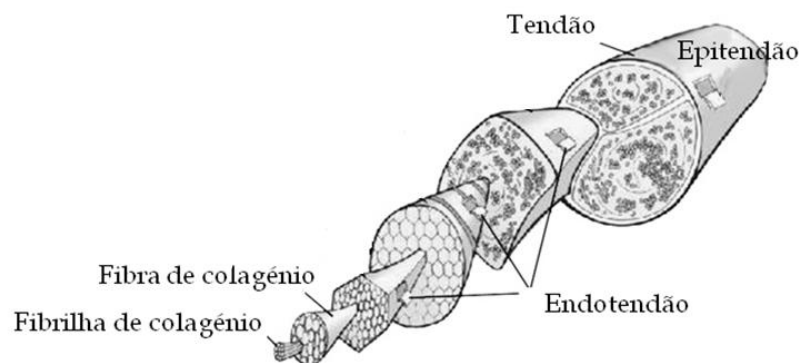


Figura 3.2. Estrutura do tendão mostrando os níveis de organização do colagénio I (adaptado de [2]).

Tanto o endotendão como o epitendão (membrana que envolve o tendão) possuem vasos sanguíneos e linfáticos e fibras nervosas [1]. As fibras nervosas distribuem-se maioritariamente na superfície do tendão e, enquanto as terminações nervosas das fibras mielinizadas actuam como mecanorreceptores detectando alterações na pressão, as não mielinizadas actuam como receptores de dor. Apesar do tendão ser uma estrutura

vascularizada, com a idade e com a carga mecânica observa-se diminuição do fluxo sanguíneo [2].

As células do tendão, tenoblastos e tenócitos, encontram-se distribuídas por entre as fibras de colagénio e são importantes para a manutenção da matriz extracelular [3]. Os tenoblastos são células relativamente redondas, com núcleo oval e, sendo metabolicamente activas, possuem muitos organelos citoplasmáticos [4,5]. Os tenócitos são a forma diferenciada dos tenoblastos, encontram-se distribuídos em filas paralelas acompanhando as fibras de colagénio e apresentam uma morfologia alongada, típica de fibroblasto [3,6]. Os tenócitos são primariamente responsáveis pela manutenção da matriz extracelular através da produção de tropocolagénio, proteoglicanos e glicosaminoglicanos [7]. Tanto a arquitectura colagénica da matriz como a taxa de polimerização são fortemente influenciados pela sua composição bioquímica. Desta forma, os tenoblastos controlam a natureza da matriz através da síntese e degradação dos seus componentes [8]. A actividade dos tenócitos é estimulada por vários factores. O IGF-I aumenta a síntese de colagénio tipo I e a proliferação dos tenócitos, tendo sido sugerido como possível terapêutica para a tendinite [9]. O TGF- β induz a síntese de colagénio I e proliferação das células do tendão sendo esta reacção sugerida como factor contributivo para a tendinopatia crónica. Contudo, foi observado que o TGF- β 1 está ausente da tendinopatia do tendão de Aquiles [10]. O TNF está também envolvido no metabolismo do tecido promovendo a síntese de colagénio e diminuição na síntese de metaloproteinases (MMPs, *matrix metalloproteinases*) em tenócitos de cavalo [11]. Por outro lado, esta citocina pode ainda potenciar a morte celular programada através da activação da via de sinalização da caspase-8. Corroborando esta observação, foi observado o aumento do número de células apoptóticas no tendão supraespinhoso com tendinopatia [12,13].

Os tenócitos e tenoblastos apresentam diferentes capacidades de remodelação do tecido [14] [3]. A remodelação ocorre de forma lenta e é mediada por MMPs, desintegrinas e metaloproteinases com motivos de trombospondina (ADAMTS, *a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*). A acção das MMPs pode ser bloqueada por inibidores de metaloproteinases de tecido (TIMP, *tissue inhibitors of metalloproteinases*), atingindo-se um equilíbrio entre a actividade das enzimas de degradação da matriz e os seus inibidores. Quando ocorre uma falha na

regulação da remodelação da matriz do tendão pode surgir uma situação patológica [15].

A tendinopatia é uma patologia que afecta o tendão e engloba duas situações: a tendinite e a tendinose. A tendinite é originada por inflamação do tecido e a tendinose é caracterizada por degeneração, ocorrendo por vezes como consequência da tendinite. O processo de regeneração e reparação do tendão envolve várias etapas [16] começando com uma fase inflamatória com invasão do tecido por monócitos e neutrófilos e cujos principais intervenientes são o factor de necrose tumoral (TNF, *tumor necrosis factor*), a interleucina 1 (IL-1) e a IL-6. Nesta fase ocorre também proliferação de tenócitos. Factores como o *transforming growth factor beta 1* (TGF- β 1) e o factor de crescimento endotelial vascular (VEGF, *vascular endothelial growth factor*) aumentam, induzindo angiogénese. Na fase seguinte, ocorre aumento da síntese dos componentes da matriz extracelular. Apenas 6 a 8 semanas após a lesão do tecido o número de células diminui bem como a síntese de colagénios; nesta fase as fibras organizam-se longitudinalmente ao longo do eixo do tendão recuperando a estrutura perdida [2,16,17].

Em tendinopatia com falha no processo de regeneração do tecido foram descritas alterações a nível dos componentes da matriz e expressão génica [1,5,18]. No tendão de Aquiles humano com alterações patológicas observa-se aumento da expressão de colagénios tipo I e III, bem como dos vários tipos de proteoglicanos e glicoproteínas, como a fibronectina e a tenascina C, o que é consistente com o processo de regeneração [5,14]. Foi observado ainda que a MMP-1 está aumentada, assim como a MMP-2 e o VEGF [2,14]. Em cortes histológicos do mesmo tendão observou-se também desorganização das fibras de colagénio e de proteoglicanos e maior número de tenoblastos na zona da rotura [14,16]. Foi ainda descrito um aumento de vascularização e do número de terminações nervosas [4]. As tendinopatias são a principal causa de queixas no ombro provocando dor e a perda de função [19].

O ombro é uma estrutura complexa composta por osso (cabeça do úmero e glenóide) e partes moles (cápsula, ligamentos, tendões e músculos) que têm uma íntima relação entre si. A coifa dos rotadores é composta por um conjunto de tendões e músculos (supra-espinhoso, infra-espinhoso, pequeno redondo e infra-escapular) que estabiliza a articulação gleno-umeral e é fundamental para os movimentos do ombro.

O tendão do bicípete braquial é constituído na sua origem por duas partes: a longa porção do bicípete (LPB) que se insere no tubérculo supra-glenoideu (figura 3.1), na

parte superior do ombro e a curta porção, cuja inserção é feita na apófise coracóide. Não está directamente ligado à coifa dos rotadores mas reage às alterações que ocorrem neste grupo de tendões. O tendão da longa porção contribui para movimentos como a flexão do cotovelo e supinação do antebraço.

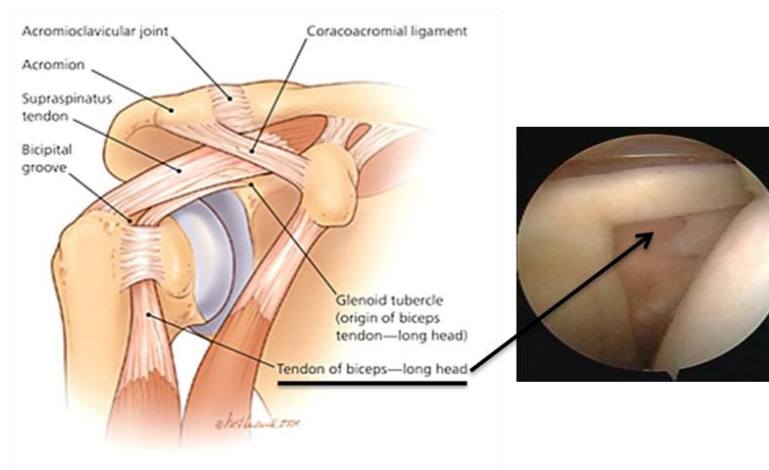


Figura 3.1. Anatomia do ombro e localização da longa porção do bicípete [20] numa artroscopia da LPB num indivíduo sem patologia.

Recentemente, foi descrito que num grupo de 68 doentes com rotura maciça da coifa dos rotadores ocorre melhoria da função articular e diminuição da dor após tenotomia da LPB (78% dos doentes sujeitos a cirurgia) [21]. Desta forma, os autores sugeriram que a LPB está envolvida podendo ser responsável pela dor no ombro. Desde então, várias hipóteses têm sido colocadas para explicar a etiologia e patogénese da dor crónica associada às tendinopatias, focando-se principalmente em duas causas, o excesso de uso e a carga, que provocam pequenas roturas[4]. Um dos tratamentos mais utilizados até ao momento é a infiltração de corticóide na bainha do tendão mas nos últimos anos a sua eficácia e segurança têm sido discutidas. Esta terapêutica tem acção anti-inflamatória e de redução da angiogénese [19] e provoca diminuição da produção de colagénio tipo I *in vitro* [22]. Contudo, desconhecem-se ainda as alterações a nível celular em tenócitos de doentes com patologia do tendão [22].

A LPB apresenta uma rede de fibras nervosas sensoriais com predominância na zona proximal [23]. Vários autores têm sugerido que o sistema nervoso e o sistema inflamatório comunicam entre si através da estimulação dos receptores da dor por citocinas pró-inflamatórias como o TNF, IL-1 ou a IL-6, causando a chamada

“inflamação neurogénica” [24]. Os receptores da dor, por sua vez, libertam neuropeptídeos como a substância P, que são considerados marcadores da patologia uma vez que se encontram aumentados nas terminações nervosas de tecidos inflamados. Além de estarem associados à dor, os neuropeptídeos presentes nos nervos sensoriais mielinizados e não mielinizados são responsáveis pela vasodilatação e extravasão de proteínas do plasma [25].

A etiologia multifactorial da dor na patologia degenerativa do ombro dificulta a compreensão do grau de envolvimento da LPB. No entanto, a melhoria clínica após a tenotomia da extremidade proximal da LPB em doentes com alterações degenerativas ou inflamatórias da coifa dos rotadores tem despertado a atenção para o seu estudo [21,26].

Este trabalho tem por objectivo caracterizar a longa porção do bicípete em doentes com patologia degenerativa e traumática da coifa dos rotadores a nível da composição e organização da matriz extracelular e da produção de neuropeptídeos mediadores de dor. Mais ainda, foi estudado *in vitro* o efeito da terapêutica com corticóide nas células do tendão.

4. Material e métodos

4.1. População de estudo

Foram recrutados para este estudo todos os doentes do serviço de Ortopedia do Hospital de Santa Maria (HSM) que cumpriam os critérios de diagnóstico para patologia da coifa quer de etiologia degenerativa, quer traumática (por fractura proximal do úmero), com indicação cirúrgica e com indicação para tenotomia da LPB. Aos doentes foi aplicado um questionário com dados demográficos e clínicos como o grau de dor e a função do ombro através do *Score de Constant* (Anexo A.1), recomendado pela Sociedade Europeia de Cirurgia do Ombro e Cotovelo [27].

Todos os doentes incluídos neste estudo assinaram um consentimento informado permitindo o uso de amostras biológicas em investigação. Este estudo foi conduzido de acordo com as boas práticas clínicas segundo a Declaração de Helsínquia e aprovado pela Comissão de Ética do Hospital de Santa Maria.

Para controlo, foram colhidas amostras de LPB sem sinal macroscópico de alterações de dois grupos de cadáveres, um com idade semelhante ao grupo de doentes (idade superior a 45 anos) e outro com idade mais jovem (entre 10 e 45 anos) sendo que este foi apenas utilizado na comparação de algumas características com o grupo controlo de idade superior. As amostras foram colhidas num período *post mortem* inferior a 48h e foram tratadas de igual forma que as amostras colhidas de doentes. O estudo com amostras de cadáveres foi aceite e aprovado pelo Instituto de Medicina Legal; foi ainda confirmado que os indivíduos não constavam no Registo Nacional de Não Dadores (RENDA).

4.2. Processamento das amostras

Imediatamente após colheita as amostras de tendão foram acondicionadas numa solução salina e depois processadas no laboratório. Como primeira abordagem foi efectuada uma breve descrição macroscópica do tecido com base na cor e textura.

As zonas proximal e distal foram separadas e incluídas em parafina para estudos de histologia (secção 4.4) e imunohistoquímica (secção 4.5). Colocaram-se ainda fragmentos da amostra em cultura (secção 4.6) para análise de expressão génica (secção

4.7) e a parte central da amostra foi congelada a -80°C para posterior aquisição de imagens de microscopia electrónica de varrimento (secção 4.3). Na figura 4.1 podemos observar o esquema de divisão da amostra de tendão.

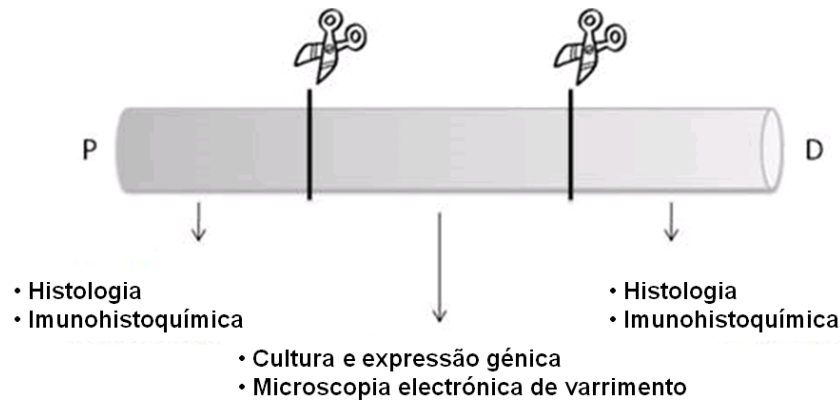


Figura 4.1. Esquema da divisão da amostra de tendão para as várias técnicas (P=Proximal, D=Distal).

4.3. Microscopia electrónica de varrimento

A microscopia electrónica de varrimento permite-nos estudar a topologia do tecido ao nível da orientação das fibras de colagénio. Para a aquisição de imagens é necessário que as amostras biológicas sejam cobertas por um material condutivo, sendo o ouro o mais utilizado. Deste modo, ocorre interacção do feixe de electrões com a superfície da amostra produzindo imagens da topografia do tecido. Este procedimento foi realizado no aparelho Polaron modelo E 5100 (EUA). A aquisição das imagens foi efectuada num microscópio electrónico de varrimento (Hitachi S2400, Japão), com uma tensão de 25kV. As imagens foram adquiridas com uma ampliação de 200x.

4.4. Preparação das amostras para cortes histológicos

Os fragmentos proximal e distal foram fixados numa solução de formalina 4% (VWR, EUA) durante um período mínimo de 24 horas, à temperatura ambiente. As amostras foram então desidratadas em progressivas concentrações de etanol (70%, 96% e 100%) e seguidamente foram impregnadas em xilol (VWR, EUA) como pré-tratamento para a inclusão em parafina. Finalmente, as amostras foram incluídas em parafina de forma a permitir o corte transversal do tecido. O micrótomo de *Minot* semi-automático (Leica RM 2245, Alemanha) foi utilizado para efectuar os cortes com 5µm de espessura.

4.4.1. Colorações histológicas

Para se proceder às colorações histológicas os cortes foram previamente re-hidratados em concentrações decrescentes de etanol terminado em água. Neste trabalho foram utilizadas duas colorações histológicas: para observar a celularidade da amostra e a organização da matriz extracelular foi utilizada a hematoxilina-eosina e para detectar a presença de infiltrado inflamatório foi utilizada a coloração de Giemsa.

A coloração com hematoxilina-eosina (Anexo A.2) permite-nos uma análise generalizada do tecido. O corante básico hematoxilina marca as estruturas ácidas, como o núcleo, ribossomas e retículo endoplasmático rugoso de roxo. Por outro lado, a eosina é um corante ácido que cora as estruturas básicas de rosa, essencialmente as proteínas presentes no citoplasma celular e a matriz extracelular. Esta coloração permite-nos visualizar as células que constituem o tendão, como tenócitos e tenoblastos, bem como o número de vasos sanguíneos e terminações nervosas. A avaliação de cada um destes parâmetros foi efectuada estabelecendo um critério de contagem de 10 campos no corte com uma ampliação de 400x sendo a área de contagem igual para todas as amostras (8748 µm²). Os cortes foram observados no microscópio óptico Leica DM2500 (Leica, Alemanha).

A coloração Giemsa (Anexo A.3) é um método *standard* para identificação de células sanguíneas permitindo observar a morfologia nuclear. Desta forma os núcleos das células são marcados com coloração azul claro-violeta enquanto o citoplasma cora de violeta. Este método permitiu avaliar a presença ou ausência de infiltrado

inflamatório no tecido por observação no microscópio óptico Leica DM2500 (Leica, Alemanha).

4.4.2. Imunohistoquímica

A técnica de imunohistoquímica permite localizar antígenos numa amostra de tecido, explorando o princípio da ligação específica de anticorpos a antígenos. Para detectar a presença do anticorpo no tecido, este é ligado a uma enzima capaz de converter um substrato num precipitado colorido.

A inervação neuronal foi estudada através da marcação da substância P (Santa Cruz Biotechnology, EUA) por imunohistoquímica. Brevemente, foi removida a parafina dos cortes com xilol e foram hidratados (etanol 100%, 96%, 70%) sendo necessário fazer uma recuperação antigénica do tecido com proteinase K (Sigma, Alemanha) de forma a remover a malha de parafina, colocando os antígenos disponíveis à superfície e quebrando ligações peptídicas promovidas pela fixação em formalina que poderiam impedir a ligação do anticorpo ao antígeno pretendido. A peroxidase endógena foi bloqueada com uma solução de 3% de H₂O₂ (Sigma, Alemanha) em metanol (VWR, EUA) para evitar que peroxidases presentes no tecido reajam com a diaminobenzidina (DAB) originando falsos positivos e, por consequência, marcação inespecífica. O bloqueio das proteínas totais foi feito com uma solução de albumina de soro bovino (BSA) 1% (Fluka, Alemanha). Uma vez que o anticorpo secundário (EnVision system, Dako, Dinamarca) era anti-peroxidase, este reconheceu apenas a peroxidase (HRP, *Horseshoe Radish Peroxidase*) acoplada ao anticorpo primário. Isto traduz-se numa melhor marcação sem *background* no tecido. A cor castanha foi revelada com DAB e o contraste do restante tecido foi feito com hematoxilina. Seguiu-se novamente uma desidratação do tecido em concentrações crescentes de etanol (70%, 96% e 100%), seguidamente os cortes foram colocadas em xilol e como meio de montagem foi usado *entellan* (Merck, Alemanha). As lâminas foram observadas com uma ampliação de 400x no microscópio LeicaDM2500 (Leica, Alemanha).

A marcação da substância P foi analisada utilizando uma escala semi-quantitativa de 0-3 (0=ausência de marcação, 1=pouca marcação, 2=marcação moderada e 3=marcação elevada). Para controlo positivo utilizou-se o mesmo procedimento numa amostra de pele por esta ter bastantes terminações nervosas. Para controlo negativo realizou-se o

procedimento na sua totalidade mas, em substituição do anticorpo primário, colocou-se solução de 1% BSA.

4.5. Apoptose

A apoptose, ou morte celular programada, foi analisada em cortes de tecido em parafina usando o *Apop Tag Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit* (Millipore, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. Este método permite detectar a fragmentação do DNA no núcleo durante o processo de apoptose baseando-se na incorporação de nucleótidos trifosfatados (dUTPs) conjugados com digoxigenina pela enzima transferase terminal *deoxynucleotidil* (TdT) nas extremidades 3'-OH do DNA clivado. Os dUTPs ligados aos fragmentos de DNA são reconhecidos pelo anticorpo secundário anti-digoxigenina conjugado com HRP. A HRP reage com a DAB produzindo um substrato de cor castanho. Deste modo as células que se apresentam de cor castanha quando observadas ao microscópio óptico possuem o DNA fragmentado e estão em apoptose. Para testar a especificidade do método realizaram-se controlos, sendo que no negativo não se colocou os dUTPs e no positivo fez-se um tratamento prévio com DNase. Para análise destas lâminas foi utilizado o critério de 10 campos (descrito na secção 4.4.1) para avaliar o número de células apoptóticas.

4.6. Cultura primária de células de tendão

A cultura de células do tendão permitiu testar o efeito da inflamação nas células de doentes e controlos bem como analisar o efeito da terapêutica corticóide após um estímulo inflamatório.

A partir das amostras de tendão em solução salina foram cortados segmentos de 1mm³. Os explantes de tecido foram cultivados em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM; Invitrogen, Reino Unido) suplementado com 50000 unidades de Penicilina/Estreptomicina (Invitrogen, Reino Unido), 2mM de L-Glutamina (Invitrogen, Reino Unido) e 10% *Fetal Bovine Serum* (FBS; Invitrogen, Reino Unido). As culturas foram mantidas a 37°C, com 5% de CO₂ (figura 4.2) e o meio foi mudado após 7 dias e depois a cada 3-4 dias até as culturas atingirem confluência, altura em que se realizou passagem das células na proporção de 1:3. Quando as culturas atingiram

novamente confluência foram congeladas em azoto líquido em meio *Roswell Park Memorial Institute medium* (RPMI, Invitrogen, Reino Unido) suplementado com 40% de FBS e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma, Alemanha).

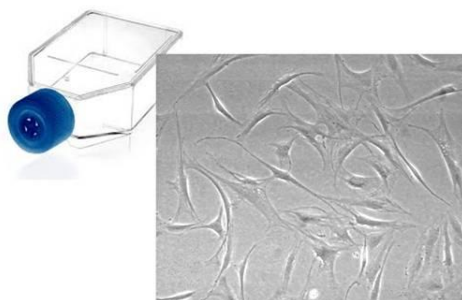


Figura 4.2. Cultura de células a partir de fragmentos de tendão (ampliação 100x).

Antes das experiências as células foram descongeladas e mantidas em cultura nas condições descritas acima até à 2^a-3^a passagem, altura em que foi testado o efeito de duas citocinas pró-inflamatórias: TNF (10ng/ml [28]; Sigma Aldrich, Alemanha) e TGF- β 1 (10ng/ml [29]; R&D, Alemanha) e uma anti-inflamatória: IL-10 (10ng/ml [28]; Immunotools, Alemanha). O LPS (lipopolissacárido de *Escherichia coli* 055:B5; 10ng/ml [30]; Sigma, Alemanha) foi utilizado como controlo positivo à experiência.

Foi ainda analisado o efeito de um tratamento com corticóide após uma situação inflamatória. A dexametasona (0,1 μ M [31]; Sigma, Alemanha) foi o composto utilizado após 48h de estímulo com TNF ou TGF- β 1 (Figura 4.3). As células foram recolhidas para extracção de RNA, lisadas (com tampão de lise proveniente no kit de extracção de RNA, ver secção 4.7.1) e congeladas a -80°C antes da estimulação e após cada estímulo.

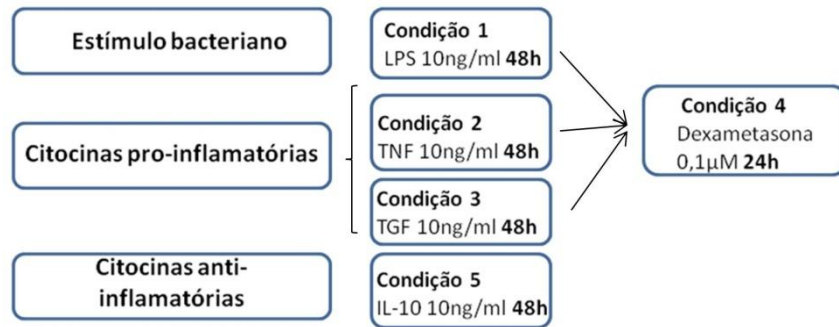


Figura 4.3. Diagrama do esquema de estímulos utilizado na cultura de células isoladas do tendão.

4.7. Expressão génica

4.7.1. Extração de RNA

Para extração de RNA foi utilizado o *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Alemanha) de acordo com as indicações do fabricante. Brevemente, as células foram lisadas e homogeneizadas. De seguida, para criar condições de ligação do RNA à membrana de sílica da coluna, foi adicionado etanol. Para evitar contaminações com DNA genómico foi efectuado tratamento com DNase I e os resíduos celulares foram removidos através de diversas lavagens sendo o RNA eluído em água livre de RNases. A concentração e qualidade do RNA foi determinada espectrofotometricamente utilizando o *Nanodrop* (Agilent Technologies, EUA).

4.7.2. Síntese de cDNA

Para síntese de ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA) foi utilizado o *DyNAmo cDNA Synthesis kit* (Finnzymes, Finlândia) partindo-se de uma concentração de 2ng/µl de RNA e utilizando-se *random hexamers*. A reacção foi efectuada no *Piko Thermal Cycler* (Finnzymes, Finlândia) segundo as condições recomendadas pelo fabricante: 30 minutos a 37°C e 5 minutos a 85°C.

4.7.3. PCR quantitativo em tempo real

A eficiência do PCR quantitativo em tempo real foi controlada através de curvas-padrão para cada par de *primers* (Tabela 4.1).

Os genes de proteínas de matriz sintetizadas pelos tenócitos/tenoblastos (colagénio tipos I e III, COLI e COLIII e tenascina C, TNC), de proteínas envolvidas na inflamação neurogénica (*nerve growth factor*, NGF e VEGF), de citocinas pró-inflamatórias (TNF e IL-1 β) e de um gene endógeno (β 2-microglobulina, B2M) foram analisados no *Rotor Gene 6000* (Corbett Research, Reino Unido).

Tabela 4.1. Sequências e condições dos primers utilizados

Gene		Sequência	Ta	Transcripto
COLI	Fw	gggattccctggacctaag	60°C	63pb
	Rv	ggaacacctcgctctcca		
COLIII	Fw	ctggaccccagggtcttc	60°C	75pb
	Rv	catctgatccagggttcca		
TNC	Fw	cggggctatagaacaccagt	60°C	75pb
	Rv	aacatttaagttccaatttcaggtt		
VEGF	Fw	agtgtgtgccactgagga	60°C	60pb
	Rv	ggtgaggtttgatccgcata		
NGF	Fw	tccggaccaataacagttt	60°C	75pb
	Rv	ggacattacgctatgcacctc		
IL-1	Fw	tacctgtcctgcgtgttgaa	60°C	76pb
	Rv	tctttggtaatttttgggatct		
TNF	Fw	cagcctcttctctgat	60°C	123pb
	Rv	gccagagggctgattagaga		
B2M	Fw	ctatccagcgtactcaaagattc	60°C	176pb
	Rv	cttctgaaagacaagtctgaatg		

Fw – primer forward; Rv – primer reverse; Ta – Temperatura de *annealing*; pb – pares de base; COLI – Colagénio tipo I; COLIII – Colagénio tipo III; TNC – Tenascina C; VEGF – *Vascular endothelial growth factor*; NGF – *Nerve growth factor*; IL-1 – *Interleukin 1*; TNF – *Tumor necrosis factor*; B2M – β 2-microglobulina.

Os *primers* para os genes alvo e para o gene endógeno foram desenhados recorrendo ao software Profinder (<http://qpcr.profinder.com>, Roche, Switzerland) e com ligação em exões diferentes de modo a evitar amplificação com DNA genómico. As reacções foram preparadas a partir de uma concentração de 2ng/ μ l de cDNA de cada amostra e utilizando *DyNAmo Flash SYBR green qPCR kit* (Finnzymes, Finland) de acordo com as instruções do fabricante (2 minutos a 50°C e 7 minutos a 95°C, seguindo-se depois uma desnaturação durante 10 segundos a 95°C e uma extensão a 60°C durante 10 segundos). As reacções foram validadas então pela presença de apenas um pico na curva de *melting* (figura 4.4).

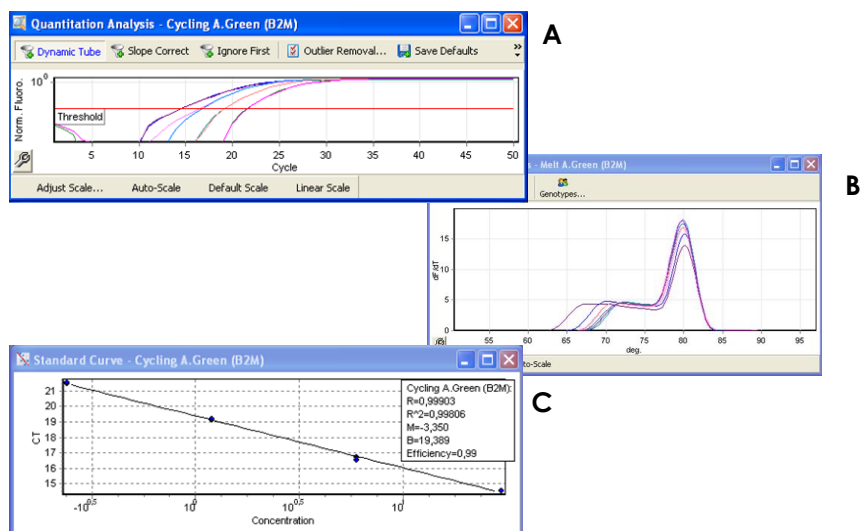


Figura 4.4. Curva de amplificação (A), de melting (B) e curva-padrão (C) para o gene endógeno $\beta 2$ -microglobulina.

Os resultados foram analisados recorrendo ao método da curva padrão (tabela 4.2). O valor de limiar de ciclo (*cycle threshold*, C_T) é definido como o número de ciclos necessários para que o sinal de fluorescência ultrapasse o valor de C_T e exceda o nível basal. A eficiência do PCR deve ser de 100%, o que significa que a cada ciclo a quantidade de produto duplica. Uma eficiência de reacção de 90-100%, corresponde a um declive entre -3.58 e -3.10. A conversão do valor de C_T em valores de expressão relativa foi feita com os valores de declive e de Y provenientes da curva *standard* e aplicada à equação $10^{(Y \text{ intersect}-C_T/\text{slope})}$ [32,33]. Os valores obtidos foram então normalizados com o gene endógeno B2M.

Tabela 4.2. Características das rectas-padrão de cada gene em estudo e do gene endógeno

Gene	Threshold	Eficiência	R²	Declive	Intersecção Y
COL I	0,01	1,01	0,99340	-3,309	11,934
COL III	0,08	1,00	0,999	-3,316	18,915
TNC	0,06	1,00	0,999	-3,332	18,692
VEGF	0,099	0,98	0,995	-3,381	23,814
NGF	0,07	0,99	0,998	-3,346	22,650
TNF	0,099	1,00	0,927	-3,312	31,548
IL-1	0,09	1,01	0,994	-3,295	26,610
B2M	0,046	0,99	0,998	-3,350	19,389

4.8. Análise estatística

Os doentes foram estratificados em grupos de acordo com o tipo de patologia que apresentavam e comparados entre si e com um grupo controlo. Para variáveis categóricas, foi aplicado o teste do qui-quadrado. Porque as variáveis contínuas apresentavam desvio significativo da normalidade (de acordo com o teste Shapiro-Wilk) foram utilizados dois tipos de testes, o teste Mann-Whitney e o teste Kruskal-Wallis H com comparações múltiplas de *Dunns* (Resultados, secção 5.5). Quando apropriado as variáveis foram correlacionadas entre si utilizando o coeficiente de correlação de *Spearman*. Para valores de *p* inferiores a 0,05 consideraram-se resultados estatisticamente significativos.

A análise estatística foi feita recorrendo ao Statistical Package for the Social Sciences (SPSS; versão 17.0, Chicago).

5. Resultados

5.1. Características da população em estudo

Foram incluídos neste estudo 15 doentes submetidos a cirurgia por patologia da coifa da longa porção do bicípete: 10 com patologia degenerativa e 5 com patologia traumática (fractura proximal do úmero). Como grupo controlo foram colhidas amostras de 6 cadáveres.

Os doentes foram questionados acerca da função do ombro afectado e do grau de dor, tendo sido observado maior perda de função (*score de constant*) no grupo dos doentes com patologia degenerativa, mas maior grau de dor (escala visual analógica da dor, EVA da dor) no grupo com patologia traumática (tabela 5.1). Dos doentes com patologia degenerativa 33% realizaram pelo menos uma infiltração com corticóide.

Tabela 5.1. Características da população estudo

Grupo	N	Idade (anos)	Sexo Masculino	EVA dor (mm)	Score Constant ombro afectado
Controlo	6	59±16	100%	NA	NA
Traumático	5	69±12	20%	75±17	32,0±29,24
Degenerativo	10	62±5	50%	54±29	44,0±16,49
<i>p-value</i>		0,747	0,023*	0,191	0,361

Os valores representam média ± desvio padrão. EVA – escala visual analógica; NA - não aplicável.

5.2. Caracterização macroscópica do tendão

Antes do processamento todas as amostras (figura 5.1) foram observadas macroscopicamente no que respeita à cor e textura do tecido (tabela 5.2).

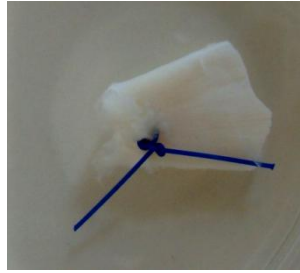


Figura 5.1. Tendão de um doente com patologia degenerativa com marcação na extremidade proximal (linha).

Tabela 5.2. Descrição macroscópica do tecido

	N	Cor	Morfologia	Sinais inflamatórios
Controlo	10	Branco e brilhante	Textura fibroelástica	Ausentes
Traumático	5	Avermelhado	Rígido	Presentes maioritariamente na zona proximal
Degenerativo	6	Branco, amarelado	Fibrilhar e pouco denso	Ausentes

5.3. Microscopia electrónica de varrimento do tendão

Para cada grupo em estudo foram adquiridas imagens da topografia do tecido por microscopia electrónica de varrimento para observação da organização das fibras de colagénio. Embora seja uma análise qualitativa foram observadas diferenças entre os grupos em estudo. As fibras de colagénio das amostras de doentes com patologia degenerativa encontram-se mais desorganizadas e dispostas de uma forma aleatória (figura 5.2.A). A observação do tecido com patologia traumática corresponde a uma situação intermédia de organização de matriz (figura 5.1.B) onde os feixes de colagénio se dispõem de forma mais ordenada. A matriz extracelular do tendão saudável apresenta uma organização paralela das fibras de colagénio estando dispostas longitudinalmente ao longo do eixo da matriz (figura 5.2.C).

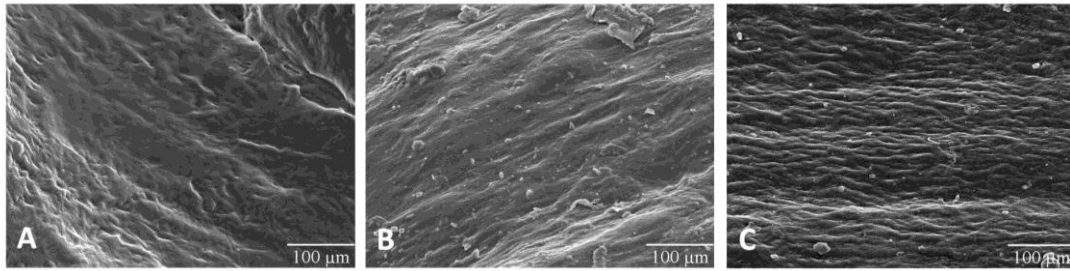


Figura 5.2. Imagens de microscopia electrónica de varrimento de doente com patologia degenerativa (A), traumática (B) e de grupo controlo (C) (ampliação 200x).

Paralelamente à avaliação da organização da matriz entre os doentes e controlos, foi também comparada a disposição das fibras de colagénio em indivíduos saudáveis de idades diferentes. As fibras do tendão do indivíduo com 12 anos de idade (figura 5.3.A) aparecem mais desalinhas comparativamente às fibras do controlo de 48 anos (figura 5.3.B). No entanto, é de notar que o tecido tendinoso do indivíduo mais velho (80 anos de idade) tem um aspecto mais laxo (figura 5.3.C), denotando envelhecimento.

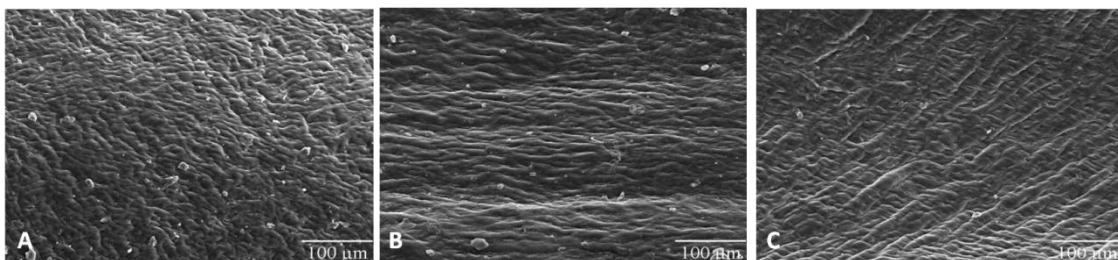


Figura 5.3. Imagens de microscopia electrónica de varrimento de indivíduos saudáveis com idades respectivamente 12 (A), 48 (B) e 80 (C) anos (ampliação 200x).

5.4. Avaliação microscópica da LPB

5.4.1. Análise histológica do tecido

A observação histológica do tecido foi efectuada por duas colorações de secções das extremidades proximal e distal do tecido. A coloração hematoxilina-eosina permite visualizar a organização da matriz e observam-se diferenças na disposição das fibras de colagénio, ou seja, na coloração de secções de amostras de indivíduos saudáveis observa-se que as fibras de colagénio se dispõem de forma mais orientada (figura 5.4.A)

comparando com a organização da matriz de doente com patologia degenerativa (figura 5.4.B).

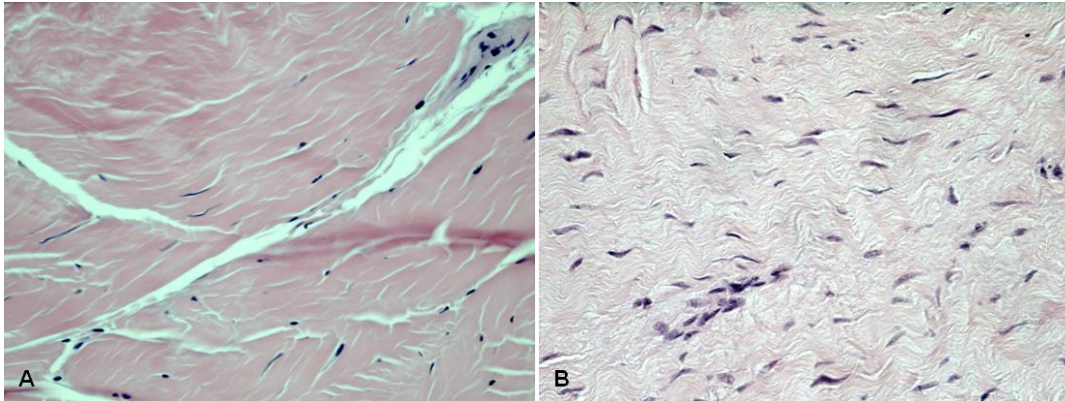


Figura 5.4. Coloração hematoxilina-eosina (ampliação 400x) de um indivíduo saudável (A) e de um doente com patologia degenerativa (B) onde se observa diferenças na organização da matriz extracelular.

Além disso, esta coloração permitiu a identificação e quantificação das células do tendão, dos vasos e das terminações nervosas e a presença ou ausência de infiltrado inflamatório foi observada pela coloração de Giemsa.

Populações celulares

O tendão possui dois tipos de células morfológicamente diferentes. Os tenoblastos distinguem-se dos tenócitos pela sua morfologia, tendo os primeiros um núcleo oval e os tenócitos um núcleo alongado (figura 5.5).

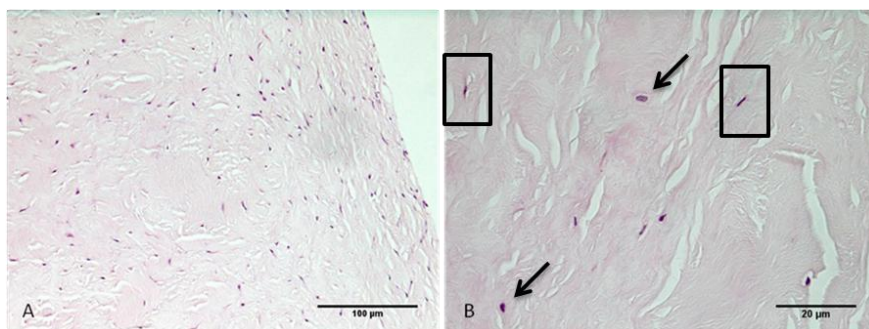


Figura 5.5. Coloração hematoxilina-eosina (ampliação 200x) de um doente com patologia degenerativa (A) e pormenor (ampliação 400X) da imagem (B) onde se identificam tenócitos (núcleo alongado identificados com um quadrado) e tenoblastos (núcleo oval, identificados com seta).

Comparando as populações celulares no tecido encontram-se algumas diferenças entre os grupos (figura 5.6.A). Apesar de a diferença não ser estatisticamente significativa ($p>0,05$) o grupo de doentes com patologia traumática apresenta maior número de células comparando com os outros grupos.

Nos 3 grupos observa-se que a zona distal do tendão é a que possui maior número de tenócitos (figura 5.6.B). Quanto aos tenoblastos, observou-se maior número na parte proximal de todos os grupos (figura 5.6.C). No entanto nenhuma das diferenças encontradas atingiu significância estatística.

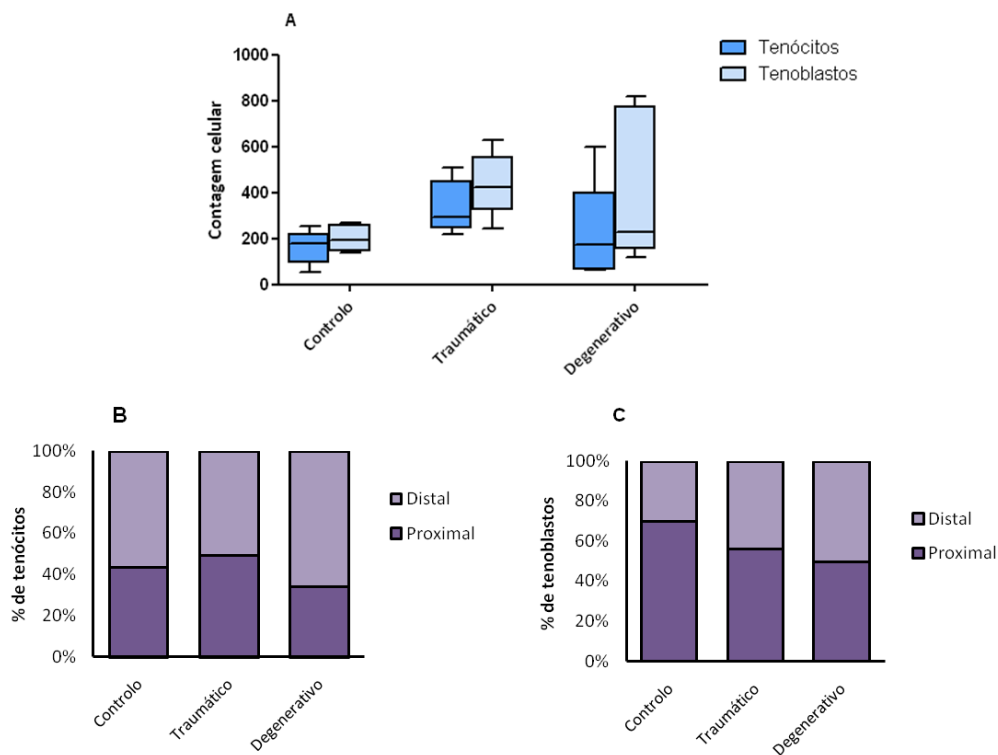


Figura 5.6. Populações celulares presentes no tendão (A) e comparação entre zonas proximal e distal de tenócitos (B) e tenoblastos (C).

Vascularização e terminações nervosas

Foi avaliada a presença e número de vasos sanguíneos e terminações nervosas mielinizadas e não mielinizadas em todo o corte transversal do tecido (figura 5.7).

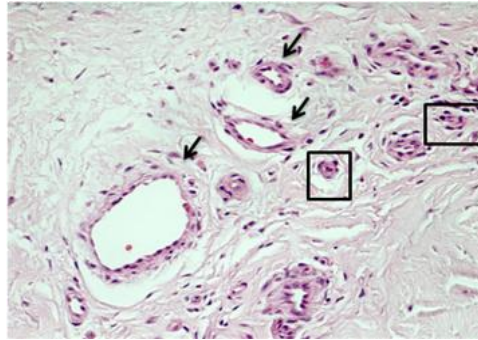


Figura 5.7. Secção de tecido de doente com patologia degenerativa evidenciando vasos sanguíneos (setas) e terminações nervosas (quadrados) (ampliação 400x).

Foram encontradas diferenças ao comparar a vascularização entre os grupos embora sem significado estatístico. O grupo com patologia traumática é o que possui maior número de vasos comparando com os restantes grupos (figura 5.8.A). Não foram encontradas diferenças entre as zonas proximal e distal do tendão no que respeita ao número de vasos, contudo observou-se predominância de vascularização na zona proximal em todos os grupos (figura 5.8.B).

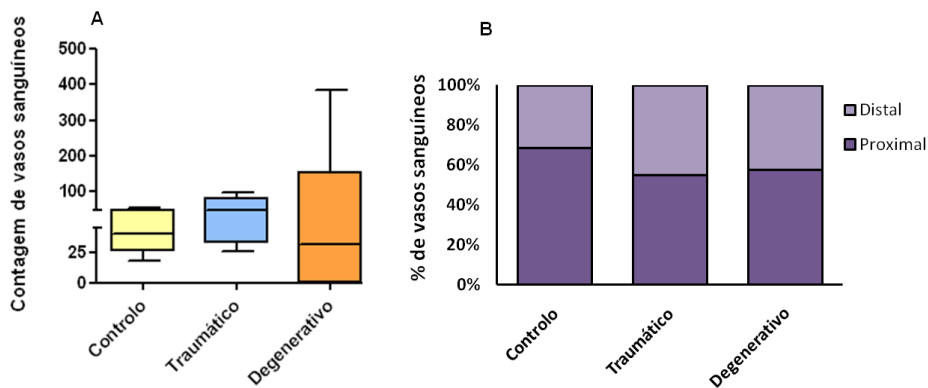


Figura 5.8. Número de vasos sanguíneos presentes no tecido (A) e comparação entre as zonas proximal e distal (B).

Em relação às terminações nervosas observou-se novamente que o grupo com patologia traumática é o que evidencia um maior número destas estruturas (figura 5.9.A); No entanto, nos grupos afectados com patologia existe uma predominância de inervação na extremidade proximal (figura 5.9.B).

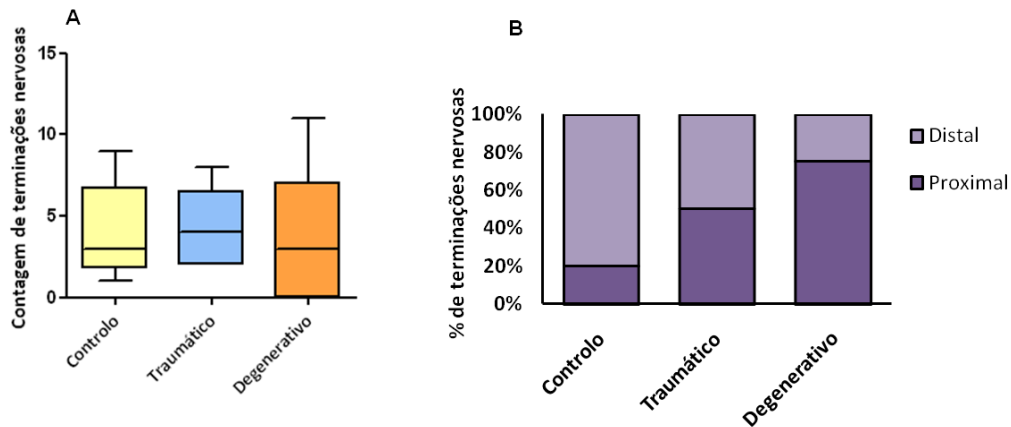


Figura 5.9 Número de terminações nervosas presentes no tecido (A; os valores apresentados representam medianas) e comparação entre as zonas proximal e distal (B).

Infiltrado inflamatório

A presença de infiltrado inflamatório foi observada com recurso à coloração do tecido com Giemsa (figura 5.10), não se tendo observado células inflamatórias em qualquer um dos grupos.

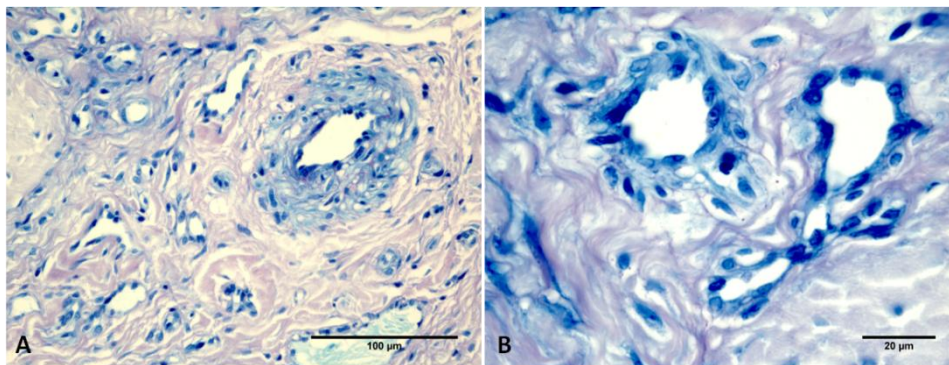


Figura 5.10. Coloração de Giemsa (ampliação 400x) do tendão de um doente com patologia degenerativa (A) e pormenor de vasos (ampliação 1000x) (B).

5.4.2. Substância P

As amostras de tendão foram avaliadas para a presença de um neuropéptido mediador da dor, a substância P, por imunohistoquímica. Esta avaliação foi efectuada

em ambas as extremidades do tecido. A especificidade do anticorpo foi confirmada no controlo negativo do mesmo doente (figura 5.11).

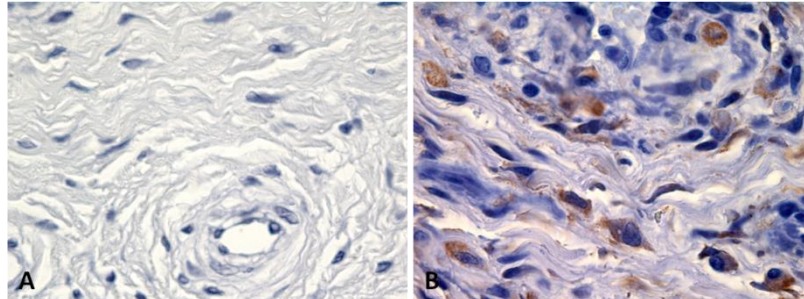


Figura 5.11. Imunohistoquímica para a substância P no tendão de um doente com patologia degenerativa (A, controlo negativo com ausência de marcação; B, marcação, a castanho, classificada com *score* 3) (ampliação de 1000X).

Entre os dois grupos de doentes não se observaram diferenças no score de substância P, no entanto ambos exibem mais marcação do que o grupo controlo ($p > 0,05$).

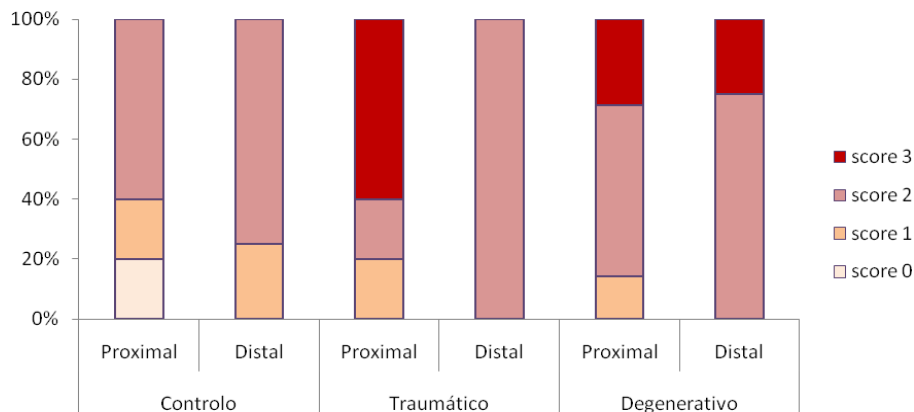


Figura 5.12. Comparação da avaliação semi-quantitativa de substância P entre os grupos nas extremidades proximal e distal do tendão.

5.4.3. Morte celular programada

Para avaliar a apoptose procedeu-se à contagem das células por marcação do DNA fragmentado (figura 5.13).

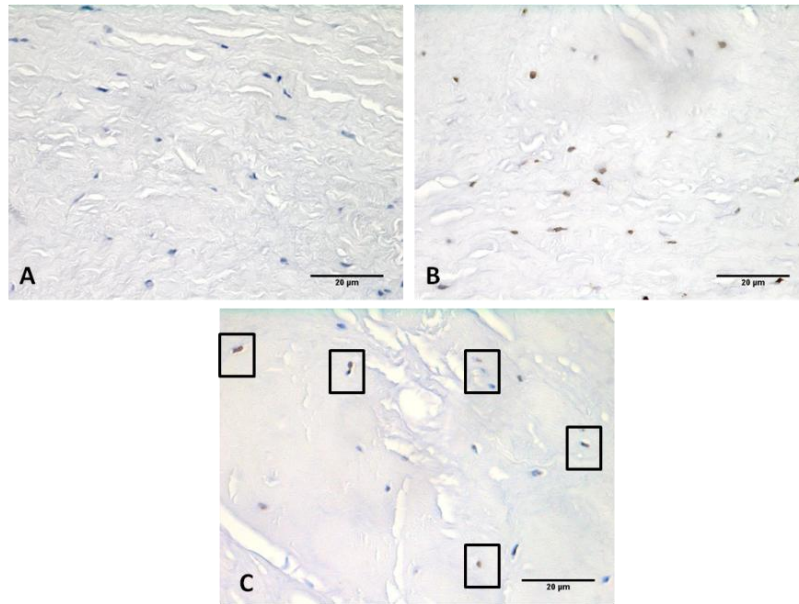


Figura 5.13. Imunohistoquímica de um doente com patologia degenerativa do tendão com controlo negativo (A), controlo positivo (B), e evidência de células marcadas (C) (ampliação 400x).

Entre os três grupos em estudo não se encontraram diferenças com significância estatística em relação à morte celular programada. O grupo controlo foi o que demonstrou menor apoptose. No grupo com patologia traumática observou-se maior número de células em morte celular (figura 5.14.A), localizando-se predominantemente na zona distal nos doentes com patologia degenerativa (figura 5.14.B).

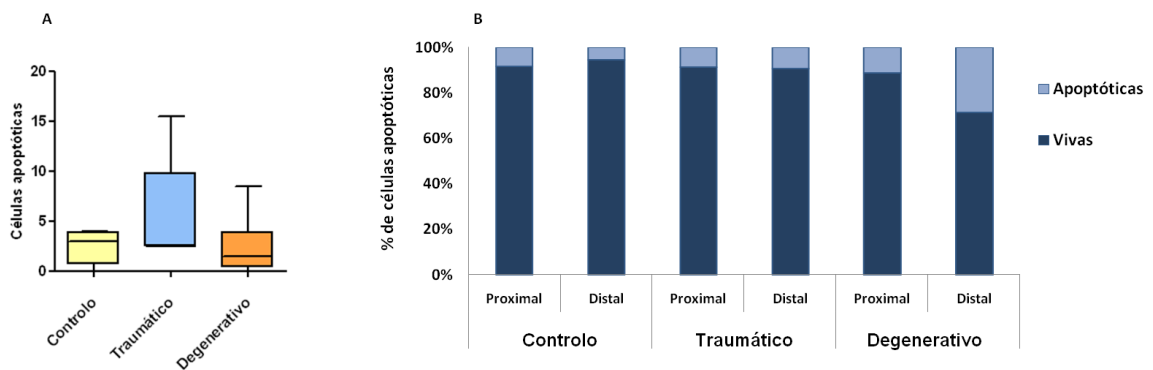


Figura 5.14. Comparação do número de células apoptóticas entre os três grupos (A) e entre as extremidades proximal e distal do tecido normalizando para o número total de células (B).

5.5. Análise da expressão génica

Para este estudo foi escolhida aleatoriamente uma amostra de 4 doentes com patologia degenerativa, 5 doentes com patologia traumática e 6 indivíduos controlo saudável. As características do RNA extraído encontram-se descritas no Anexo A.4.

5.5.1. Matriz extracelular

Após a estimulação da cultura com citocinas pró-inflamatórias (TNF e TGF- β 1) foi adicionado corticóide (dexametasona) e analisada a expressão génica para os principais componentes da matriz extracelular, os colagénios tipo I e III e a tenascina C.

Ao analisar a expressão de colagénio tipo I foi observado que os doentes com patologia degenerativa apresentam menor expressão génica em todas as situações. Foram observadas diferenças significativas de expressão de colagénio tipo I entre os doentes com patologia degenerativa e traumática na situação basal (figura 5.15). O estímulo com TNF não altera a expressão de colagénio tipo I enquanto a adição de TGF- β 1 provoca um ligeiro aumento da sua expressão ($p > 0,05$) em doentes com patologia degenerativa.

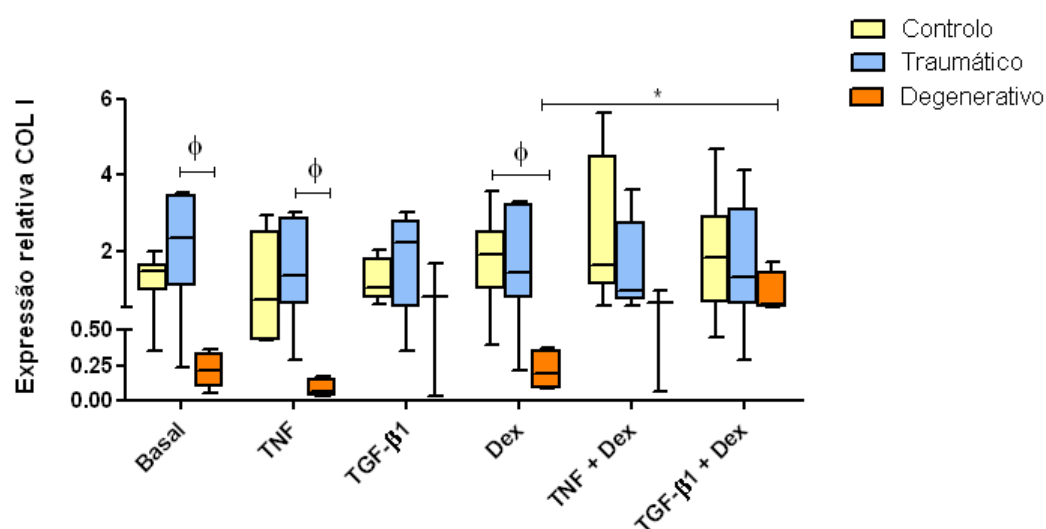


Figura 5.15. Expressão relativa do colagénio tipo I em culturas estimuladas com TNF e TGF- β 1. (ϕ $p < 0,05$ para comparação entre os 3 grupos com o post-hoc de *Dunn* e $*p < 0,05$ para comparação entre os estímulos).

Relativamente ao colagénio tipo III, os doentes com patologia degenerativa são os que têm menor expressão. Observou-se também que apenas o estímulo com TGF- β 1 induz um ligeiro aumento ($p>0,05$) na expressão deste colagénio mas apenas nos doentes com patologia degenerativa (figura 5.16).

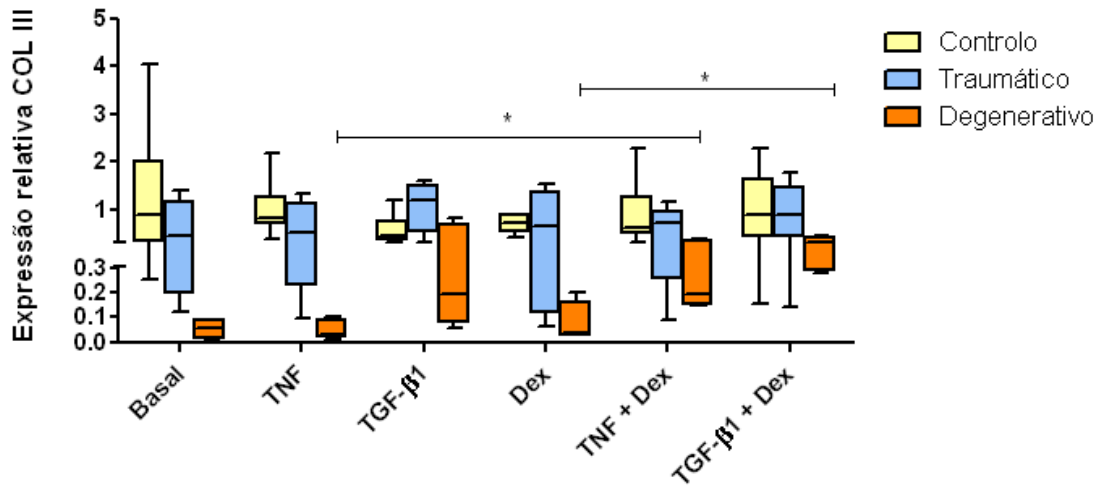


Figura 5.16. Expressão relativa do colagénio tipo III em culturas estimuladas com TNF e TGF- β 1 (* $p<0,05$ para comparação entre os estímulos).

Sendo os tenoblastos as células activas do tendão foi observada uma associação positiva ainda que não significativa nos doentes e controlos entre a expressão relativa do colagénio tipo I e o número de tenoblastos (figura 5.17.A). Por outro lado, ao analisar a expressão relativa de colagénio tipo III nos doentes com patologia da coifa, observou-se que estes, ao contrário dos controlos, apresentam uma associação positiva com o número de tenoblastos (figura 5.17.B).

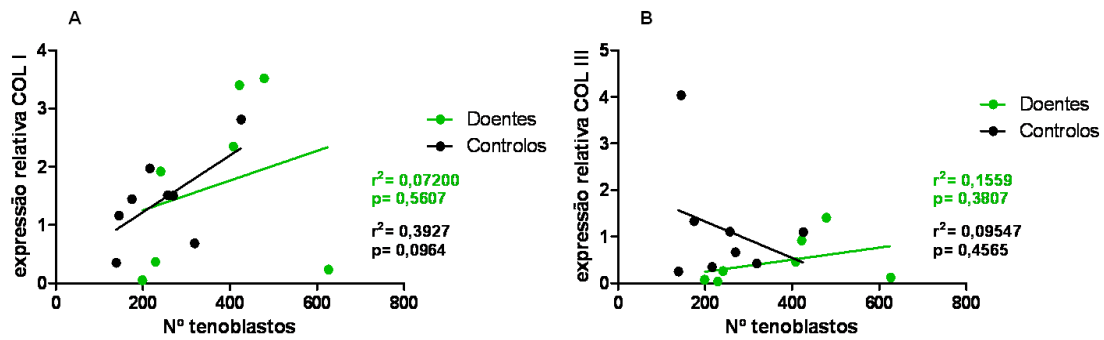


Figura 5.17. Relação entre a expressão relativa dos colagénios tipo I (A) e III (B) com o número de tenoblastos presentes no tecido determinado por histologia.

Ao comparar a expressão de colagénio nos controlos saudáveis foi observado que existe uma diminuição do colagénio tipo I com a idade mas um aumento do colagénio tipo III ($p > 0,05$) (figura 5.18).

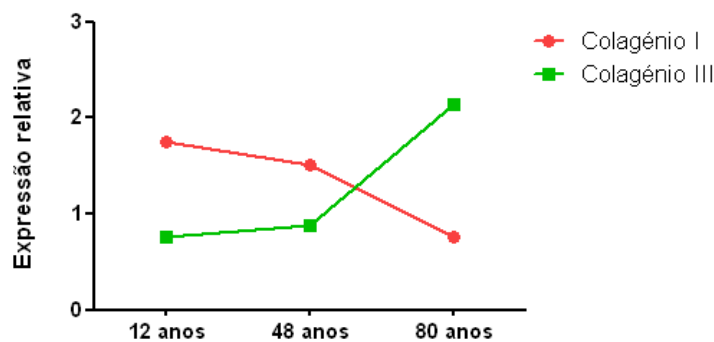


Figura 5.18. Variação dos níveis de expressão dos colagénios tipo I e tipo III com a idade em indivíduos saudáveis (os pontos representam medianas).

Para além da expressão dos dois tipos de colagénio que compõem a matriz extracelular do tendão, foi analisada a expressão da tenascina C, proteína importante no alinhamento e maturação das fibras na matriz. Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na situação basal entre o grupo controlo e o grupo de doentes com patologia degenerativa, mas os estímulos utilizados parecem não causar alterações (figura 5.19).

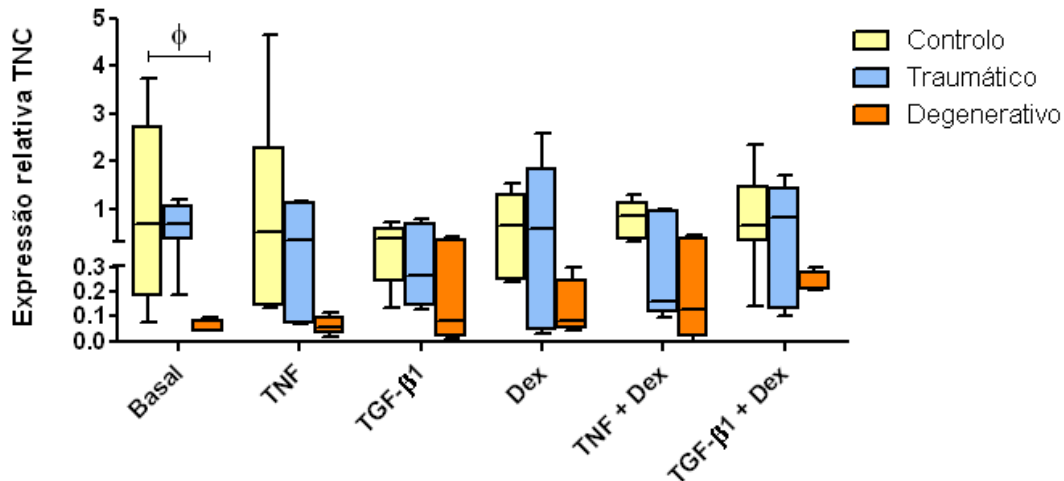


Figura 5.19. Expressão génica relativa de tenascina C em culturas estimuladas com TNF e TGF-β1. ($p < 0,05$ para comparação entre os 3 grupos com o post-hoc de *Dunn*).

5.5.2. VEGF e NGF

Na análise da expressão génica de proteínas envolvidas quer no crescimento de vasos dado pela expressão de VEGF, quer no crescimento de nervos dado pela expressão de NGF, observou-se que a expressão basal de VEGF é significativamente mais baixa no grupo de doentes com patologia degenerativa (figura 5.20) e que o estímulo com TNF e dexametasona não afecta a expressão deste factor.

Contudo, o TGF-β1 teve um efeito pronunciado na expressão deste gene mas apenas em células de doentes com patologia degenerativa, onde foi observado um aumento da sua expressão, com perda da diferença significativa basal (figura 5.20).

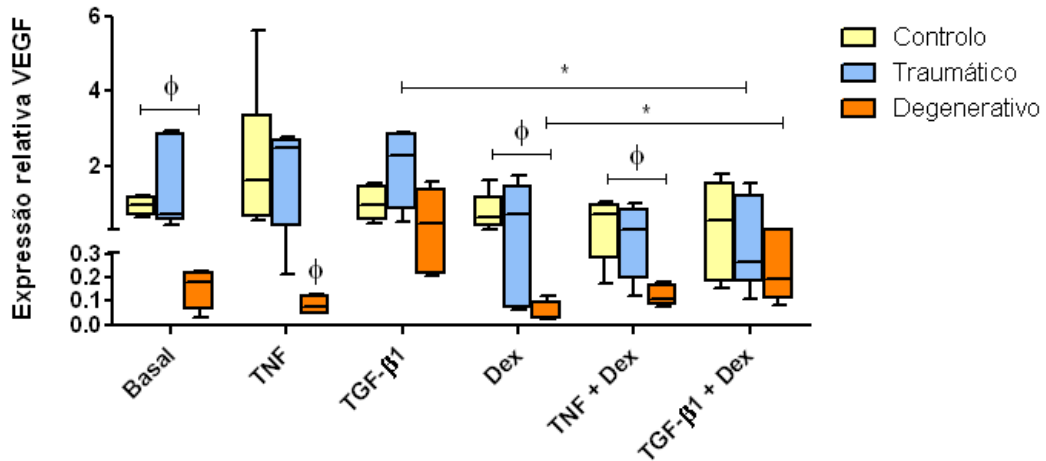


Figura 5.20. Expressão génica relativa de VEGF em culturas estimuladas com TNF e TGF-β1. ($\phi = p < 0,05$ para comparação entre os 3 grupos com o post-hoc de *Dunn* e $*p < 0,05$ para comparação entre os estímulos).

Relativamente à expressão de NGF, foi observado o mesmo padrão de expressão nos doentes com patologia degenerativa que o descrito para o VEGF com os diversos estímulos (figura 5.21), realçando que nestes doente o efeito de aumento da expressão de NGF com a adição dos estímulos pro-inflamatórios (TNF e TGF-β1) causa perda da diferença significativa basal.

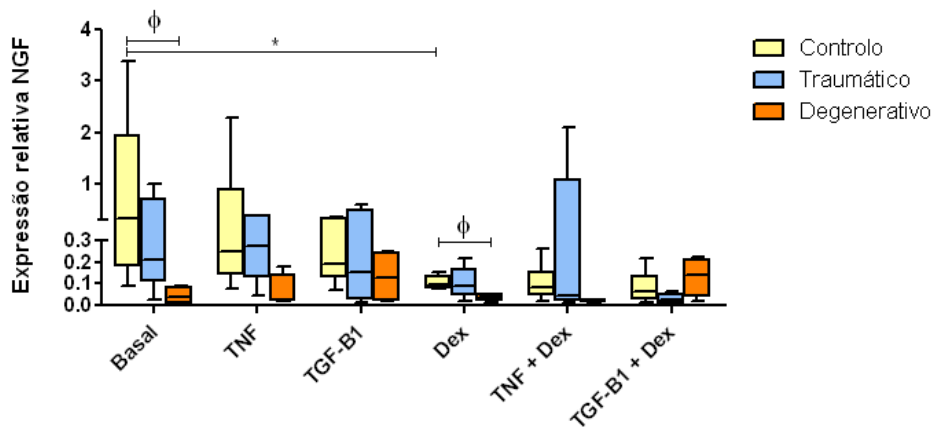


Figura 5.21. Expressão génica relativa de NGF em culturas estimuladas com TNF e TGF-β1. ($\phi = p < 0,05$ para comparação entre os 3 grupos com o post-hoc de *Dunn* e $*p < 0,05$ para comparação entre os estímulos).

5.5.3. Citocinas

A inflamação no tecido foi estudada através da análise de expressão das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF pelas células do tendão.

Foi observado que os níveis de expressão da IL-1 β são estatisticamente diferentes entre os grupos atingindo um nível significativamente mais baixo no grupo de doentes com patologia degenerativa. Esta situação só se altera quando se estimulam as células com TGF- β 1 havendo um aumento da expressão de IL-1 β nos doentes com patologia traumática e, mais uma vez, perda da significância estatística em relação à situação basal (figura 5.22).

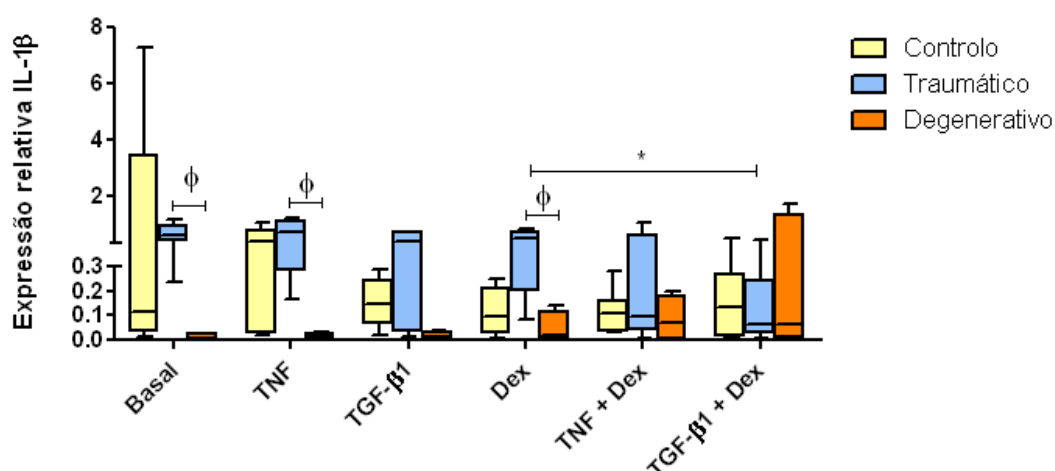


Figura 5.22. Expressão génica relativa de IL-1 β em culturas estimuladas com TNF e TGF- β 1. ($\phi = p < 0,05$ para comparação entre os 3 grupos com o post-hoc de *Dunn* e $*p < 0,05$ para comparação entre os estímulos).

Em relação à expressão de TNF observou-se que os doentes com patologia degenerativa são os que apresentam menos expressão desta citocina (figura 5.23). O estímulo com TNF induz um aumento considerável, ainda que não significativo em relação à situação basal na expressão de TNF mas apenas nos doentes com patologia traumática. Ao contrário, o estímulo com TGF- β 1 e/ou dexametasona não surte qualquer efeito (figura 5.23).

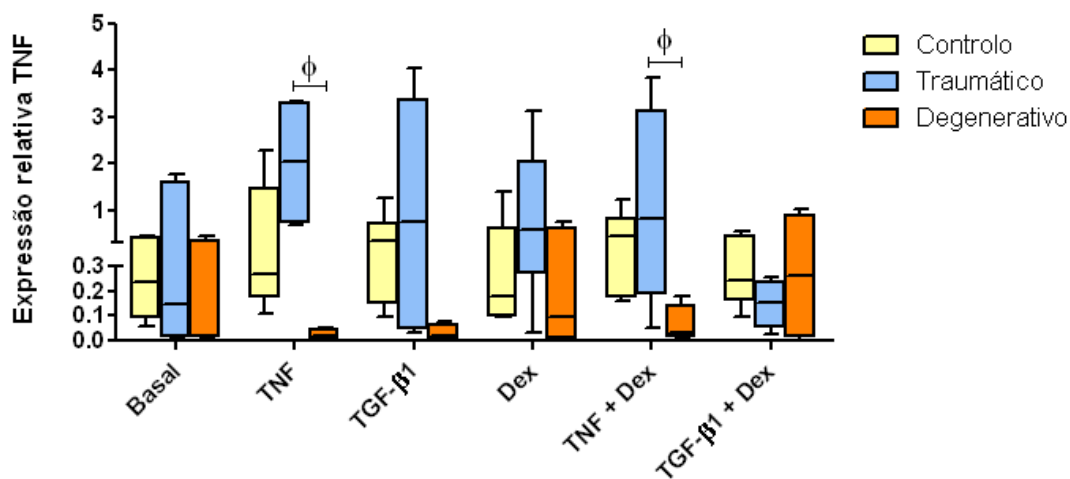


Figura 5.23. Expressão génica relativa de TNF em culturas estimuladas com TNF e TGF- β 1. ($\phi = p < 0,05$ para comparação entre os 3 grupos com o post-hoc de *Dunn*).

A IL-10 está descrita como uma citocina com efeito imunossupressor de expressão de citocinas pró-inflamatórias. A estimulação da cultura de células de tendão com esta citocina não provocou qualquer alteração no nível de expressão dos genes de interesse (figura 5.24).

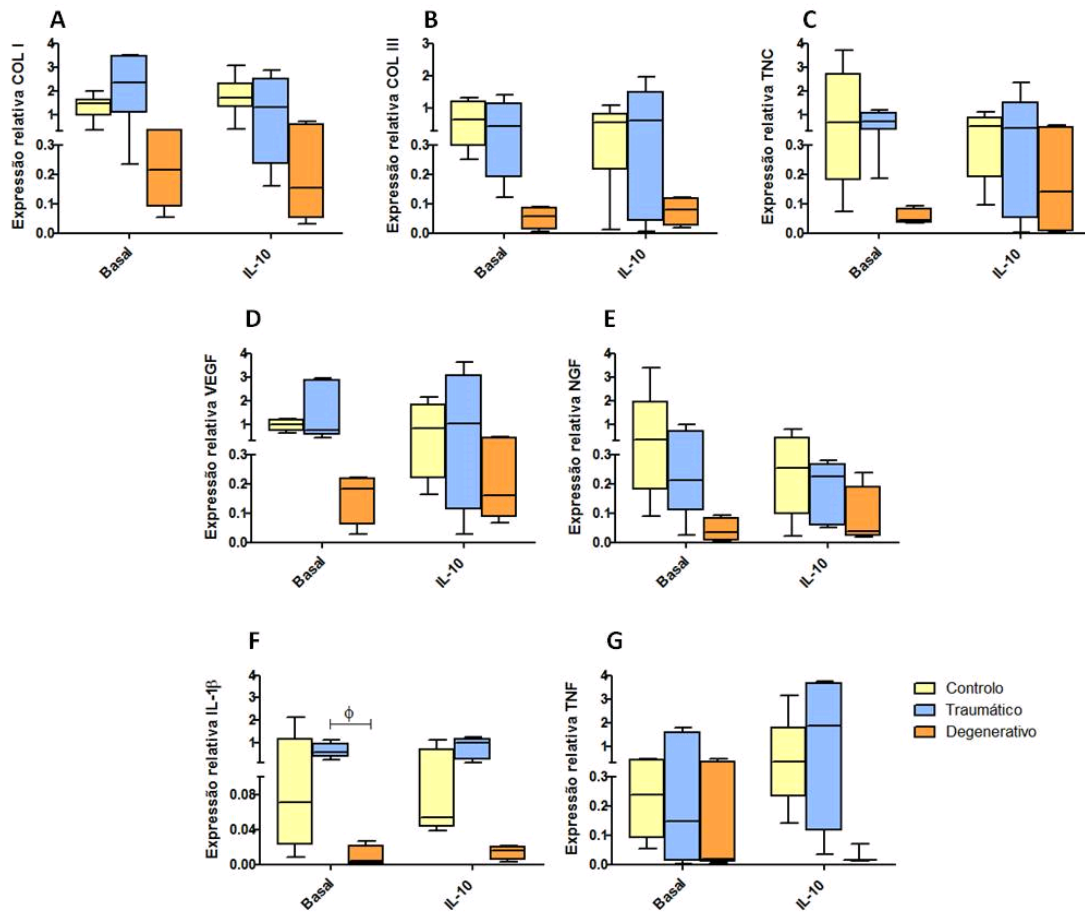


Figura 5.24. Expressão génica relativa de colagénios tipo I (A) e tipo III (B), tenascina C (C), VEGF (D), NGF (E), IL-1 β (F) e TNF (G) em culturas estimuladas com IL-10. ($\phi = p < 0,05$ para comparação entre os 3 grupos com o post-hoc de *Dunn*).

6. Discussão

Este trabalho teve como objectivo estudar o tendão da longa porção do bicipíte enquanto mediador de dor no ombro em situações de tendinopatia da coifa dos rotadores. A LPB foi analisada em doentes com patologias do ombro distintas: a degenerativa (crónica) e traumática (aguda). Foi avaliada a composição e organização da matriz do tendão e quantificaram-se não só os terminais nervosos como também o grau de vascularização do tecido. Determinou-se ainda o grau de actividade dos tenócitos provenientes da LPB em cultura através da expressão génica de proteínas fundamentais para este tecido. Mais ainda foi analisado o efeito *in vitro* de uma terapêutica utilizada como tratamento da tendinopatia, a dexametasona.

A tendinopatia da coifa dos rotadores é uma patologia frequente e altamente incapacitante. Alterações degenerativas deste grupo de tendões, tornam-nos mais frágeis e após um traumatismo mínimo, ou por vezes espontaneamente, ocorrem roturas tendinosas. Doentes com esta patologia têm dor crónica muito perturbadora para as suas actividades da vida diária. Muitas vezes, nas roturas maciças da coifa, efectua-se tenotomia da LPB, observando-se nestes casos uma melhoria significativa da dor [21]. Nos últimos anos a investigação tem-se focado no estudo da LPB enquanto mediador de dor no ombro. No entanto a LPB apresenta uma anatomia bastante diferente da de outros tendões e para este tendão especificamente não há muita informação. A zona proximal do tendão é intra-articular e por isso alterações da articulação ou dos tecidos envolventes conduzem a alterações desta zona da LPB sendo a extremidade proximal o local onde ocorre o início da degeneração do tecido [34]. Estudos anteriores têm apontado várias causas para explicar a dor no ombro associada à LPB. O processo de regeneração do tecido pode ser impedido quer por excesso de moléculas sinalizadoras quer por problemas mecânicos que impeçam a normal remodelação da matriz protagonizada pelos tenócitos [35]. Nesta situação surgem alterações na composição e organização da matriz.

Neste trabalho foram estudados 15 doentes agrupados em dois grupos de acordo com a patologia do tendão. Macroscopicamente, o tendão do grupo com patologia traumática apresentava indícios visíveis de inflamação na extremidade proximal, e maior rigidez da matriz extracelular. Por outro lado, o tendão com patologia degenerativa apresenta degeneração visível pelo aspecto fibrilhar e cor branca ou amarelada. A organização e

disposição das fibras de colagénio na matriz foi avaliada por microscopia electrónica de varrimento, tendo sido observado que o grupo com patologia degenerativa era o que apresentava maior desorganização da matriz. Recorrendo ainda a este tipo de microscopia em controlos foi observado que a organização do colagénio é perdida com a idade pressupondo uma diminuição do número de células e aumento de glicosaminoglicanos [1,36,37]. Pelo contrário, no controlo mais jovem (12 anos de idade) a matriz do tendão ainda não está completamente organizada assistindo-se a um desalinhamento das fibras.

As alterações na organização da matriz extracelular foram também observadas na coloração com hematoxilina-eosina em que os doentes com patologia traumática apresentavam maior celularidade e um ligeiro aumento de vascularização, o que denota uma resposta do tecido a uma agressão recente. Recentemente foi descrita a existência de uma rede de fibras sensoriais predominantemente na zona proximal da LPB [23]. Na nossa amostra não se observaram diferenças na inervação do tecido entre as zonas proximal e distal, contudo, constatou-se que nos dois grupos de doentes o número de terminações nervosas é ligeiramente superior na zona proximal do tecido, mais evidente ainda nos doentes com patologia degenerativa. Estas terminações nervosas sensoriais não mielinizadas, conhecidas como receptores de dor, secretam mensageiros químicos envolvidos na transmissão da dor que, por sua vez, estimulam os tenócitos originando a inflamação neurogénica. Um dos mais conhecidos neuropéptidos mediadores da dor é a substância P que induz permeabilidade dos vasos e ainda libertação de citocinas e factores de crescimento pelas células do sistema imunitário [38]. Mais ainda a substância P estimula a proliferação das células do tecido e a angiogénese [39]. Neste trabalho observou-se que os doentes com patologia degenerativa da coifa dos rotadores tinham mais substância P em toda a LPB. Os doentes com patologia traumática tinham maior marcação para a substância P apenas na zona proximal do tendão quando comparados com os tendões controlo. Este facto está em concordância com os dados clínicos uma vez que os doentes com patologia traumática têm um quadro de lesão aguda e por isso as alterações apenas se observam na extremidade proximal do tendão. Apesar de nesta patologia ocorrer surtos inflamatórios recorrentes, em nenhuma das amostras foi visualizado infiltrado inflamatório. No entanto, a inflamação pode existir apenas na bainha do tendão e não em todo o tecido. Desta forma, pode supor-se que a dor resulta da interacção do tendão com os tecidos em redor, incluindo a bainha do

tendão. Mais ainda foi estudada a apoptose no tecido, no entanto não foram observadas diferenças na localização das células apoptóticas nem entre os grupos, apesar de estar descrito um aumento do número de células apoptóticas em tendões degenerativos [40]. De forma a estudar o metabolismo das células do tendão, estas foram colocadas em culturas e estimuladas com citocinas pró (TNF e TGF- β 1) e anti-inflamatórias (IL-10) e foram analisados vários genes relacionados com a regeneração da matriz (colagénios tipo I e III e tenascina C), inflamação (IL-1 β e TNF) e factores de crescimento (NGF e VEGF).

Os doentes com patologia degenerativa do tendão apresentaram valores muito baixos de expressão de colagénio tipo I e de tipo III, sendo esta diferença significativa em relação aos doentes com patologia traumática. Mais ainda nos doentes com patologia degenerativa, o TGF- β 1 provocou um aumento de expressão dos colagénios. Sabe-se que o TGF- β 1 afecta a síntese de colagénios [41,42] e a expressão desta citocina está aumentada, bem como os seus receptores, na fase proliferativa e de remodelação da matriz, favorecendo a deposição das fibras na matriz [43]. Também para a expressão da tenascina C foram apontadas diferenças nos níveis de expressão, sendo que os doentes com patologia degenerativa apresentavam níveis de expressão muito baixos comparando com os restantes grupos. Desta forma, os níveis de expressão de genes envolvidos na organização da matriz mostram-se em concordância com as observações de maior desorganização da matriz extracelular em doentes com patologia degenerativa por estarem numa situação de baixa actividade celular descrita pelos níveis de expressão génica.

Quando se analisou a expressão génica em relação ao número de tenoblastos observou-se que a expressão de colagénio tipo I é proporcional ao número de tenoblastos e que o colagénio tipo III também apresenta esta associação positiva nos doentes. Apesar de não haver correlação, esta tendência de associação positiva nos doentes indica que há uma alteração da expressão génica do colagénio tipo III que corresponde a uma alteração na organização fibrilar já descrita para estas patologias. Ao observar a expressão génica dos colagénios em relação à idade observamos que o colagénio tipo III aumenta com a idade, ao contrário do que acontece com o colagénio tipo I, o que está também relacionado com a menor conexão das fibras observada por microscopia electrónica de varrimento, denotando uma diminuição da rigidez bem como um aumento do tamanho das fibras característico do envelhecimento do tecido [44,45].

Isto confirma que existe de facto uma maior tendência para patologias relacionadas com a coifa dos rotadores com a idade [46].

O factor de crescimento angiogénico, VEGF, estimula as células endoteliais aumentando a proliferação de vasos nas zonas hipovascularizadas [47]. Apesar de não terem sido observadas diferenças no número de vasos sanguíneos entre os dois grupos de doentes, o nível de expressão génica nos doentes com patologia traumática é superior. Só recentemente se constatou que os tenócitos têm capacidade para sintetizar o factor de crescimento de nervos [48]. Este é importante para o crescimento e sobrevivência de pequenas fibras nervosas por isso a expressão de NGF foi analisada, tendo-se verificado que os doentes com patologia traumática apresentam níveis mais elevados deste factor em relação aos doentes com patologia degenerativa.

Não foram encontradas diferenças na expressão de TNF, no entanto a expressão de IL-1 β é estatisticamente superior nos doentes com traumática em relação aos doentes com patologia degenerativa. Esta citocina é considerada um factor importante na inflamação da patologia da coifa dos rotadores [49] e deste modo pode estar aumentada numa patologia aguda do tendão. Contudo é de salientar que não foi observado infiltrado inflamatório no tecido.

Do estudo da análise da expressão génica, podemos concluir que nos doentes com patologia degenerativa a maioria dos genes dos tenócitos, estão *downregulated* e que, por conseguinte, este tecido tem baixa actividade metabólica. Pelo contrário, os doentes com patologia traumática têm maior capacidade de regeneração do tecido uma vez que na análise de expressão génica se verificou igual expressão à dos controlos com excepção do VEGF que se encontrava aumentado nos doentes traumáticos. Este último facto é concordante com a avaliação microscópica onde se verificou aumento de vascularização neste grupo de doentes. A dexametasona é um glucocorticóide utilizado como terapêutica na tendinopatia. Tem efeito anti-inflamatório e imunossupressor mas o seu efeito a nível celular tem sido discutido uma vez que diminui a proliferação dos tenócitos e a síntese de colagénio tipo I através do aumento da síntese de metaloproteinases [50]. Esta situação aumenta o risco de rotura do tendão. Neste trabalho foi também testada a estimulação com dexametasona, sendo que não se observaram alterações nos níveis de expressão dos genes analisados.

Na análise à expressão génica observou-se que o estímulo com dexametasona não surte qualquer efeito, o TNF apenas provocou um aumento na expressão desta citocina nos doentes com patologia traumática e o estímulo com TGF- β 1 apenas provocou resposta nos doentes com patologia degenerativa. Este factor de crescimento é bastante importante nos processos de regeneração do tecido pois influencia a síntese de componentes da matriz como os colagénios, metaloproteinases ou receptores celulares para proteínas de matriz como as integrinas. Estas acções promovem a reparação do tecido após uma reacção inflamatória. Neste trabalho, apenas os doentes com patologia degenerativa conseguem responder a este estímulo. Por sua vez, os doentes com patologia traumática, bem como os controlos, não respondem o que pode ser devido a um bloqueio de vias de sinalização, no caso dos doentes com patologia traumática, ou de indisponibilidade de receptores.

É de notar que apesar das células dos controlos provirem de cadáveres foi possível mantê-las em cultura bem como estudar a expressão génica. Várias limitações podem ser apontadas neste trabalho, nomeadamente o número de amostras que foi possível obter, bem como o facto de nos controlos haver dificuldade de emparelhamento de idades.

Além dos resultados obtidos há muitas outras questões que surgem pelo que de futuro seria interessante aumentar o tamanho da amostra bem como correlacionar dados de resposta cirúrgica, como o *score de Constant* e a EVA da dor, com as características microscópicas e funcionais do tendão da LPB. Mais ainda, seria interessante estudar as diferenças no tecido com a idade tanto na expressão génica como na análise proteica.

Como comentário final, podemos dizer que não foram detectadas diferenças nas extremidades proximal e distal do tecido. Além disso, e ao contrário do que se poderia esperar, a dexametasona não altera a expressão génica mas o estímulo com TGF- β 1 estimula a remodelação de matriz, efeito esse observado nos doentes com patologia degenerativa.

A tendinopatia é um problema na prática clínica sendo por este motivo de extrema importância a investigação neste campo. Este trabalho foi pioneiro na investigação de algumas características da longa porção do bicípete em situação patológica e pode ser assim utilizado como base para estudos futuros.

7. Bibliografia

1. Riley G (2004) The pathogenesis of tendinopathy. A molecular perspective. *Rheumatology (Oxford)* 43: 131-142.
2. Sharma P, Maffulli N (2005) Tendon injury and tendinopathy: healing and repair. *J Bone Joint Surg Am* 87: 187-202.
3. Chuen FS, Chuk CY, Ping WY, Nar WW, Kim HL, et al. (2004) Immunohistochemical characterization of cells in adult human patellar tendons. *J Histochem Cytochem* 52: 1151-1157.
4. Abate M, Gravare-Silbernagel K, Siljeholm C, Di Iorio A, De Amicis D, et al. (2009) Pathogenesis of tendinopathies: inflammation or degeneration? *Arthritis Res Ther* 11: 235.
5. Xu Y, Murrell GA (2008) The basic science of tendinopathy. *Clin Orthop Relat Res* 466: 1528-1538.
6. Rolf CG, Fu BS, Pau A, Wang W, Chan B (2001) Increased cell proliferation and associated expression of PDGFRbeta causing hypercellularity in patellar tendinosis. *Rheumatology (Oxford)* 40: 256-261.
7. Zhang G, Young BB, Ezura Y, Favata M, Soslowsky LJ, et al. (2005) Development of tendon structure and function: regulation of collagen fibrillogenesis. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 5: 5-21.
8. Bard JB, Hulmes DJ, Purdom IF, Ross AS (1993) Chick corneal development in vitro: diverse effects of pH on collagen assembly. *J Cell Sci* 105 (Pt 4): 1045-1055.
9. Murphy DJ, Nixon AJ (1997) Biochemical and site-specific effects of insulin-like growth factor I on intrinsic tenocyte activity in equine flexor tendons. *Am J Vet Res* 58: 103-109.
10. Fenwick SA, Curry V, Harrall RL, Hazleman BL, Hackney R, et al. (2001) Expression of transforming growth factor-beta isoforms and their receptors in chronic tendinosis. *J Anat* 199: 231-240.
11. Hosaka YZ, Uratsuji T, Ueda H, Uehara M, Takehana K (2010) Comparative study of the properties of tendinocytes derived from three different sites in the equine superficial digital flexor tendon. *Biomed Res* 31: 35-44.
12. Millar NL, Wei AQ, Molloy TJ, Bonar F, Murrell GA (2009) Cytokines and apoptosis in supraspinatus tendinopathy. *J Bone Joint Surg Br* 91: 417-424.
13. Yuan J, Murrell GA, Trickett A, Wang MX (2003) Involvement of cytochrome c release and caspase-3 activation in the oxidative stress-induced apoptosis in human tendon fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1641: 35-41.
14. Riley G (2008) Tendinopathy--from basic science to treatment. *Nat Clin Pract Rheumatol* 4: 82-89.
15. Clegg PD, Strassburg S, Smith RK (2007) Cell phenotypic variation in normal and damaged tendons. *Int J Exp Pathol* 88: 227-235.
16. James R, Kesturu G, Balian G, Chhabra AB (2008) Tendon: biology, biomechanics, repair, growth factors, and evolving treatment options. *J Hand Surg Am* 33: 102-112.
17. Sharma P, Maffulli N (2006) Biology of tendon injury: healing, modeling and remodeling. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 6: 181-190.
18. Ireland D, Harrall R, Curry V, Holloway G, Hackney R, et al. (2001) Multiple changes in gene expression in chronic human Achilles tendinopathy. *Matrix Biol* 20: 159-169.
19. Fredberg U, Stengaard-Pedersen K (2008) Chronic tendinopathy tissue pathology, pain mechanisms, and etiology with a special focus on inflammation. *Scand J Med Sci Sports* 18: 3-15.
20. Churgay CA (2009) Diagnosis and treatment of biceps tendinitis and tendinosis. *Am Fam Physician* 80: 470-476.
21. Boileau P, Baque F, Valerio L, Ahrens P, Chuinard C, et al. (2007) Isolated arthroscopic biceps tenotomy or tenodesis improves symptoms in patients with massive irreparable rotator cuff tears. *J Bone Joint Surg Am* 89: 747-757.
22. Sendzik J, Shakibaei M, Schafer-Korting M, Lode H, Stahlmann R (2010) Synergistic effects of dexamethasone and quinolones on human-derived

- tendon cells. *Int J Antimicrob Agents* 35: 366-374.
23. Alpentaki K, McLaughlin D, Karagogeos D, Hadjipavlou A, Kontakis G (2005) Sympathetic and sensory neural elements in the tendon of the long head of the biceps. *J Bone Joint Surg Am* 87: 1580-1583.
 24. Donnerer J, Schuligoi R, Stein C (1992) Increased content and transport of substance P and calcitonin gene-related peptide in sensory nerves innervating inflamed tissue: evidence for a regulatory function of nerve growth factor in vivo. *Neuroscience* 49: 693-698.
 25. Elfvin LG, Holmberg K, Johansson J, Aldskogius H (1998) The innervation of the synovium of the knee joint in the guinea pig: an immunohistochemical and ultrastructural study. *Anat Embryol (Berl)* 197: 293-303.
 26. Szabo I, Boileau P, Walch G (2008) The proximal biceps as a pain generator and results of tenotomy. *Sports Med Arthrosc* 16: 180-186.
 27. Constant CR, Murley AH (1987) A clinical method of functional assessment of the shoulder. *Clin Orthop Relat Res*: 160-164.
 28. John T, Lodka D, Kohl B, Ertel W, Jammrath J, et al. (2010) Effect of pro-inflammatory and immunoregulatory cytokines on human tenocytes. *J Orthop Res* 28: 1071-1077.
 29. Hoberg M, Rudert M, Pap T, Klein G, Gay S, et al. (2007) Attachment to laminin-111 facilitates transforming growth factor beta-induced expression of matrix metalloproteinase-3 in synovial fibroblasts. *Ann Rheum Dis* 66: 446-451.
 30. Jonsson D, Amisten S, Bratthall G, Holm A, Nilsson BO (2009) LPS induces GROalpha chemokine production via NF-kappaB in oral fibroblasts. *Inflamm Res* 58: 791-796.
 31. Wong MW, Lui WT, Fu SC, Lee KM (2009) The effect of glucocorticoids on tendon cell viability in human tendon explants. *Acta Orthop* 80: 363-367.
 32. Wong ML, Medrano JF (2005) Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* 39: 75-85.
 33. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6: 986-994.
 34. Lakemeier S, Reichelt JJ, Timmesfeld N, Fuchs-Winkelmann S, Paletta JR, et al. (2010) The relevance of long head biceps degeneration in the presence of rotator cuff tears. *BMC Musculoskelet Disord* 11: 191.
 35. Magnusson SP, Langberg H, Kjaer M (2010) The pathogenesis of tendinopathy: balancing the response to loading. *Nat Rev Rheumatol* 6: 262-268.
 36. Astrom M, Rausing A (1995) Chronic Achilles tendinopathy. A survey of surgical and histopathologic findings. *Clin Orthop Relat Res*: 151-164.
 37. Birch HL, Bailey JV, Bailey AJ, Goodship AE (1999) Age-related changes to the molecular and cellular components of equine flexor tendons. *Equine Vet J* 31: 391-396.
 38. Schaible HG, Grubb BD (1993) Afferent and spinal mechanisms of joint pain. *Pain* 55: 5-54.
 39. Nilsson J, von Euler AM, Dalsgaard CJ (1985) Stimulation of connective tissue cell growth by substance P and substance K. *Nature* 315: 61-63.
 40. Yuan J, Wang MX, Murrell GA (2003) Cell death and tendinopathy. *Clin Sports Med* 22: 693-701.
 41. Heinemeier K, Langberg H, Olesen JL, Kjaer M (2003) Role of TGF-beta1 in relation to exercise-induced type I collagen synthesis in human tendinous tissue. *J Appl Physiol* 95: 2390-2397.
 42. Arai K, Kasashima Y, Kobayashi A, Kuwano A, Yoshihara T (2002) TGF-beta alters collagen XII and XIV mRNA levels in cultured equine tenocytes. *Matrix Biol* 21: 243-250.
 43. Wang JH (2006) Mechanobiology of tendon. *J Biomech* 39: 1563-1582.
 44. Narici MV, Maffulli N, Maganaris CN (2008) Ageing of human muscles and tendons. *Disabil Rehabil* 30: 1548-1554.
 45. Sargon MF, Ozlu K, Oken F (2005) Age-related changes in human tendo calcaneus collagen fibrils. *Saudi Med J* 26: 425-428.
 46. Nove-Josserand L, Walch G, Adeleine P, Courpron P (2005) [Effect of age on the natural history of the shoulder: a clinical and radiological study in the elderly]. *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot* 91: 508-514.
 47. Pufe T, Petersen WJ, Mentlein R, Tillmann BN (2005) The role of vasculature and angiogenesis for the pathogenesis of degenerative tendons disease. *Scand J Med Sci Sports* 15: 211-222.

48. Bagge J, Lorentzon R, Alfredson H, Forsgren S (2009) Unexpected presence of the neurotrophins NGF and BDNF and the neurotrophin receptor p75 in the tendon cells of the human Achilles tendon. *Histol Histopathol* 24: 839-848.
49. Gotoh M, Hamada K, Yamakawa H, Yanagisawa K, Nakamura M, et al. (2001) Interleukin-1-induced subacromial synovitis and shoulder pain in rotator cuff diseases. *Rheumatology (Oxford)* 40: 995-1001.
50. Scutt N, Rolf CG, Scutt A (2006) Glucocorticoids inhibit tenocyte proliferation and Tendon progenitor cell recruitment. *J Orthop Res* 24: 173-182.

Anexos

Anexo A.1 Protocolo Clínico

EQUIPA DO MEMBRO SUPERIOR_REGISTO DE OBSERVAÇÃO

Doente: _____
NSC: _____
Data: _____
Peso: _____ Altura: _____
Lado: D E Traumático : S N Acidente : _____
Profissão: _____ Exercício físico habitual: _____
Início das queixas: _____ Infiltrações N° _____ Data da última infiltração
Fisioterapia _____ N° sessões _____
Antecedentes Pessoais: _____
Medicação Habitual: _____
Dor : mec infl mista _____
VAS _____
Observação : Amiotrofia: Deltoide SS IS
Pontos dolorosos : AC LPB SS IS Trapézio coracóide cervical
Terapêutica oral (antiálgica): _____

SINAIS CLÍNICOS

Speed(palm up /90°Flex)		Apreensão	
Jobe (empty can)		Recolocação	
Hawkins (90° Abd +30° RI)		Sulco	
Neer		O' Brien	
Gerber (Lift-off)		Biceps Load	
Lag sign		Gagey	

TABELA DE CONSTANT	D	E
Dor (Nula 15, Ligeira 10, Moderada 5, Severa 0)		
Incapacidade para a Profissão (Nula 4, Ligeira 3, Moderada 2, Grande 1, Total 0)		
Incapacidade para o Desporto (Nula 4, Ligeira 3, Moderada 2, Grande 1, Total 0)		
Dor Nocturna (Nula 2, Alguma 1, Severa 0)		
Nível de trabalho com a mão (Cintura 2, Xifoide 4, Pescoço 6, Cabeça 8, Acima cabeça 10)		
Mobilidades		
Flexão <30° - 0; 30°/60° -2; 60°/90° - 4; 90°/120° - 6; 120°/150° - 8; >150° - 10		
Abdução <30° - 0; 30°/60° -2; 60°/90° - 4; 90°/120° - 6; 120°/150° - 8; >150° - 10		
Rotação externa Mão abaixo da cabeça Cotovelo á frente 2 / Cotovelo atrás 4 Mão na nuca Cotovelo á frente 6 / Cotovelo atrás 8 Mão sobre a cabeça cotovelo atrás 10		
Rotação Interna Coxa -0 ; Nádega - 2; Sacrum - 4; L3 - 6; D12 - 8; D7 - 10		
Força Muscular Kg em abdução x2 (max de 12,5 Kg)		
TOTAL		

Anexo A.2 Coloração Hematoxilina-Eosina

1- Desparafinação e hidratação

Xilol 15min

Etanol 100% 5min

Etanol 96% 5min

Etanol 70% 5min

Água 5min

2- Hematoxilina 10min

3- Lavagem em água corrente.

4- Passar rapidamente por álcool clorídrico para diferenciar.

5- Lavar em água corrente durante 5min.

6- 3 passagens por Etanol 70%

7- 4 passagens por Eosina

8- Desidratação

3 passagens por Etanol 70%

Etanol 96% 5min

Etanol 100% 5min

Xilol 10min

9- Montagem das lâminas.

Anexo A.3 Coloração Wright Giemsa

1. Desparafinação e hidratação

Xilol 15min

Etanol 100% 5min

Etanol 96% 5min

Etanol 70% 5min

Água 5min

2. Solução Wright Giemsa durante 5min.

3. Adicionar o *buffer* pH=6.4, aparecendo uma superfície metálica, durante 5min.

4. Lavagem com água destilada

5. Mergulhar com Giemsa (preparado a fresco) durante 5min.

6. Lavagem com água destilada

7. Desidratação

3 passagens por Etanol 70%

Etanol 96% 5min

Etanol 100% 5min

Xilol 10min

8. Montagem das lâminas.

Anexo A.4 Concentração RNA

As amostras de RNA extraídas das células em cultura após as experiências apresentaram as seguintes características:

	Controlos	Traumáticos	Degenerativos
Concentração média (ng/μL)	26,52232	23,257	16,54681
Razão das absorbâncias 260/280 nm	1,914786	2,001333	1,958714

