

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAROLINE HAMMERSCHMITT EDUARDO

EFEITO TERAPÊUTICO DO AGULHAMENTO A SECO EM TENDINITE INDUZIDA
POR COLAGENASE EM RATOS



PALOTINA

2022

CAROLINE HAMMERSCHMITT EDUARDO

EFEITO TERAPÊUTICO DO AGULHAMENTO A SECO EM TENDINITE INDUZIDA
POR COLAGENASE EM RATOS

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, como requisito à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profª Drª Erica Cristina Bueno do Prado Guirro

PALOTINA
2022

Universidade Federal do Paraná. Sistemas de Bibliotecas.
Biblioteca UFPR Palotina.

E24 Eduardo, Caroline Hammerschmitt
Efeito terapêutico do agulhamento a seco em tendinite
induzida por colagenase em ratos / Caroline Hammerschmitt
Eduardo.– Palotina, PR, 2022.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná,
Setor Palotina, PR, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.
Orientadora: Profª Drª Erica Cristina Bueno do Prado Guirro.

1. Agulha. 2. Fisioterapia. 3. Tendinite. I. Guirro, Erica
Cristina Bueno do Prado. II. Universidade Federal
do Paraná. III. Título.

CDU 606

Bibliotecária: Aparecida Pereira dos Santos – CRB 9/1653



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR PALOTINA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOTECNOLOGIA -
40001016083P6

ATA Nº51

ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE MESTRADO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRA EM BIOTECNOLOGIA

No dia vinte e oito de fevereiro de dois mil e vinte e dois às 09:00 horas, na sala Online, Plataforma Microsoft Teams, foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de dissertação da mestranda **CAROLINE HAMMERSCHMITT EDUARDO**, intitulada: **EFEITO TERAPÊUTICO DO AGULHAMENTO A SECO EM TENDINITE INDUZIDA POR COLAGENASE EM RATOS**, sob orientação da Profa. Dra. ERICA CRISTINA BUENO DO PRADO GUIRRO. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação BIOTECNOLOGIA da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: ERICA CRISTINA BUENO DO PRADO GUIRRO (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), KATHERINNE MARIA SPERCOSKI (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), GLADSON RICARDO FLOR BERTOLINI (UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ). A presidência iniciou os ritos definidos pelo Colegiado do Programa e, após exarados os pareceres dos membros do comitê examinador e da respectiva contra argumentação, ocorreu a leitura do parecer final da banca examinadora, que decidiu pela **APROVAÇÃO**. Este resultado deverá ser homologado pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais definidos pelo programa. A outorga de título de mestra está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, ERICA CRISTINA BUENO DO PRADO GUIRRO, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

PALOTINA, 28 de Fevereiro de 2022.

Assinatura Eletrônica

02/03/2022 15:00:44.0

ERICA CRISTINA BUENO DO PRADO GUIRRO

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

02/03/2022 14:29:10.0

KATHERINNE MARIA SPERCOSKI

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

03/03/2022 08:16:34.0

GLADSON RICARDO FLOR BERTOLINI

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ)

RUA PIONEIRO, 2153 - PALOTINA - Paraná - Brasil

CEP 85950-000 - Tel: (44) 3211-8500 - E-mail: mestradiotecufpr@gmail.com

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 157312

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp>
e insira o código 157312



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR PALOTINA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOTECNOLOGIA -
40001016083P6

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação BIOTECNOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **CAROLINE HAMMERSCHMITT EDUARDO** intitulada: **EFEITO TERAPÊUTICO DO AGULHAMENTO A SECO EM TENDINITE INDUZIDA POR COLAGENASE EM RATOS**, sob orientação da Profa. Dra. ERICA CRISTINA BUENO DO PRADO GUIRRO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

PALOTINA, 28 de Fevereiro de 2022.

Assinatura Eletrônica

02/03/2022 15:00:44.0

ERICA CRISTINA BUENO DO PRADO GUIRRO

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

02/03/2022 14:29:10.0

KATHERINNE MARIA SPERCOSKI

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

03/03/2022 08:16:34.0

GLADSON RICARDO FLOR BERTOLINI

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ)

RUA PIONEIRO, 2153 - PALOTINA - Paraná - Brasil

CEP 85950-000 - Tel: (44) 3211-8500 - E-mail: mestradobiotecufpr@gmail.com

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 157312

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 157312

Dedico essa dissertação de mestrado a minha mãe, meu exemplo de mulher e de ser humano, que sempre me apoiou para que eu chegasse até aqui.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela saúde e determinação durante todos os meus anos de estudos.

A minha mãe Roseli, por me apoiar e me auxiliar em tudo durante esses dois anos, amo você.

A professora Erica Guirro, agradeço pela orientação maravilhosa, por toda a paciência e dedicação ao meu trabalho. Muito obrigada por todas as correções, por me motivar e por acreditar em mim desde o início, quando me aceitou como sua orientanda. Eu me sinto sortuda por tê-la por perto.

Aos membros da banca examinadora, Prof^a Katherinne Maria Spencoski, Prof. Gladson Ricardo Flor Bertolini e Prof^a Maristela de Cássia Seudo Lopes, que tão gentilmente aceitaram participar e colaborar com esta dissertação, nesse dia tão importante em minha vida.

Aos colegas de projeto que se tornaram grandes amigos, Liliane de Paula e Fransael Franklyn Araujo, obrigada por tantos ensinamentos, esse projeto não poderia ter uma equipe melhor, eu admiro muito vocês.

Aos alunos de IC que participaram do projeto, Bruna Bitencourt e Andressa Mott. E principalmente ao Mykael Dreveck e Andressa Silva, por participarem de cada etapa e me ensinarem tanto sobre a medicina veterinária.

A Nara Bernardi por fornecer a colagenase e dividir suas experiências.

A todos os profissionais incríveis que auxiliaram em cada etapa, Carolina Fontana, Crisan Smaniotto e Professora Aline de Marco Viott na etapa da histopatologia. Rafael Debiage, Ellen Siepman e Professora Fabiola Fukushima na etapa de anestesia e eutanásia. Cibele Palhari na avaliação ultrassonográfica dos animais.

Ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, ao Setor Palotina e à Universidade Federal do Paraná.

RESUMO

Tendinopatia é o estado clínico no qual há dor, diminuição da função dos tendões e estruturas próximas e edema local ou difuso. O agulhamento a seco (AS) vem trazendo bons resultados para o tratamento de tendinopatia. Nessa técnica são inseridas agulhas hipodérmicas de maneira profunda diretamente no tendão, levando ao sangramento local com a intenção de transformar um processo crônico que não cicatrizou corretamente em um processo agudo. O objetivo do presente estudo foi analisar os efeitos terapêuticos do agulhamento seco na tendinopatia induzida por colagenase no tendão calcâneo. Para o tratamento, 81 animais foram divididos em cinco grupos: GC: Sem injeção de colagenase e sem tratamento; GL: Injeção de colagenase e sem tratamento; GMI: Injeção de colagenase e tratamento com anti-inflamatório não esteroideal precoce; GMII: Injeção de colagenase e tratamento anti-inflamatório não esteroideal tardio; GAS: Injeção de colagenase e tratamento com agulhas secas diretamente na porção média do tendão. Para avaliação foram realizados teste de locomoção (Open Field) no dia (D) 6 e D20, exame ultrassonográfico no D7, D14 e D21 e estudo histológico no D7, D14 e D21. Observou-se no grupo GAS que os animais aumentaram a locomoção na 3ª semana em comparação à 1ª semana. No D21 a quantidade de fibras de colágeno GC e GAS foi superior ao observado em GL, GMI e GMII. A quantidade células inflamatórias por área e a densidade de tenócitos foi maior no D7 que em D21 em GAS. Na avaliação ultrassonográfica, o escore da ecogenicidade no GAS D7 foi menor que o verificado em D14 e D21. No D14, o escore de GAS foi maior que o observado em GMII. A regularidade das fibras tendíneas no GAS em D7 foi maior que o encontrado em D14. Conclui-se que o agulhamento seco em tendinopatias é um método seguro e eficaz em relação a produção de fibras de colágeno, células inflamatórias, tenócitos e aumento da locomoção.

Palavras-chave: Agulha. Fisioterapia. Tendão. Tendinite.

ABSTRACT

Tendinopathy is the clinical state in which there is pain, decreased function of tendons and nearby structures, and local or diffuse swelling. Dry needling (SA) has brought good results for the treatment of tendinopathy. In this technique, hypodermic needles are inserted deeply directly into the tendon, leading to local bleeding with the intention of transforming a chronic process that has not healed properly into an acute process. The aim of the present study was to analyze the therapeutic effects of dry needling on collagenase-induced tendinopathy in the Achilles tendon. For treatment, the animals were divided into five groups: GC: No collagenase injection and no treatment; GL: Collagenase injection and no treatment; GMI: Collagenase injection and early non-steroidal anti-inflammatory treatment; GMII: Collagenase injection and late non-steroidal anti-inflammatory treatment; GAS: Injection of collagenase and treatment with dry needles directly into the middle portion of the tendon. For evaluation, locomotion test (Open Field) was performed on day (D) 6 and D20, ultrasound examination on D7, D14 and D21 and histological study on D7, D14 and D21. It was observed in the GAS group that the animals increased locomotion in the 3rd week compared to the 1st week. On D21, the amount of collagen fibers GC and GAS was higher than that observed in GL, GMI and GMII. The amount of inflammatory cells per area and the density of tendinous cells were higher on D7 than on D21 in GAS. In the ultrasound evaluation, the echogenicity score in GAS D7 was lower than that verified in D14 and D21. On D14, the GAS score was higher than that observed in GMII. The regularity of tendinous fibers in the GAS on D7 was greater than that found on D14. It is concluded that dry needling in tendinopathies is a safe and effective method in relation to the production of collagen fibers, inflammatory cells, tendinous cells and increased locomotion.

Keywords: Needle. Physiotherapy. Tendon. Tendinitis.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - INJEÇÃO DE COLAGENASE NO TERÇO MÉDIO DO TENDÃO CALCÂNEO DE RATO.....	18
FIGURA 2 - AGULHAMENTO SECO EM TENDÃO CALCÂNEO DE RATO.....	19
FIGURA 3 - BASE DE VIDRO PARA REALIZAÇÃO DO TESTE OPEN FIELD.....	20
FIGURA 4 - IMAGEM HISTOLÓGICA DA PROPORÇÃO DE COLÁGENO TIPO I E TIPO III	25

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	NÚMERO DE QUADRADOS PERCORRIDOS NO OPEN FIELD (MÉDIA ± DP) POR RATOS SUBMETIDOS À LESÃO TENDÍNEA EXPERIMENTAL E TRATADOS COM TERAPIA CONVENCIONAL OU COM AGULHAMENTO SECO (GAS).....	22
TABELA 2 -	AVALIAÇÃO DA PORCENTAGEM DA PROPORÇÃO DE COLÁGENO DO TIPO I E TIPO III NOS TENDÕES DE RATOS SUBMETIDOS À LESÃO TENDÍNEA EXPERIMENTAL E TRATADOS COM TERAPIA CONVENCIONAL OU COM AGULHAMENTO SECO (GAS).....	23
TABELA 3 -	VALOR DA MEDIANA (MÍNIMO – MÁXIMO) DO ESCORE DA IRREGULARIDADE DAS FIBRAS DO TENDÃO CALCÂNEO OBSERVADA NO EXAME ULTRASSONOGRÁFICO DE RATOS SUBMETIDOS À LESÃO TENDÍNEA EXPERIMENTAL E TRATADOS COM TERAPIA CONVENCIONAL OU COM AGULHAMENTO SECO (GAS).....	24
TABELA 4 -	VALOR DA MEDIANA (MÍNIMO – MÁXIMO) DO ESCORE DE EDEMA DO TENDÃO CALCÂNEO OBSERVADA NO EXAME ULTRASSONOGRÁFICO DE RATOS SUBMETIDOS À LESÃO TENDÍNEA EXPERIMENTAL E TRATADOS COM TERAPIA CONVENCIONAL OU COM AGULHAMENTO SECO (GAS)	24
TABELA 5 -	AVALIAÇÃO DA PORCENTAGEM DA PROPORÇÃO DE COLÁGENO DO TIPO I E TIPO III NOS TENDÕES DE RATOS SUBMETIDOS À LESÃO TENDÍNEA EXPERIMENTAL E TRATADOS COM TERAPIA CONVENCIONAL OU COM AGULHAMENTO SECO (GAS).....	26
TABELA 6 -	VALOR DA MEDIANA (MÍNIMO – MÁXIMO) DO ESCORE DA ESTRUTURA DAS FIBRAS TENDÍNEAS DE RATOS SUBMETIDOS À LESÃO TENDÍNEA EXPERIMENTAL E TRATADOS COM TERAPIA CONVENCIONAL OU COM AGULHAMENTO SECO (GAS).....	27
TABELA 7 -	VALOR DA MEDIANA (MÍNIMO – MÁXIMO) DO ESCORE DO ARRANJO DAS FIBRAS TENDÍNEAS DE RATOS SUBMETIDOS À LESÃO TENDÍNEA EXPERIMENTAL E TRATADOS COM TERAPIA CONVENCIONAL OU COM AGULHAMENTO SECO (GAS).....	27
TABELA 8 -	VALOR DA MEDIANA (MÍNIMO – MÁXIMO) DO ESCORE DE ARREDONDAMENTO DO NÚCLEO DOS FIBROBLASTOS DE RATOS SUBMETIDOS À LESÃO TENDÍNEA EXPERIMENTAL E TRATADOS COM TERAPIA CONVENCIONAL OU COM AGULHAMENTO SECO (GAS).....	28

TABELA 9 -	VALOR DA MEDIANA (MÍNIMO – MÁXIMO) DO ESCORE DE INFLAMAÇÃO (ÁREA INFILTRADA POR CÉLULAS INFLAMATÓRIAS) DE RATOS SUBMETIDOS À LESÃO TENDÍNEA EXPERIMENTAL E TRATADOS COM TERAPIA CONVENCIONAL OU COM AGULHAMENTO SECO (GAS).....	28
TABELA 10 -	VALOR DA MEDIANA (MÍNIMO – MÁXIMO) DO ESCORE DA NEOANGIOGÊNESE TENDÍNEA DE RATOS SUBMETIDOS À LESÃO TENDÍNEA EXPERIMENTAL E TRATADOS COM TERAPIA CONVENCIONAL OU COM AGULHAMENTO SECO (GAS).....	29
TABELA 11 -	VALOR DA MEDIANA (MÍNIMO – MÁXIMO) DO ESCORE DE DENSIDADE DE FIBROBLASTOS NO TENDÃO DE RATOS SUBMETIDOS À LESÃO TENDÍNEA EXPERIMENTAL E TRATADOS COM TERAPIA CONVENCIONAL OU COM AGULHAMENTO SECO (GAS).....	29

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Contexto e problema	14
1.2. Objetivos.....	16
1.3. Justificativa	16
2. MATERIAIS E MÉTODOS	17
2.1. Aprovações.....	17
2.2. Delineamento de estudo e animais	17
2.3. Indução da tendinite	17
2.4. Grupos experimentais.....	18
2.5. Avaliações	19
2.5.1. Teste de locomoção	19
2.5.2. Exame ultrassonográfico.....	20
2.5.3. Estudo histopatológico	21
2.6. Análise estatística.....	21
3. RESULTADOS.....	22
3.1. Teste de locomoção	22
3.2. Exame Ultrassonográfico.....	22
3.2.1. Ecogenicidade	22
3.2.2. Regularidade das fibras tendíneas	22
3.2.3. Edema do tendão	23
3.3. Exame histopatológico.....	25
3.3.1. Proporção de fibras de colágeno.....	25
3.3.2. Estrutura das fibras tendíneas.....	25
3.3.3. Arranjo das fibras tendíneas.....	25
3.3.4. Arredondamento do núcleo dos fibroblastos	26
3.3.5. Área infiltrada por células inflamatórias	26
3.3.6. Neoangiogênese tendínea.....	26
3.3.7. Densidade de fibroblastos	26
4. DISCUSSÃO	30
5. CONCLUSÃO	34
REFERÊNCIAS.....	35

1. INTRODUÇÃO

1.1. Contexto e problema

Os tendões ligam os músculos aos ossos e têm papel de transformar a força produzida pela contração muscular em movimento, de diminuir o impacto de forças externas e de limitar sobrecargas musculares (LOIACONO et al., 2019). Os tendões são constituídos de tecido conjuntivo, formado por elastina, proteoglicanos, glicoproteínas e em maior quantidade encontram-se tenócitos e colágeno (WINNICKI et al., 2020), sendo que o colágeno tipo I é o principal elemento, encarregado de formar 65% a 80% do tendão (GRINSTEIN; GALLOWAY, 2018).

Em relação a lesões em tendões, há uma discussão em relação à terminologia. Tendinopatia é o estado clínico no qual há dor, diminuição da função dos tendões e estruturas próximas e edema local ou difuso (STOYCHEV et al., 2020). O termo tendinite deve ser utilizado em condições que incluem processo inflamatório, mas segundo Loiacono et al. (2019) a inflamação persiste somente até três semanas e, então, verifica-se degeneração, fazendo com que o termo tendinite acabe entrando em desuso, sendo substituído pelo termo tendinopatia.

As tendinopatias no tendão calcâneo podem ser classificadas de acordo com o local afetado, portanto, a tendinopatia de inserção envolve a porção inferior; tendinopatia na porção média; e tendinopatia da junção musculotendínea que envolve a porção superior do tendão. O tipo mais frequente é a tendinopatia na porção média, devido à diminuição da circulação sanguínea local (SILBERNAGEL et al., 2020). O tendão calcâneo absorve a carga mais elevada do corpo, recebendo até 10 vezes do peso corporal durante saltos ou corridas e como sua função é exigente, o acometimento é frequente em pessoas que realizem qualquer nível de atividades físicas (DEDERER; TENNANT, 2019).

A etiologia da tendinopatia do tendão calcâneo está associada a fatores intrínsecos e extrínsecos. Os fatores intrínsecos incluem diminuição da vascularização tendínea, alterações gastrocnêmio-sóleo, faixa etária, gênero, peso corporal, disfunções metabólicas e alterações nas articulações do pé. Os fatores extrínsecos estão relacionados a erros durante exercícios físicos ou esforço repetitivo sobre o tendão. O esforço repetitivo no tendão gera micro traumas, excedendo a habilidade reparadora do tendão (STANIA et al., 2019).

A tendinopatia é caracterizada por uma resposta de cura incorreta, com ruptura das fibras de colágeno e degeneração dos tenócitos (MAFFULLI et al., 2020). Histologicamente, em amostras percebe-se o aumento na produção do colágeno tipo II e tipo III, sendo que o colágeno tipo III é menos resistente à tração e conseqüentemente, faz com que o tendão esteja mais propenso a rupturas durante a cicatrização (DEDERER; TENNANT, 2019). A degeneração pode evoluir para calcificações ou nódulos palpáveis no tendão, diminuindo mobilidade e força deste (DEDERER; TENNANT, 2019).

Por ser uma patologia complexa, muitas vezes os pacientes manifestam insatisfação com os resultados (JAYASEELAN et al., 2021) e, portanto, inúmeros tratamentos vêm sendo estudados, já que medicamentos anti-inflamatórios não esteroidais e corticoides não são benéficos a longo prazo (KREY et al., 2015). Quando essas alternativas conservadoras falham são necessárias outras opções que estimulam a regeneração dos tecidos (KREY et al., 2015). Alguns desses tratamentos incluem terapia extracorpórea por ondas de choque (IRBY et al., 2020), plasma rico em plaquetas (PRP) (FARES et al., 2021) e agulhamentos (LUNGU et al., 2018).

O agulhamento a seco (AS) vem trazendo bons resultados (JAYASEELAN et al., 2021; KREY et al., 2015; LUNGU et al., 2018). Nessa técnica, para o tratamento de tendinopatia são inseridas agulhas hipodérmicas de maneira profunda, podendo ser aplicadas de três maneiras: 1) agulhamento seco dos músculos adjacentes (FATIH; NURDAN, 2019); 2) agulhamento do tendão de maneira repetitiva (LUNGU et al., 2018) e 3) agulhamento do tendão de maneira estática (UYGUR et al., 2021). O agulhamento do tendão normalmente é guiado por ultrassonografia e pode ser realizado associado à injeção de corticoides ou PRP, sendo essa técnica denominada como agulhamento úmido (JAYASEELAN; FALLER; AVERY, 2021).

O mecanismo de ação incitado pelo AS ainda necessita estudos (JAYASEELAN, et al., 2021). Quando a agulha entra em contato com o tendão causa micro traumas, levando ao sangramento local com a intenção de transformar um processo crônico que não cicatrizou corretamente em um processo agudo. Áreas que apresentam degeneração, voltam à primeira fase da cicatrização, onde é liberado fatores de crescimento, fatores inflamatórios e proliferação fibroblástica (LUNGU et al., 2018).

A avaliação histológica e imuno-histoquímica de tendões saudáveis de ratos submetidos ao agulhamento seco mostrou maior efetividade nas propriedades

mecânicas, aumento de inflamação, fluxo sanguíneo e síntese de colágeno tipo III no grupo agulhado em comparação ao grupo não agulhado (RIGGIN et al., 2019). Em uma revisão sistemática realizada recentemente sobre o AS em tendões, 10 estudos foram incluídos e todos apresentaram melhora estatística da dor, função e desempenho muscular (JAYASEELAN et al., 2021). Em um estudo de meta-análise, Krey et al. (2015), concluíram que o PRP e AS no tratamento de tendinopatia, se mostrou eficiente quando avaliado o desempenho funcional após 3 meses de tratamento, não apresentando diferença estatística entre os dois tratamentos.

1.2. Objetivos

Objetivo Geral

Analisar os efeitos terapêuticos do agulhamento seco na tendinite induzida no tendão calcâneo.

Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos do agulhamento seco na tendinite induzida no tendão calcâneo por meio da análise da locomoção;
- Avaliar os efeitos do agulhamento seco na tendinite induzida no tendão calcâneo por meio de exame ultrassonográfico;
- Avaliar os efeitos do agulhamento seco na tendinite induzida no tendão calcâneo por meio de exame histopatológico.

1.3. Justificativa

As tendinites são frequentes, prejudicam a qualidade do movimento e o bem-estar do paciente. Diferentes tratamentos podem ser indicados em tendinites, mas a possibilidade de se identificar um protocolo terapêutico livre de fármacos e de intervenções invasivas é uma opção interessante.

O agulhamento seco tem se mostrado útil na recuperação de casos de tendinites, mas a literatura ainda carece de informações importantes. A realização de estudos controlados com agulhamento seco em tendinites pode responder dúvidas ainda existentes para que essa técnica seja ou não regularmente empregada nos pacientes portadores desse tipo de lesão.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Aprovações

O experimento iniciou após o projeto ter sido aprovado pelo Departamento de Ciências Veterinárias, Comitê Setorial de Pesquisa, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor Palotina da UFPR (Protocolo n. 43/2020).

2.2. Delineamento de estudo e animais

O estudo foi casualizado e cego, ou seja, os grupos foram distribuídos de maneira aleatória e o avaliador não sabia qual grupo os animais pertenciam.

Utilizou-se 81 ratos Wistar, com 8 semanas de idade, produzidos no Biotério Experimental de Roedores do Hospital Veterinário do Setor Palotina da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno com ambiente climatizado ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), sob ciclo natural claro/escuro de 12 horas e durante todo o experimento receberam ração peletizada e água *ad libitum*.

2.3. Indução da tendinite

No dia zero (D0), os animais foram submetidos à anestesia geral com máscara, na qual ocorreu indução e manutenção com isoflurano diluído em 100% de O₂ em sistema aberto.

Em seguida, realizou-se antissepsia com digliconato de clorexidina 2% na região do tendão calcâneo direito. Com o auxílio do ultrassom, procedeu-se uma injeção intratendínea de colagenase (1 mg/mL; SIGMA; C-0130) no terço médio do tendão, sendo a agulha introduzida de forma perpendicular (figura 1).

Figura 1. Injeção de collagenase no terço médio do tendão calcâneo de rato.



Fonte: dados da pesquisa

2.4. Grupos experimentais

Após a indução da tendinite, os animais retornaram às caixas e foram aleatoriamente divididos em cinco grupos experimentais, com proporção equivalente de machos e fêmeas:

- Grupo controle (GC, n=15): não recebeu injeção de collagenase e não recebeu tratamento.
- Grupo lesão (GL, n=15): recebeu a injeção de collagenase e não recebeu nenhum tratamento.
- Grupo Meloxicam I (GMI, n=15): recebeu a injeção de collagenase e houve tratamento com anti-inflamatório não esteroidal meloxicam (2mg/kg, SID, via subcutânea). A primeira aplicação foi realizada 2h após a injeção de collagenase e foi repetida a cada 24h por 5 dias.
- Grupo Meloxicam II (GMII, n=15): recebeu a injeção de collagenase e houve tratamento com anti-inflamatório não esteroidal meloxicam (2mg/kg, SID, via subcutânea). A primeira aplicação realizada 48h após a injeção de collagenase e foi repetida a cada 24h por 5 dias.
- Grupo agulhamento seco (GAS, n=21): recebeu a injeção de collagenase e tratamento com agulhas secas. Foi inserida uma agulha de maneira profunda, com angulação de 90° até atingir o tendão calcâneo em seu terço médio (figura

2), guiada por ultrassonografia. Foi utilizada agulha de acupuntura estéril (0,20 mm de diâmetro e 30 mm de comprimento), que permaneceu no ponto por 5 minutos após sua inserção. Para realizar o procedimento, os animais foram contidos de maneira manual, sem anestesia e posicionados em decúbito ventral. O tratamento foi iniciado após 48 horas da lesão, em fase subaguda. Foram realizadas quatro sessões, com intervalo de 48 horas entre elas (D2, D4, D6, D8), sempre no período matutino.

Figura 2. Agulhamento seco em tendão calcâneo de rato.



Fonte: dados da pesquisa

2.5. Avaliações

Todas as avaliações foram realizadas de modo cego, ou seja, o avaliador desconhecia a qual tratamento o animal pertencia.

2.5.1. Teste de locomoção

Para avaliação da locomoção foi realizado o teste de Open Field em D6 (1ª semana) e D20 (3ª semana). Nesse teste, os animais são individualmente colocados em uma base de vidro de 75cmx75cm com 25 divisões ao fundo, de modo a formar quadrados de 15cmx15cm (figura 3). As laterais da base são fechadas para que o animal não saia e nem perca a atenção

O animal foi solto no quadrado central e para análise de sua atividade exploratória foram contabilizados quantos quadrados o animal percorreu no período de 5 minutos. O quadrado só era contabilizado quando todas as patas do animal cruzassem a linha deste.

Finalizado o teste, o animal foi retirado e a base foi higienizada com álcool a 70% antes da entrada do animal seguinte.

Figura 3. Base de vidro para realização do teste Open Field.



Fonte: dados da pesquisa

2.5.2. Exame ultrassonográfico

Em D7, D14 e D21, um Médico Veterinário com experiência em imagiologia realizou o exame ultrassonográfico dos tendões dos animais.

Em plano longitudinal, foi avaliada a ecogenicidade (0= hipoecoico, 1= normal, hiperecoico= 2), a regularidade das fibras (0= irregular, 1= discretamente irregular, 2= parcialmente irregular, 3= regular) e a presença de edema (0 = ausente, 1= presente).

2.5.3. Estudo histopatológico

Em D7, D14 e D21, um terço dos animais de cada grupo foi submetido à eutanásia com sobredose de isoflurano em cuba plástica hermeticamente fechada. Na sequência, o tendão lesionado e colocado em formol tamponado a 10% até seu processamento histológico.

As lâminas preparadas foram submetidas a duas colorações distintas. Com a coloração picrossirius foi avaliada a quantidade de colágeno do tipo I e tipo III através de um microscópio de luz polarizada, com lente de 40x, sendo os resultados analisados pelo software Image J.

As lâminas coradas com hematoxilina-eosina foram submetidas à microscopia óptica, com aumento de 400x e verificou-se o escore de:

- área infiltradas por células inflamatórias (0= <10%, 1= 10-20%, 2= 20-30%, 3= >30%);
- estrutura das fibras tendíneas (0= contínua, fibra longa, 1= ligeiramente fragmentada, 2= moderadamente fragmentada, 3= severamente fragmentada);
- arranjo das fibras tendíneas (0= compactadas e paralelas, 1= ligeiramente soltas e onduladas, 2= moderadamente soltas, onduladas e cruzadas umas sobre as outras, 3= sem padrão identificado);
- arredondamento do núcleo de fibroblastos (0= células longas em forma de fuso, 1= ligeiramente arredondadas, 2= moderadamente arredondadas, 3= severamente arredondadas);
- neoangiogênese (0= <10%, 1= 10-20%, 2= 20-30%, 3= >30%);
- densidade de fibroblastos (0= normal, 1= ligeiramente aumentada, 2= moderadamente aumentada, 3= severamente aumentada).

2.6. Análise estatística

Os dados paramétricos foram analisados por ANOVA de uma via, teste t com $p < 0,05$, seguido por Tukey, com $p < 0,05$. Os dados não paramétricos foram submetidos ao teste Kruskal Wallis, com $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. Teste de locomoção

Entre tempos, observou-se no grupo GAS que os animais aumentaram a locomoção na 3ª semana em comparação à 1ª semana. Não houve alterações significativas entre grupos (Tabela 1).

Tabela 1. Número de quadrados percorridos no Open Field (média \pm dp) por ratos submetidos à lesão tendínea experimental e tratados com terapia convencional ou com agulhamento seco (GAS).

Grupo	Semana de tratamento		p
	1ª semana	3ª semana	
GC	150,9 \pm 47,7 ^{Aa}	165,5 \pm 40,9 ^{Aa}	0,364
GL	148,5 \pm 49,2 ^{Aa}	154,4 \pm 27,5 ^{Aa}	0,745
GMI	136,4 \pm 45,8 ^{Aa}	139,4 \pm 24,7 ^{Aa}	0,901
GMII	145,2 \pm 15,7 ^{Aa}	139,4 \pm 18,6 ^{Aa}	0,608
GAS	139,6 \pm 22,9 ^{Aa}	158,6 \pm 14,7 ^{Ba}	0,038
p	0,961	0,389	---

Sendo: Letras maiúsculas sobrescritas diferentes indicam diferença entre colunas (teste t, $p < 0,05$); letras minúsculas sobrescritas diferentes indicam diferença entre linhas (ANOVA de uma via, $p < 0,05$). GC – sem injeção de colagenase intratendínea e sem tratamento; GL - injeção de colagenase intratendínea e sem tratamento; GMI – injeção de colagenase intratendínea e recebeu meloxicam 0,2% 2mg/kg SID, 5 dias a partir de D0; GMII – injeção de colagenase intratendínea e recebeu meloxicam 0,2% 2mg/kg SID, 5 dias a partir de D2.

3.2. Exame Ultrassonográfico

3.2.1. Ecogenicidade

Entre tempos, que no GAS o escore encontrado em D7 foi menor que o verificado em D14 e D21. Entre grupos, verificou-se em D7 que o escore de GC foi maior que o de GAS; e em D14, o escore de GAS foi maior que o observado em GMII (tabela 2).

3.2.2. Regularidade das fibras tendíneas

Entre tempos, observou-se que o escore encontrado em GC no D7 foi menor que o verificado em D14 e em D21; e o escore de GAS em D7 foi maior que o encontrado em D14.

Na comparação entre tratamentos, em D14 e em D21 o escore observado em GC foi maior que o verificado em GL (tabela 3).

3.2.3. Edema do tendão

Na comparação entre tempos, o escore observado em GL no D7 foi maior que o escore encontrado em D21. Não houve diferença na comparação entre os tratamentos (Tabela 4).

Tabela 2. Valor da mediana (mínimo – máximo) do escore da ecogenicidade do tendão calcâneo observada no exame ultrassonográfico de ratos submetidos à lesão tendínea experimental e tratados com terapia convencional ou com agulhamento seco (GAS).

Grupo	Dias de tratamento			p
	D7	D14	D21	
GC	1 (1-1) ^{Aa}	1 (1-1) ^{Aab}	1 (1-1) ^{Aa}	1,000
GL	0 (0-0) ^{Aab}	0 (0-2) ^{Aab}	0 (0-2) ^{Aa}	0,311
GMI	0 (0-1) ^{Aab}	0 (0-2) ^{Aab}	0 (0-1) ^{Aa}	0,985
GMII	0 (0-0) ^{Aab}	0 (0-0) ^{Ab}	0 (0-1) ^{Aa}	0,116
GAS	0 (0-0) ^{Ab}	2 (2-2) ^{Ba}	0 (0-1) ^{Ba}	<0,001
p	<0,001	0,002	0,101	---

Sendo: Letras maiúsculas sobrescritas diferentes indicam diferença entre colunas (teste t, $p < 0,05$); letras minúsculas sobrescritas diferentes indicam diferença entre linhas (ANOVA de uma via, $p < 0,05$). GC – sem injeção de colagenase intratendínea e sem tratamento; GL - injeção de colagenase intratendínea e sem tratamento; GMI – injeção de colagenase intratendínea e recebeu meloxicam 0,2% 2mg/kg SID, 5 dias a partir de D0; GMII – injeção de colagenase intratendínea e recebeu meloxicam 0,2% 2mg/kg SID, 5 dias a partir de D2.

Tabela 3. Valor da mediana (mínimo – máximo) do escore da irregularidade das fibras do tendão calcâneo observada no exame ultrassonográfico de ratos submetidos à lesão tendínea experimental e tratados com terapia convencional ou com agulhamento seco (GAS).

Grupo	Dias de tratamento			p
	D7	D14	D21	
GC	1 (1-1) ^{Aa}	3 (2-3) ^{Ba}	3 (2-3) ^{Ba}	0,005
GL	0 (0-3) ^{Aa}	0 (0-2) ^{Ab}	1 (0-2) ^{Ab}	0,621
GMI	2 (1-3) ^{Aa}	2 (0-3) ^{Aab}	2 (1-3) ^{Aab}	0,840
GMII	3 (0-3) ^{Aa}	1 (1-2) ^{Aab}	2 (2-3) ^{Aab}	0,058
GAS	3 (1-3) ^{Aa}	1 (0-2) ^{Bab}	2 (2-3) ^{ABab}	0,011
p	0,055	0,009	0,019	---

Sendo: Letras maiúsculas sobrescritas diferentes indicam diferença entre colunas (teste t, $p < 0,05$); letras minúsculas sobrescritas diferentes indicam diferença entre linhas (ANOVA de uma via, $p < 0,05$). GC – sem injeção de collagenase intratendínea e sem tratamento; GL - injeção de collagenase intratendínea e sem tratamento; GMI – injeção de collagenase intratendínea e recebeu meloxicam 0,2% 2mg/kg SID, 5 dias a partir de D0; GMII – injeção de collagenase intratendínea e recebeu meloxicam 0,2% 2mg/kg SID, 5 dias a partir de D2.

Tabela 4. Valor da mediana (mínimo – máximo) do escore de edema do tendão calcâneo observada no exame ultrassonográfico de ratos submetidos à lesão tendínea experimental e tratados com terapia convencional ou com agulhamento seco (GAS).

Grupo	Dias de tratamento			p
	D7	D14	D21	
GC	0 (0-0) ^{Aa}	0 (0-0) ^{Aa}	0 (0-0) ^{Aa}	1,000
GL	1 (0-1) ^{Aa}	0 (0-0) ^{ABa}	0 (0-0) ^{Ba}	0,030
GMI	0 (0-1) ^{Aa}	0 (0-0) ^{Aa}	0 (0-0) ^{Aa}	0,116
GMII	0 (0-1) ^{Aa}	0 (0-0) ^{Aa}	0 (0-0) ^{Aa}	0,116
GAS	0 (0-1) ^{Aa}	0 (0-0) ^{Aa}	0 (0-0) ^{Aa}	0,122
p	0,378	1,000	1,000	---

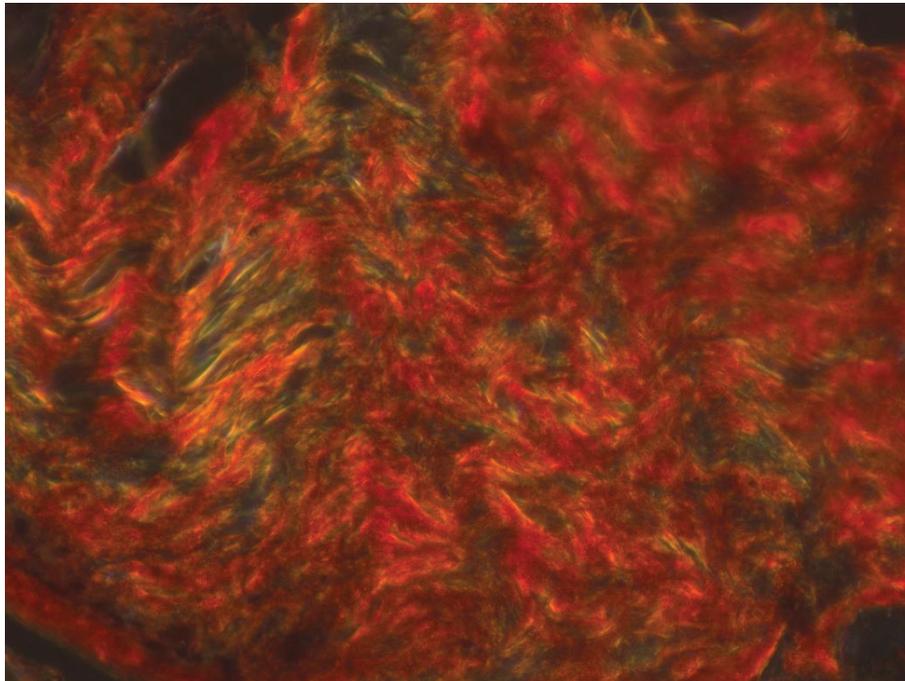
Sendo: Letras maiúsculas sobrescritas diferentes indicam diferença entre colunas (teste t, $p < 0,05$); letras minúsculas sobrescritas diferentes indicam diferença entre linhas (ANOVA de uma via, $p < 0,05$). GC – sem injeção de collagenase intratendínea e sem tratamento; GL - injeção de collagenase intratendínea e sem tratamento; GMI – injeção de collagenase intratendínea e recebeu meloxicam 0,2% 2mg/kg SID, 5 dias a partir de D0; GMII – injeção de collagenase intratendínea e recebeu meloxicam 0,2% 2mg/kg SID, 5 dias a partir de D2.

3.3. Exame histopatológico

3.3.1. Proporção de fibras de colágeno

Entre tempos, verificou-se alteração significativa apenas em GMI, quando a proporção de fibras de colágeno em D7 foi maior que a observada em D21. Entre tratamentos, em D7 a quantidade de fibras de colágeno de GC foi maior que a de GL e GAS; em D14 o valor de GC foi maior que o de GMI e GMI; em D21 verificou-se mais fibras de colágeno em GC e GAS do que em GL, GMI e GMII (Tabela 5) (Figura 4).

Figura 4. Imagem histológica da proporção de colágeno tipo I e tipo III



Fonte: dados da pesquisa

3.3.2. Estrutura das fibras tendíneas

Entre tempos não houve diferença. Entre tratamentos, verificou-se em D21 que o escore observado em GMI foi maior que o verificado em GAS (tabela 6).

3.3.3. Arranjo das fibras tendíneas

Entre tempos, o escore de GMII em D7 foi maior que o verificado em D14. Entre tratamentos, em D14 o escore de GMI foi maior que o de GMII (tabela 7).

3.3.4. Arredondamento do núcleo dos fibroblastos

Na comparação entre tempos, que GAS o escore observado em D7 foi maior que o verificado em D21. Entre tratamentos, em D21, o escore verificado em GMI foi maior que o de GL e GAS (tabela 8).

3.3.5. Área infiltrada por células inflamatórias

Entre tempos, que o escore de GAS em D7 foi maior que em D21. Ao comparar os tratamentos, não se verificou diferença significativa (tabela 9).

3.3.6. Neoangiogênese tendínea

Não mostrou diferença na comparação entre tempos. Na comparação entre grupos, em D21 verificou-se que de GMI foi maior que o de GL (tabela 10).

3.3.7. Densidade de fibroblastos

Na comparação entre tempos, o escore de GAS em D7 foi maior que o verificado em D21. Na comparação entre os tratamentos não houve diferença significativa (tabela 11).

Tabela 5. Avaliação da porcentagem da proporção de colágeno do tipo I e tipo III nos tendões de ratos submetidos à lesão tendínea experimental e tratados com terapia convencional ou com agulhamento seco (GAS).

Grupo	Dias de tratamento			p
	D7	D14	D21	
GC	73,4 ± 2,7 ^{Aa}	72,4 ± 1,7 ^{Aa}	72,4 ± 4,2 ^{Aa}	0,843
GL	62,5 ± 5,9 ^{Ab}	68,6 ± 1,1 ^{Aab}	62,5 ± 5,4 ^{Ab}	0,094
GMI	68,6 ± 0,9 ^{Aab}	63,7 ± 3,3 ^{ABb}	58,9 ± 7,2 ^{Bb}	0,020
GMIl	65,8 ± 4,3 ^{Aab}	63,3 ± 4,4 ^{Ab}	61,1 ± 1,3 ^{Ab}	0,162
GAS	62,5 ± 6,8 ^{Ab}	66,5 ± 6,5 ^{Aab}	70,3 ± 2,6 ^{Aa}	0,058
p	0,07	0,015	<0,001	---

Sendo: Letras maiúsculas sobrescritas diferentes indicam diferença entre colunas (teste t, p<0,05); letras minúsculas sobrescritas diferentes indicam diferença entre linhas (ANOVA de uma via, p<0,05). GC – sem injeção de collagenase intratendínea e sem tratamento; GL - injeção de collagenase intratendínea e sem tratamento; GMI – injeção de collagenase intratendínea e recebeu meloxicam 0,2% 2mg/kg SID, 5 dias a partir de D0; GMIl – injeção de collagenase intratendínea e recebeu meloxicam 0,2% 2mg/kg SID, 5 dias a partir de D2.

Tabela 6. Valor da mediana (mínimo – máximo) do escore da estrutura das fibras tendíneas de ratos submetidos à lesão tendínea experimental e tratados com terapia convencional ou com agulhamento seco (GAS).

Grupo	Dias de tratamento			p
	D7	D14	D21	
GC	1 (0-2) ^{Aa}	1 (1-2) ^{Aa}	1 (0-3) ^{Aab}	0,691
GL	2 (1-2) ^{Aa}	1 (1-2) ^{Aa}	1 (0-2) ^{Aab}	0,493
GMI	1 (1-2) ^{Aa}	2 (1-2) ^{Aa}	2 (1-3) ^{Aa}	0,178
GMII	1 (1-2) ^{Aa}	1 (1-2) ^{Aa}	1 (0-2) ^{Aab}	0,819
GAS	1 (0-2) ^{Aa}	1 (1-2) ^{Aa}	1 (0-1) ^{Ab}	0,071
p	0,641	0,649	0,037	---

Sendo: Letras maiúsculas sobrescritas diferentes indicam diferença entre colunas (teste t, $p < 0,05$); letras minúsculas sobrescritas diferentes indicam diferença entre linhas (ANOVA de uma via, $p < 0,05$). GC – sem injeção de collagenase intratendínea e sem tratamento; GL - injeção de collagenase intratendínea e sem tratamento; GMI – injeção de collagenase intratendínea e recebeu meloxicam 0,2% 2mg/kg SID, 5 dias a partir de D0; GMII – injeção de collagenase intratendínea e recebeu meloxicam 0,2% 2mg/kg SID, 5 dias a partir de D2.

Tabela 7. Valor da mediana (mínimo – máximo) do escore do arranjo das fibras tendíneas de ratos submetidos à lesão tendínea experimental e tratados com terapia convencional ou com agulhamento seco (GAS).

Grupo	Dias de tratamento			p
	D7	D14	D21	
GC	0 (0-2) ^{Aa}	1 (0-2) ^{Aab}	2 (0-3) ^{Aa}	0,305
GL	2 (0-2) ^{Aa}	1 (1-3) ^{Aab}	1 (0-2) ^{Aa}	0,531
GMI	2 (1-3) ^{Aa}	2 (1-3) ^{Aa}	2 (0-3) ^{Aa}	0,948
GMII	1 (1-2) ^{Aa}	0 (0-1) ^{ABb}	1 (1-1) ^{Ba}	0,035
GAS	1 (0-3) ^{Aa}	1 (1-3) ^{Aab}	1 (0-2) ^{Aa}	0,399
p	0,466	0,041	0,407	---

Sendo: Letras maiúsculas sobrescritas diferentes indicam diferença entre colunas (teste t, $p < 0,05$); letras minúsculas sobrescritas diferentes indicam diferença entre linhas (ANOVA de uma via, $p < 0,05$). GC – sem injeção de collagenase intratendínea e sem tratamento; GL - injeção de collagenase intratendínea e sem tratamento; GMI – injeção de collagenase intratendínea e recebeu meloxicam 0,2% 2mg/kg SID, 5 dias a partir de D0; GMII – injeção de collagenase intratendínea e recebeu meloxicam 0,2% 2mg/kg SID, 5 dias a partir de D2.

Tabela 8. Valor da mediana (mínimo – máximo) do escore de arredondamento do núcleo dos fibroblastos de ratos submetidos à lesão tendínea experimental e tratados com terapia convencional ou com agulhamento seco (GAS).

Grupo	Dias de tratamento			p
	D7	D14	D21	
GC	2 (0-2) ^{Aa}	1 (0-2) ^{Aa}	2 (1-2) ^{Aab}	0,442
GL	2 (1-3) ^{Aa}	1 (0-3) ^{Aa}	1 (0-1) ^{Ab}	0,158
GMI	2 (1-3) ^{Aa}	2 (0-3) ^{Aa}	3 (1-3) ^{Aa}	0,656
GMII	1 (0-1) ^{Aa}	1 (1-2) ^{Aa}	1 (1-2) ^{Aab}	0,122
GAS	2 (0-3) ^{Aa}	1 (1-3) ^{ABa}	0 (0-2) ^{Bb}	0,037
p	0,070	0,670	0,001	---

Sendo: Letras maiúsculas sobrescritas diferentes indicam diferença entre colunas (teste t, $p < 0,05$); letras minúsculas sobrescritas diferentes indicam diferença entre linhas (ANOVA de uma via, $p < 0,05$). GC – sem injeção de collagenase intratendínea e sem tratamento; GL - injeção de collagenase intratendínea e sem tratamento; GMI – injeção de collagenase intratendínea e recebeu meloxicam 0,2% 2mg/kg SID, 5 dias a partir de D0; GMII – injeção de collagenase intratendínea e recebeu meloxicam 0,2% 2mg/kg SID, 5 dias a partir de D2.

Tabela 9. Valor da mediana (mínimo – máximo) do escore de inflamação (área infiltrada por células inflamatórias) de ratos submetidos à lesão tendínea experimental e tratados com terapia convencional ou com agulhamento seco (GAS).

Grupo	Dias de tratamento			p
	D7	D14	D21	
GC	0 (0-0) ^{Aa}	0 (0-0) ^{Aa}	0 (0-0) ^{Aa}	1,000
GL	1 (0-3) ^{Aa}	0 (0-1) ^{Aa}	0 (0-0) ^{Aa}	0,131
GMI	1 (0-3) ^{Aa}	0 (0-2) ^{Aa}	0 (0-1) ^{Aa}	0,133
GMII	0 (0-3) ^{Aa}	0 (0-1) ^{Aa}	0 (0-1) ^{Aa}	0,638
GAS	1 (0-3) ^{Aa}	0 (0-0) ^{ABa}	0 (0-0) ^{Ba}	0,010
p	0,191	0,226	0,472	---

Sendo: Letras maiúsculas sobrescritas diferentes indicam diferença entre colunas (teste t, $p < 0,05$); letras minúsculas sobrescritas diferentes indicam diferença entre linhas (ANOVA de uma via, $p < 0,05$). GC – sem injeção de collagenase intratendínea e sem tratamento; GL - injeção de collagenase intratendínea e sem tratamento; GMI – injeção de collagenase intratendínea e recebeu meloxicam 0,2% 2mg/kg SID, 5 dias a partir de D0; GMII – injeção de collagenase intratendínea e recebeu meloxicam 0,2% 2mg/kg SID, 5 dias a partir de D2.

Tabela 10. Valor da mediana (mínimo – máximo) do escore da neoangiogênese tendínea de ratos submetidos à lesão tendínea experimental e tratados com terapia convencional ou com agulhamento seco (GAS).

Grupo	Dias de tratamento			p
	D7	D14	D21	
GC	1 (0-3) ^{Aa}	0 (0-1) ^{Aa}	0 (0-2) ^{Aab}	0,422
GL	1 (0-3) ^{Aa}	1 (0-3) ^{Aa}	0 (0-1) ^{Ab}	0,220
GMI	2 (0-3) ^{Aa}	3 (0-3) ^{Aa}	2 (1-3) ^{Aa}	0,839
GMII	1 (0-3) ^{Aa}	0 (0-1) ^{Aa}	0 (0-2) ^{Aab}	0,359
GAS	1 (0-3) ^{Aa}	0 (0-0) ^{Aa}	0 (0-1) ^{Aab}	0,055
p	0,929	0,057	0,035	---

Sendo: Letras maiúsculas sobrescritas diferentes indicam diferença entre colunas (teste t, $p < 0,05$); letras minúsculas sobrescritas diferentes indicam diferença entre linhas (ANOVA de uma via, $p < 0,05$). GC – sem injeção de collagenase intratendínea e sem tratamento; GL - injeção de collagenase intratendínea e sem tratamento; GMI – injeção de collagenase intratendínea e recebeu meloxicam 0,2% 2mg/kg SID, 5 dias a partir de D0; GMII – injeção de collagenase intratendínea e recebeu meloxicam 0,2% 2mg/kg SID, 5 dias a partir de D2.

Tabela 11. Valor da mediana (mínimo – máximo) do escore de densidade de fibroblastos no tendão de ratos submetidos à lesão tendínea experimental e tratados com terapia convencional ou com agulhamento seco (GAS).

Grupo	Dias de tratamento			p
	D7	D14	D21	
GC	1 (0-2) ^{Aa}	1 (0-2) ^{Aa}	1 (0-2) ^{Aa}	0,921
GL	1 (1-2) ^{Aa}	1 (1-3) ^{Aa}	1 (0-1) ^{Aa}	0,092
GMI	1 (1-3) ^{Aa}	2 (0-3) ^{Aa}	1 (1-3) ^{Aa}	0,968
GMII	0 (0-1) ^{Aa}	0 (0-1) ^{Aa}	0 (0-1) ^{Aa}	0,756
GAS	2 (0-3) ^{Aa}	1 (0-3) ^{ABa}	0 (0-1) ^{Ba}	0,047
p	0,056	0,315	0,123	---

Sendo: Letras maiúsculas sobrescritas diferentes indicam diferença entre colunas (teste t, $p < 0,05$); letras minúsculas sobrescritas diferentes indicam diferença entre linhas (ANOVA de uma via, $p < 0,05$). GC – sem injeção de collagenase intratendínea e sem tratamento; GL - injeção de collagenase intratendínea e sem tratamento; GMI – injeção de collagenase intratendínea e recebeu meloxicam 0,2% 2mg/kg SID, 5 dias a partir de D0; GMII – injeção de collagenase intratendínea e recebeu meloxicam 0,2% 2mg/kg SID, 5 dias a partir de D2.

4. DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou a eficácia terapêutica do agulhamento seco ao promover maior produção de fibras de colágeno, controle nas fases da cicatrização e melhora da locomoção dos animais. Em uma revisão sistemática, todos os 4 estudos selecionados (STENHOUSE et al., 2013; BELL et al., 2013; RHA et al., 2013; MISHRA et al., 2014) mostraram melhora significativa na dor em pacientes com tendinopatia de calcâneo tratados com AS (KREY et al., 2015). Quando comparado com técnicas eficazes, como a injeção de plasma rico em plaquetas e corticoide, todos os grupos melhoraram, sem diferença estatística (TSIKOPOULOS et al., 2016; UYGUR et al., 2021).

A locomoção é um importante parâmetro a ser avaliado, pois a dor na tendinopatia de calcâneo resulta principalmente do movimento de dorsiflexão do tornozelo e sobrecarga sobre o tendão e ambos ocorrem durante a marcha (SILBERNAGEL et al., 2020). No presente estudo observou-se que os animais tratados com agulhamento seco após indução de tendinopatia apresentaram melhora na locomoção e esse achado sugere que o tratamento foi efetivo no controle da dor dos animais. É importante ressaltar que o teste de Open Field geralmente é utilizado em avaliações comportamentais (NAKAGAWA et al., 2020; SHIEH; YANG, 2020), mas mostrou-se uma ferramenta simples e interessante para avaliar a locomoção de roedores submetidos à tendinopatia experimental, visto que animais com dores tendem a caminhar menos dentro da área (KRAEUTER et al., 2019).

A ultrassonografia é uma técnica de diagnóstico bem aceita em casos de tendinopatias (MAFFULLI et al., 2020) e, portanto, sua utilização neste estudo foi fundamental para guiar a aplicação de colagenase intratendínea e para avaliar a evolução da reparação das fibras tendíneas. No exame ultrassonográfico, a presença de processo inflamatório é representada por imagem hipoecoica (MESSINA et al., 2016). Observou-se que o agulhamento seco reduziu a presença de imagem hipoecoica, mas não com o mesmo potencial que o anti-inflamatório. Esse achado corrobora Riggini et al. (2019) que verificaram que o agulhamento seco promove redução da inflamação e cura mais precoce em tendinopatias, o que favorece o rápido retorno das propriedades do tendão.

Em relação à regularidade das fibras tendíneas, no exame ultrassonográfico verificou-se que no grupo tratado com agulhamento seco a irregularidade foi maior em D7 do que em D21, evidenciando que o tratamento beneficia a remodelação. Todavia,

tal tratamento não se mostrou significativamente superior aos demais tratamentos. Esse achado está de acordo com o que foi observado por Riggin et al. (2019), mesmo porque é a partir dos 21 dias após uma lesão tendínea, que o remodelamento progressivo é mais evidente e torna o tecido mais resistente, organizado e alinhado (GRINSTEIN; GALLOWAY, 2018), porém o estudo foi finalizado aos 21 dias e não foi possível acompanhar o remodelamento tardio das fibras tendíneas.

Na avaliação histopatológica houve uma série de achados que merecem ser discutidos. O processo inflamatório dura em média sete dias e neste período são sintetizados os componentes da matriz extracelular do tendão (GRINSTEIN; GALLOWAY, 2018). Ainda assim, o processo inflamatório é importante por formar o tecido de granulação e, conseqüentemente, aumentar a força do tendão (YEO et al., 2016). Apesar disso, a resposta inflamatória exacerbada acarreta prejuízos como: danos teciduais, remodelação desregulada da matriz e cicatrização com fibrose, necessitando assim, estar controlada (GERMOLEC et al., 2018). Yeo et al. (2016) sugeriram que o agulhamento a seco estimule a resposta inflamatória nas fibras de colágeno e isso foi confirmado no presente estudo, pois verificou-se que no GAS as áreas infiltradas por células inflamatórias foram maiores na primeira semana e diminuíram com o passar dos dias, enquanto ainda estava presente nos demais grupos, incluindo GMI e GMII que receberam anti-inflamatórios. Esse achado é relevante, pois pode-se inferir que o agulhamento a seco modulou a resposta inflamatória de forma adequada.

Em relação à densidade celular, o grupo que recebeu AS apresentou densidade mais alta no início do tratamento do que no final, mesmo assim não houve diferença em relação aos demais grupos. Esse achado corrobora Kim et al. (2015) que relataram aumento de celularidade na primeira semana após o tratamento. Durante o processo inflamatório, os tenócitos, que são as células tendíneas, acabam sofrendo alterações, aumentando a atividade metabólica e produzindo citosinas pró-inflamatórias (OREFF et al., 2021). As citocinas pró-inflamatórias geram o processo inflamatório, garantindo que uma resposta ocorra para eliminar o dano inicial, evitando que a lesão se intensifique e tenha efeitos adversos no processo de cicatrização (MILLAR et al., 2017).

Diferente do que foi observado por Kim et al. (2015), no presente estudo o agulhamento a seco pouco interferiu nos parâmetros: arranjo das fibras tendíneas, arredondamento do núcleo dos fibroblastos, estrutura das fibras tendíneas e na

neoangiogênese. Tais variáveis apresentaram resposta mais satisfatória no tratamento com AINE precoce. Dois protocolos de AINEs foram analisados, pois para Lisowska et al. (2018), o tratamento deve iniciado imediatamente, e para ROONEY et al. (2016), esse tratamento deve ser evitado no período pós-traumático imediato, sugerindo que a inflamação precoce é um componente necessário para o sucesso da cicatrização tecidual. Durante a tendinopatia é comum que os tenócitos não estejam arredondados e as fibras de colágeno anguladas (MILLAR et al., 2017) e, no presente trabalho, o AINE já reduziu o processo inflamatório nas primeiras 24 horas, o que limitou o desenvolvimento de lesões, enquanto no grupo tratado com o agulhamento seco ainda houve o desenvolvimento de microlesões diversos dias após a indução com colagenase, impedindo que a fibras tendíneas e as células se organizassem de maneira tão precoce.

Em relação a neoangiogênese, houve aumento no início da lesão em todos os grupos, porém sem diferença estatística. Tal aumento é uma característica comum da tendinopatia inicialmente, pois faz parte da remodelação homeostática (MILLAR et al., 2017). No presente estudo o agulhamento seco não interferiu na vascularização, pois foi realizado no terço médio do tendão, onde a circulação sanguínea já é reduzida (WINNICKI et al., 2020). Na avaliação final, observou-se redução da neoangiogênese no grupo tratado com agulhamento seco, provavelmente porque nessa fase de maturação o tecido se modifica progressivamente para tecido tendinoso cicatricial (GRINSTEIN; GALLOWAY, 2018).

É importante que haja alta proporção de fibras de colágeno I e III, pois quando há déficit desses tipos de fibras no tendão, a sobrecarga e a descarga podem gerar efeitos prejudiciais (GRINSTEIN; GALLOWAY, 2018). Segundo Rigglin et al. (2019), o agulhamento a seco promove maior deposição de colágeno tipo III e esse achado foi observado no presente trabalho, mas vale salientar que esse aumento é tardio, pois só ocorreu na terceira semana de avaliação. A fase de remodelação que inicia próximo à terceira semana após a lesão é caracterizada pela produção dos componentes da matriz extracelular, como colágeno e glicosaminoglicanos (GRINSTEIN; GALLOWAY, 2018).

Ainda faltam estudos que verifique a eficácia de diferentes protocolos terapêuticos frente a diferentes condições clínicas, também sobre a maneira de aplicação das agulhas, quantidade de agulhas, tempo de permanência e quantas sessões devem ser realizadas. Um estudo sugere que sejam feitas cinco sessões de agulhamento no

tendão (MISHRA et al., 2014), outro estudo demonstra que apenas três sessões de agulhamento no tendão calcâneo já são eficazes para tratar a dor (BELL et al., 2013). No presente estudo, foram realizadas quatro sessões de agulhamento seco no tendão. O intervalo entre as sessões, alguns autores realizaram três vezes por semana (GILDIR et al., 2019), outros duas vezes por semana (UYGUR et al., 2021). Em relação à quantidade de agulhas utilizada por sessão, depende da extensão da área que será tratada, sendo que Butts et al. (2021) observaram em um estudo clínico com humanos a eficácia no tratamento da dor utilizando entre uma e quatro agulhas ao mesmo tempo. No presente estudo, por ser uma região pequena, não houve necessidade de mais que uma agulha por vez.

5. CONCLUSÃO

O agulhamento seco beneficia o tratamento de tendinopatia induzida por colagenase em ratos, pois tal técnica interfere de forma favorável na locomoção e em parâmetros ultrassonográficos e histopatológicos.

REFERÊNCIAS

BELL, K. J.; FULCHER, M. L.; ROWLANDS, D. S.; KERSE, N. Impact of autologous blood injections in treatment of mid-portion Achilles tendinopathy: double blind randomised controlled trial. **BMJ**, v. 346, n. 2, 2013.

BUTTS, R.; DUNNING, J.; SERAFINO, C. Dry needling strategies for musculoskeletal conditions: Do the number of needles and needle retention time matter? A narrative literature review. **Journal of Bodywork and Movement Therapies**, v. 26, n. 1, p. 353-363, 2021.

DEDERER, K. M.; TENNANT, J. N. Anatomical and Functional Considerations in Achilles Tendon Lesions. **Foot and Ankle Clinics**, v. 24, n. 3, p. 371-385, 2019.

FARES, M. Y.; KHACHFE, H. H.; SALHAB, H. A.; ZBIB, J. FARES, Y.; FARES, J. Achilles tendinopathy: Exploring injury characteristics and current treatment modalities. **The Foot**, v. 46, n.1, p. 1-29, 2021.

FATIH, B.; NURDAN, Y. The Impact of Extracorporeal Shock Wave Therapy and Dry Needling Combination on the Pain, Grip Strength and Functionality in Patients Diagnosed with Lateral Epicondylitis. **Turkish Journal of Osteoporosis**. v. 25, n. 1, p. 65-71, 2019.

GERMOLEC, D. R.; SHIPKOWSKI, K. A.; FRAWLEY, R. P.; EVANS, E. Markers of Inflammation. **Methods in Molecular Biology**, v. 18, n. 3, p. 57-79, 2018.

GILDIR, S.; TUZUN, E. H.; EROĞLU, G.; EKER, L. A randomized trial of trigger point dry needling versus sham needling for chronic tension-type headache. **Medicine**, v. 98, n. 8, p. 1-7, 2019.

GRINSTEIN, M.; GALLOWAY, J. L. Developmental Biology in Tendon Tissue Engineering. **Developmental Biology and Musculoskeletal Tissue Engineering**, v. 8, n.1, p. 181-206, 2018.

IRBY, A.; GUTIERREZ, J.; CHAMBERLIN, C.; THOMAS, S. J.; ROSEN, A. B. Clinical management of tendinopathy: A systematic review of systematic reviews evaluating the effectiveness of tendinopathy treatments. **Medicine and Science in Sports**, v. 30, n. 10, p. 1810-1826, 2020.

JAYASEELAN, D. J.; FALLER, B. T.; AVERY, M. H. The utilization and effects of filiform dry needling in the management of tendinopathy: a systematic review. **Physiotherapy Theory and Practice**, v. 27, n. 1, p. 1-13, 2021.

KIM, B. S.; JOO Y. C.; CHOI, B. H.; KIM, K. H.; KANG, J. S.; PARK, S. R. The effect of dry needling and treadmill running on inducing pathological changes in rat Achilles tendon. **Connective Tissue Research**, v. 56, n. 6, p. 452-460, 2015.

KRAEUTER, A. K.; GUEST, P. C.; SARNYAI, Z. The Open Field Test for Measuring Locomotor Activity and Anxiety-Like Behavior. **Methods in Molecular Biology**, v. 1916, n. 1 p. 99-103, 2019.

KREY, D.; BORCHERS, J.; MCCAMEY, K. Tendon needling for treatment of tendinopathy: A systematic review. **Physician and Sportsmedicine**, v. 43, n. 1, p. 80-86, 2015.

LISOWSKA, B.; KOSSON, D.; DOMARACKA, K. Positives and negatives of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in bone healing: the effects of these drugs on bone repair. **Drug design, development and therapy**, v. 12, n. 1, p. 1809–1814, 2018.

LOIACONO, C.; PALERMI, S.; MASSA, B.; BELVISO, I.; ROMANO, V.; GREGORIO, A. D.; SIRICO, F.; SACCO, A. M. Tendinopathy: Pathophysiology, Therapeutic Options, and Role of Nutraceuticals. A Narrative Literature Review. **Medicina**, v. 55, n. 8, p. 447-459, 2019.

LUNGU, E.; GRONDIN, P.; TÉTREAULT, P.; DESMEULES, F.; CLOUTIER, G.; CHOINIÈRE, M.; BUREAU, N. J. Ultrasound-guided tendon fenestration versus open-release surgery for the treatment of chronic lateral epicondylitis of the elbow: protocol for a prospective, randomised, single blinded study. **BMJ Open**, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2018.

MAFFULLI, N.; LONGO, U. G.; KADAKIA, A.; SPIEZIA, F. Achilles tendinopathy, **Foot and Ankle Surgery**, v. 26, n. 3, p. 240 – 249, 2020.

MESSINA, C.; BANFI, G.; ORLANDI, D.; LACELLI, F.; SERAFINI, G.; MAURI, G.; SECCHI, F.; SILVESTRI, E.; SCONFENZA, L. M. Ultrasound-guided interventional procedures around the shoulder. **The British journal of radiology**, v. 89, n. 1057, p. 1-10, 2016.

MILLAR, N.; MURRELL, G.; MCINNES, I. Inflammatory mechanisms in tendinopathy – towards translation. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 13, n. 1, p. 110–122, 2017.

MISHRA, A. K.; SKREPNIK, N. V.; EDWARDS, S. G.; JONES, G. L.; SAMPSON, S.; VERMILLION, D. A.; RAMSEY M. L.; KARLI, D. C.; RETTIG, A. C. Efficacy of platelet-rich plasma for chronic tennis elbow: a double-blind, prospective, multicenter, randomized controlled trial of 230 patients. **American Journal of Sports Medicine**, v. 42, n. 2, p. 463-471, 2014.

NAKAGAWA, H.; MATSUNAGA, D.; ISHIWATA, T. Effect of heat acclimation on anxiety-like behavior of rats in an open field. **Journal of Thermal Biology**, v. 87, n.1, p. 1-5, 2020.

OREFF, G. L.; FENU, M.; VOGL, C.; RIBITSCH, I.; JENNER, F. Species variations in tenocytes' response to inflammation require careful selection of animal models for tendon research. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1-14, 2021.

RHA, D. W.; PARK, G. Y.; KIM, Y. K.; KIM, M. T.; LEE, S. C. Comparison of the therapeutic effects of ultrasound-guided platelet-rich plasma injection and dry needling in rotator cuff disease: a randomized controlled trial. **Clinical Rehabilitation**, v. 27, n. 2, p. 113-122, 2013.

RIGGIN, C. N.; CHEN, M.; GORDON, J. A.; SCHULTZ, S. M.; SOSLOWSKY, L. J.; KHOURY, V. Ultrasound-Guided Dry Needling of the Healthy Rat Supraspinatus

Tendon Elicits Early Healing Without Causing Permanent Damage. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 37, n. 9, p. 2035 – 2042, 2019.

ROONEY, S. I.; BASKIN, R.; TORINO, D. J.; VAFA, R. P.; KHANDEKAR, P. S.; KUNTZ, A. F.; SOSLOWSKY, L. J. Ibuprofen Differentially Affects Supraspinatus Muscle and Tendon Adaptations to Exercise in a Rat Model. **The American journal of sports medicine**, v. 44, n. 9, p. 2237–2245, 2016.

SHIEH, K. R.; YANG, S. C. Formosan wood mice (*Apodemus semotus*) exhibit more exploratory behaviors and central dopaminergic activities than C57BL/6 mice in the open field test. **Chinese Journal of Physiology**, v. 63, n. 1, p. 27-34, 2020.

SILBERNAGEL, K. G.; HANLON, S.; SPRAGUE, A. Current Clinical Concepts: Conservative Management of Achilles Tendinopathy. **Journal of Athletic Training**, v. 55, n. 5, p. 438–447, 2020.

STANIA, M.; JURAS, G.; CHMIELEWSKA, D.; POLAK, A.; KUCIO, C.; KRÓL, P. Extracorporeal Shock Wave Therapy for Achilles Tendinopathy. **BioMed Research International**, v. 2019, n. 1, 2019.

STENHOUSE, G.; SOOKUR, P.; WATSON, M. Do blood growth factors offer additional benefit in refractory lateral epicondylitis? A prospective, randomized pilot trial of dry needling as a stand-alone procedure versus dry needling and autologous conditioned plasma. **Skeletal radiology**, v. 42, n. 11, p. 1515-1520, 2013.

STOYCHEV, V.; FINESTONE, A. S.; KALICHMAN, L. Dry Needling as a Treatment Modality for Tendinopathy: a Narrative Review. **Current Reviews in Musculoskeletal Medicine**, v. 13, n. 1, p. 133–140, 2020.

TSIKOPOULOS, K.; TSIKOPOULOS, I.; SIMEONIDIS, E.; PAPATHANASIOU, E.; HAIDICH, A. B.; ANASTASOPOULOS, N.; NATSIS, K. The clinical impact of platelet-rich plasma on tendinopathy compared to placebo or dry needling injections: A meta-analysis. **Physical therapy in sport**, v. 17, n.1, p. 87-94, 2016.

UYGUR, E.; AKTAŞ, B.; YILMAZOĞLU, E. G. The use of dry needling vs. corticosteroid injection to treat lateral epicondylitis: a prospective, randomized, controlled study. **Journal of Shoulder and Elbow Surgery**, v. 30, n. 1, p. 134-139, 2021.

WINNICKI, K.; OCHAŁA-KŁOS, A.; RUTOWICZ, B.; PEKALA, P. A.; TOMASZEWSKI, K. A. Functional anatomy, histology and biomechanics of the human Achilles tendon. A comprehensive review. **Annals of Anatomy**, v. 229, n. 1, p. 1-10, 2020.

YEO, A.; KENDALL, N.; JAYARAMAN, S. Ultrasound-guided dry needling with percutaneous paratenon decompression for chronic Achilles tendinopathy. **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy**, v. 24, n. 7, p. 2112-2118, 2016.