



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE MEDICINA

ARTHUR HENRIQUE FERNANDES

**NOVO MÉTODO PARA ANÁLISE AUTOMATIZADA DA ORGANIZAÇÃO DO
TECIDO TENDÍNEO CORADO POR HEMATOXILINA-EOSINA (H&E)**

MOSSORÓ

2021

ARTHUR HENRIQUE FERNANDES

**NOVO MÉTODO PARA ANÁLISE AUTOMATIZADA DA ORGANIZAÇÃO DO
TECIDO TENDÍNEO CORADO POR HEMATOXILINA-EOSINA (H&E)**

Monografia apresentada a Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Bacharel em Medicina.

Orientador: Nome Completo, Prof. Me. Flávio Santos da Silva

MOSSORÓ

2021

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

F363n Fernandes, Arthur Henrique.

NOVO MÉTODO PARA ANÁLISE AUTOMATIZADA DA
ORGANIZAÇÃO DO TECIDO TENDÍNEO CORADO POR

HEMATOXILINA-EOSINA (H&E) / Arthur Henrique
Fernandes. - 2021.

47 f. : il.

Orientador: Flávio Santos Silva.

Monografia (graduação) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Curso de Medicina, 2021.

1. Tendões. 2. Morfometria. 3. Histologia. I.
Silva, Flávio Santos , orient. II. Título.

ARTHUR HENRIQUE FERNANDES

**NOVO MÉTODO PARA ANÁLISE AUTOMATIZADA DA ORGANIZAÇÃO DO
TECIDO TENDÍNEO CORADO POR HEMATOXILINA-EOSINA (H&E)**

Monografia apresentada a Universidade
Federal Rural do Semi-Árido como requisito
para obtenção do título de Bacharel em
Medicina.

Defendida em: 31 / 01 / 2020.

BANCA EXAMINADORA

Flávio Santos da Silva

Nome do Orientador, Prof. Me. Flávio Santos da Silva (UFERSA)
Presidente

Emanuel Kennedy Feitosa Lima

Nome do Examinador Interno, Prof. Dr. Emanuel Kennedy Feitosa Lima (UFERSA)
Membro Examinador

Telma de Sousa Lima

Nome do Examinador Externo, Prof. Me. Telma de Sousa Lima (UFXYZ)
Membro Examinador

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos em especial aos meus pais e familiares pelo apoio incondicional em todos os momentos, a partir de conselhos, bons exemplos e estrutura física para meu desenvolvimento acadêmico e pessoal. Agradeço ao meu orientador, pela grande disponibilidade e paciência em me atender e guiar rumo a uma produção científica muito enriquecedora. Grato também aos meus colegas de turma e professores, os quais compartilharam experiências semelhantes em produção científica e puderam me apoiar em diversos momentos ao longo desse período.

“Que os nossos esforços desafiem as impossibilidades. Lembrai-vos de que as grandes proezas da história foram conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

RESUMO

Introdução: Tendões são órgãos fibrosos, histologicamente constituídos por tenócitos e matriz extracelular com estrutura colagenosa hierarquizada. Em casos de lesões, as tendinopatias, surgem alterações na morfologia tendínea, como: hiper celularidade, mudanças no fenótipo e perda da uniformidade na orientação espacial dos tenócitos. Tendo em vista essa importante correlação entre as alterações histológicas tendíneas e suas propriedades biomecânicas, a escassez de métodos acurados de análise tendínea e da necessidade de automatização no estudo das tendinopatias, mostra-se promissor o desenvolvimento de métodos de análise que explorem a microarquitetura tendínea. **Objetivo:** Validar novo método para análise automatizada da organização do tecido tendíneo corado com hematoxilina-eosina. **Metodologia:** Trata-se de um estudo metodológico para validação de rotina de análise automatizada da organização do tecido tendíneo. Foram utilizadas lâminas histológicas de rato Wistar submetido a tenotomia parcial do tendão calcâneo direito, mantendo o esquerdo como controle. Após 35 dias de reparo, o animal foi eutanasiado para coleta e análise microscópica dos tendões corados com hematoxilina-eosina. Foram capturadas imagens de quatro campos histológicos (objetiva de 20x) a partir do terço médio de cada tendão. As imagens foram processadas com uso do software ImageJ, a partir de rotina computacional automatizada. Posteriormente foi realizada análise da eficiência do método na detecção do núcleo de tenócitos e seu uso na comparação entre tendões controle e lesionado, considerando três variáveis: celularidade, razão de aspecto (RA) e desvio padrão circular (DPC). O DPC foi calculado com uso da estatística circular e os dados foram comparados aplicando-se teste t, admitindo-se $p < 0,05$. Todos os cálculos foram realizados com uso do software Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, USA). **Resultados:** O método apresentou eficiência de 87,27% a 96,96% no isolamento dos tenócitos. Em relação à comparação entre imagens de tendão controle e lesionado, o método mostrou DPC médio de $6,19 \pm 0,96$ no grupo controle e $10,46 \pm 1,71$ no grupo lesionado ($p < 0,05$); celularidade média de $61,50 \pm 12,23$ no grupo controle e $111,00 \pm 4,08$ no grupo lesionado ($p < 0,05$); RA média de $4,01 \pm 0,43$ no controle e $3,33 \pm 0,35$ no grupo lesionado ($p < 0,05$). **Conclusão:** Os resultados do presente estudo mostraram que o novo método desenvolvido para análise automatizada da organização do tecido tendíneo é eficiente na detecção dos perfis nucleares dos tenócitos, assim como na comparação entre tendões saudáveis e lesionados.

Palavras-chave: Tendões. Morfometria. Histologia.

ABSTRACT

Introduction: Tendons are fibrous organs, histologically formed by tenocytes and an extracellular matrix with a hierarchical collagenous structure. In cases of injuries, tendinopathies, changes in tendon morphology arise, such as: hypercellularity, changes in phenotype and loss of uniformity in the spatial orientation of tenocytes. Whereas this important correlation between the tendinous histological changes and their biomechanical properties, the scarcity of accurate methods of tendon analysis and the need for automation in the study of tendinopathies, the development of analysis methods that explore tendinous microarchitecture is promising. **Objective:** Validate a new method for automated analysis of the tendon tissue organization stained with hematoxylin-eosin. **Methodology:** This is a methodological study for routine validation of automated analysis of the organization of tendon tissue. Histological slides from Wistar rats submitted to partial tenotomy of the right calcaneus tendon were used, keeping the left one as a control. After 35 days of repair, the animal was euthanized for collection and microscopic analysis of the tendons stained with hematoxylin-eosin. Images of four histological fields (20x objective) were captured from the middle third of each tendon. The images were processed using the ImageJ software, using an automated computational routine. Subsequently, an analysis of the efficiency of the method in detecting the tenocyte nucleus and its use in the comparison between control and injured tendons was performed, considering three variables: cellularity, aspect ratio (AR) and circular standard deviation (CSD). The CSD was calculated using circular statistics and the data were compared using a t test, assuming $p < 0.05$. All calculations were performed using Microsoft Excel 2010 software (Microsoft Corporation, USA). **Results:** The method showed an efficiency of 87.27% to 96.96% in the isolation of tenocytes. Concerning the comparison between control and injured tendon images, the method showed an average CSD of 6.19 ± 0.96 in the control group and 10.46 ± 1.71 in the injured group ($p < 0.05$); mean cellularity of 61.50 ± 12.23 in the control group and 111.00 ± 4.08 in the injured group ($p < 0.05$); average aspect ratio of 4.01 ± 0.43 in the control and 3.33 ± 0.35 in the injured group ($p < 0.05$). **Conclusion:** The results of the present study showed that the new method developed for automated analysis of the organization of tendon tissue is efficient in detecting the tenocytes nuclear profiles, as well as in the comparison between healthy and injured tendons.

Keywords: Tendons. Morphometry. Histology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	–	Esquema para representação da organização hierárquica do componente colagenoso da matriz extracelular. Adaptado de (FREEDMAN et al., 2018).....	39
Figura 2	–	Imagem histológica tendínea com característica disposição paralela das fibras de colágeno, intercaladas por grupos de tenócitos. Fonte: Capturado pelo autor.....	40
Figura 3	–	Gráfico carga/elongação. Representação dos quatro estágios de elongação perante a aplicação continuada de cargas. Adaptado de (THOMPSON et al., 2017).....	41
Figura 4	–	Esquema representando as três fases do reparo tendíneo, sobrepostas e com seus respectivos percentuais aproximados de tempo em relação ao processo por completo. Adaptado de (LIPMAN et al., 2018).....	42
Figura 5	–	Gráficos comparando o reparo tendíneo eficiente com o deficiente, descrevendo a força, área de seção transversal e elasticidade do tendão. Adaptado de (SNEDEKER; FOOLEN, 2017).....	43
Figura 6	–	Etapas da rotina computacional para análise de tecido tendíneo controle. (A) Imagem original de tendão controle corado em H&E. (B) Utilização do plugin Colour Deconvolution. (C) Resultado de subtração da imagem B por sua cópia submetida ao filtro Gaussian Blur, com uso da ferramenta Image Calculator. (D) Inversão da imagem (função Invert). (E) Isolamento dos perfis nucleares dos tenócitos com uso da ferramenta Find Maxima (F) Resultados do processamento na forma de elipses correspondentes aos perfis nucleares dos tenócitos.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	–	Eficiência do método de análise de análise.....	45
Tabela 2	–	Comparação entre grupos de imagens tendão controle e de tendão lesionado.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEUA-	Comitê de Ética no Uso de Animais – Universidade Federal do Rio Grande do
UFRN	Norte
DPC	Desvio padrão circular
Dr	Doutor
FFT	Fast Fourier Transform
GCo	Grupo controle
GLe	Grupo lesionado
H&E	Hematoxilina-Eosina
MEC	Matriz extracelular
Me	Mestre
RA	Razão de aspecto
RM	Ressonância magnética
TCo	Tendão controle
TLe	Tendão lesionado
UFERSA	Universidade Federal Rural do Semiárido
UFRN	Universidade Federal do Rio Grande do Norte
USG	Ultrassonografia

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
©	Copyright

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1	Estrutura e função dos tendões	14
2.2	As Tendinopatias	15
2.3	Reparo tendíneo	18
2.4	As Tendinoses	20
2.5	Métodos diagnósticos para Tendinoses	21
3	MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1	Experimentação animal e aquisição das imagens	23
3.2	Processamento das imagens	23
3.3	Cálculo da eficiência do método	24
3.4	Análise do Desvio Padrão Circular, da celularidade e da Razão de Aspecto.....	24
3.5	Análise estatística	25
4	RESULTADOS	26
5	DISCUSSÃO	27
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	31
	REFERÊNCIAS	32
	ANEXO A - ESQUEMA PARA REPRESENTAÇÃO DA ORGANIZAÇÃO HIERÁRQUICA DO COMPONENTE COLAGENOSO DA MATRIZ EXTRACELULAR.....	39
	ANEXO B – IMAGEM HISTOLÓGICA TENDÍNEA COM CARACTERÍSTICA DISPOSIÇÃO PARALELA DAS FIBRAS DE COLÁGENO, INTERCALADAS POR GRUPOS DE TENÓCITOS.....	40
	ANEXO C – GRÁFICO CARGA/ELONGAÇÃO. REPRESENTAÇÃO DOS QUATRO ESTÁGIOS DE ELONGAÇÃO PERANTE A APLICAÇÃO CONTINUADA DE CARGAS.....	41
	ANEXO D – ESQUEMA REPRESENTANDO AS TRÊS FASES DO REPARO TENDÍNEO, SOBREPOSTAS E COM SEUS	

RESPECTIVOS PERCENTUAIS APROXIMADOS DE TEMPO EM RELAÇÃO AO PROCESSO POR COMPLETO.....	42
ANEXO E – GRÁFICOS COMPARANDO O REPARO TENDÍNEO EFICIENTE COM O DEFICIENTE, DESCREVENDO A FORÇA, ÁREA DE SEÇÃO TRANSVERSAL E ELASTICIDADE DO TENDÃO.....	43
ANEXO F – ETAPAS DA ROTINA COMPUTACIONAL PARA ANÁLISE DE TECIDO TENDÍNEO CONTROLE. (A) IMAGEM ORIGINAL DE TENDÃO CONTROLE CORADO EM H&E. (B) UTILIZAÇÃO DO PLUGIN COLOUR DECONVOLUTION. (C) RESULTADO DE SUBTRAÇÃO DA IMAGEM B POR SUA CÓPIA SUBMETIDA AO FILTRO GAUSSIAN BLUR, COM USO DA FERRAMENTA IMAGE CALCULATOR. (D) INVERSÃO DA IMAGEM (FUNÇÃO INVERT). (E) ISOLAMENTO DOS PERFIS NUCLEARES DOS TENÓCITOS COM USO DA FERRAMENTA FIND MAXIMA (F) RESULTADOS DO PROCESSAMENTO NA FORMA DE ELIPSES CORRESPONDENTES AOS PERFIS NUCLEARES DOS TENÓCITO.....	44
ANEXO G – EFICIÊNCIA DO MÉTODO DE ANÁLISE.....	45
ANEXO H – COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS DE IMAGENS TENDÃO CONTROLE E DE TENDÃO LESIONADO	46

1 INTRODUÇÃO

Tendões são órgãos fibrosos que transmitem força dos músculos aos ossos, possibilitando movimento e estabilização articular. Quando saudáveis, são estruturas anatomicamente brancas, brilhantes e com textura fibroelástica (FRANCHI et al., 2007; FREEDMAN et al., 2018). Histologicamente os tendões são um tipo especializado de tecido conjuntivo, formado por matriz celular de tenócitos e tenoblastos e uma matriz extracelular (MEC) composta predominantemente por colágeno tipo I. As fibras colágenas se apresentam dispostas em fascículos extremamente organizados. Intercalados a esses fascículos encontram-se os tenócitos, uniformemente alinhados (KHAYYERI et al., 2017; ASAHARA; INUI; LOTZ, 2017).

Em caso de lesões tendíneas, as chamadas tendinopatias, surgem diversas alterações na morfologia tecidual em âmbito histológico, como: hiper celularidade; mudança no fenótipo dos tenócitos; surgimento de fenótipos celulares anormais (condroide e osteoide); perda do alinhamento das fibras de colágeno e na angulação entre os tenócitos (OBST et al., 2018; SCOTT; BACKMAN; SPEED, 2015). Essas alterações estruturais apresentam ampla correlação com as propriedades biomecânicas dos tendões e com a clínica dos indivíduos lesionados (FREEDMAN; GORDON; SOSLOWSKY, 2014; GROSS; HOFFMANN, 2013).

No meio científico, especialmente nas ciências biológicas e da saúde, há uma crescente demanda em tornar a análise morfológica de órgãos, como os tendões, cada vez mais acurada, automatizada e com mínimo viés de aferição (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012; ZACH et al., 2016). Nesse sentido, dos métodos diagnósticos atuais para as tendinopatias, os mais utilizados são a Ultrassonografia (USG) e a Ressonância Magnética (RM). Porém, ambas são pouco acuradas em casos de lesões parciais dos tendões e não exploram a organização da microarquitetura tendínea, a qual sofre importantes modificações ao longo do adoecimento dos tendões (SEO; YOO; RYU, 2014; WEINREB et al., 2014).

Tendo em vista a escassez de métodos acurados de avaliação dos tendões, a importante correlação entre sua organização histológica e funcionamento, e da necessidade de automatização no estudo das tendinopatias, mostra-se promissor o desenvolvimento de métodos de análise que explorem a microarquitetura tendínea.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Estrutura e função dos tendões conceituais

Tendões são tecidos conectivos densos e fibrosos que transmitem força e deslocamento entre os músculos e ossos, estabilizando articulações e gerando movimento esquelético (FREEDMAN et al., 2018). Anatomicamente, quando saudáveis, apresentam-se como estruturas brancas, brilhantes e com textura fibroelástica (FRANCHI et al., 2007; TITAN; ANDARAWIS-PURI, 2016). Os tendões variam muito de acordo com o músculo aos quais estão ligados. Músculos mais volumosos, em que predomina o movimento com pouca delicadeza e alta potência, geralmente vêm acompanhados de tendões mais largos e curtos, como o do quadríceps femoral. Já músculos que realizam movimentos minuciosos, como os flexores dos dedos, utilizam-se de tendões mais longos e finos (FRANCHI et al., 2007). Outra diferença é observada entre tendões de músculos flexores e extensores, sendo os tendões dos extensores geralmente mais alargados, enquanto os dos flexores, mais arredondados ou ovalados em sua secção transversa (BENJAMIN; KAISER; MILZ, 2008). O leque de formatos é vasto, perante as necessárias adaptações funcionais, contudo, a estrutura microscópica é comum a todos os tendões (FRANCHI et al., 2007).

Histologicamente os tendões tratam-se de um tipo especializado de tecido conjuntivo, logo, apresentam pequeno volume celular e extensa MEC. A porção celular é representada em 90 a 95% por fibroblastos diferenciados, os tenócitos e tenoblastos. Essas células estão em constante interação dentre si, sendo responsáveis pelo equilíbrio na composição da MEC, regulando a renovação e organização das proteínas colagenosas (BENJAMIN; KAISER; MILZ, 2008). Os demais 5 a 10% correspondem a células vasculares (endoteliais e musculares lisas) e células condroides, próximos à inserção óssea (KHAYYERI et al., 2017; SHARMA e MAFFULLI, 2006).

Em relação à MEC, esta é composta por água, substância fundamental e proteínas. A substância fundamental é constituída por proteoglicanos, glicoproteínas e glicosaminoglicanos (FREEDMAN; GORDON; SOSLOWSKY, 2014; ARO et al., 2012). A porção proteica é responsável por 85% do peso seco da MEC, em que 90% destas proteínas são de colágeno tipo I e o restante distribuído entre colágeno tipo III, V, XI, XII e XIV (SCREEN et al., 2015). O colágeno consiste em cadeias de polipeptídeos que se combinam para a formação de moléculas de tropocolágeno, as quais se combinam e formam fibrilas. As fibrilas se organizam em grupos maiores, as fibras, as quais se unem e formam fascículos, como

esquemático na figura 1 (SCREEN et al., 2015; DAYTON, 2017; FREEDMAN et al., 2018).

Esses fascículos apresentam disposição ondulada característica, conhecida como “crimp”. Esta configuração possivelmente se deve a uma atividade contrátil dos tenócitos no momento da formação das cadeias de fibrilas, tendo importante papel na biomecânica tendínea. Os fascículos se apresentam bem organizados e em disposição paralela uns aos outros, obedecendo ao eixo uniaxial de cargas às quais estão submetidas, como é visto na figura 2. A união desses fascículos, dimensionados na escala dos micrômetros, com as células e os demais componentes da MEC forma o tendão, medindo de milímetros a centímetros (KILLIAN et al., 2012; THOMPSON, 2013; FREEDMAN et al., 2018).

Os tendões são órgãos com funções essencialmente mecânicas, focados na transmissão de forças do músculo para o osso, gerando movimento por meio das articulações, de maneira estável, regular e adequada (VOLETI et al., 2012; FREEDMAN et al., 2018). Observam-se dois padrões funcionais de tendão, os de atividade posicional e os com armazenamento de energia. Os tendões com foco na atividade posicional, como o tendão tibial anterior, apresentam baixa elasticidade, com movimento preciso e rígido, objetivando um minucioso posicionamento do membro para realização de um movimento. Já os tendões com armazenamento de energia, como o tendão calcâneo, são mais elásticos e extensíveis, com característico armazenamento de energia potencial durante a fase de estiramento, recolocando essa energia no movimento durante o início do deslocamento. Esse mecanismo contribui para menor gasto de energia de contração muscular e na obtenção de um deslocamento mais eficaz. Contudo, esse alto esforço tendíneo pode deformar o órgão de maneira considerável, tornando o tecido mais susceptível a lesões (SCREEN et al., 2015; THORPE et al., 2012).

2.2 As Tendinopatias

As lesões tendíneas podem ser definidas como tendinopatias. Trata-se de um termo genérico para síndromes clínicas caracterizadas por dor e disfunção tendínea. Ela engloba diversos critérios de classificações propostos para lesões dos tendões, como o aspecto agudo e crônico, assim como tendinoses e tendinites (SHAMASH et al., 2018; OBST et al., 2018; WALDEN et al., 2017; SNEDEKER; FOOLEN, 2017).

Os tendões são essenciais ao aparelho locomotor, ao passo que as doenças tendíneas, são grande motivo de morbidade, causando dores, dificuldades na locomoção e longos períodos de recuperação, repercutindo em severo impacto nas atividades cotidianas dos

pacientes (MALLIARAS et al., 2013; WEINFELD, 2014; GROSS e HOFFMANN, 2013). Em termos epidemiológicos, as tendinopatias são muito prevalentes, correspondendo a cerca de 30% das queixas dos pacientes que procuram atendimento médico por problemas musculoesqueléticos (LIPMAN et al., 2018). As lesões do tendão calcâneo vêm aumentando consideravelmente nos últimos anos, passando de 2 a cada 100 mil indivíduos no ano de 1986 para 12 a cada 100 mil indivíduos em 1994, chegando, atualmente, à incidência de até 55 a cada 100 mil pessoas ao ano (HUTTUNEN et al., 2014; HESS, 2010; PARDES et al., 2016). A incidência em atletas é ainda mais alta, acometendo 7 a 9% dos corredores de alta performance (LONGO et al., 2009). Tipicamente, as lesões no tendão calcâneo ocorrem em homens entre a quarta e quinta décadas de vida, sem restrição a atletas, visto que até um terço dos pacientes não participa de atividades físicas vigorosas (MAFFULLI; VIA; OLIVA, 2015; EGGER e BERKOWITZ, 2017; LI e HUA, 2016; FREEDMAN; GORDON; SOSLOWSKY, 2014). A prevalência de lesões do tendão patelar em atletas profissionais que se usam de saltos em suas modalidades, como basquete e ginástica, chega a cerca de 14%, com prevalência máxima no vôlei, comprometendo aproximadamente 44% dos atletas (LIAN et al., 2005). As lesões do manguito rotador são a principal causa de dor no ombro, sintoma com prevalência de até 34% na população geral, sendo mais comum nas mulheres e com o avançar da idade (LIN et al., 2019). A epicondilite lateral apresenta prevalência de 1 a 3% na população em geral, chegando a 7% nos trabalhadores manuais (GREGORY; WYSOCKI; COHEN, 2016).

As tendinopatias dispõem de etiologia com caráter multifatorial, envolvendo relações entre fatores intrínsecos e extrínsecos ao organismo. Dentre os fatores intrínsecos destacam-se o índice de massa corpórea, idade, sexo, integridade tendínea, predisposição genética e características anatômicas que variam de acordo com o tendão, por exemplo, hiperpronação do antepé e varo do tornozelo contribuindo para as lesões do tendão calcâneo (GOOM et al., 2016; MAGNAN et al., 2014; SEITZ et al., 2011). Já entre os extrínsecos, ressalta-se o uso de drogas (como fluoroquinolonas, corticosteroides e inibidores da aromatase) e a aplicação de cargas inadequadas sobre o tendão, como no aumento abrupto do volume de treinamentos físicos (EGGER e BERKOWITZ, 2017; SEITZ et al., 2011; PIETRZAK et al., 2018).

Perante o caráter multifatorial e não muito claro da etiologia das tendinopatias, o carregamento mecânico toma um dos papéis centrais nessa patogênese. Consequentemente para o entendimento das lesões, faz-se necessária revisão sobre o comportamento mecânico dos tendões quando submetidos a cargas. Esse conhecimento pode ser adquirido por meio de ensaios envolvendo aplicação de tensões e estudo do comportamento tendíneo nessas

situações, formulando, dentre as várias informações, um gráfico carga/elongação (ABAT et al., 2017; WANG et al., 2017).

O comportamento mecânico e os padrões gráficos estão intimamente relacionados à organização estrutural característica dos tendões. Observa-se um tecido anisotrópico, ou seja, possui propriedades mecânicas que dependem da disposição de suas fibras, trabalhando de maneira predominantemente uniaxial. São também viscoelásticos e não lineares, visto que o comportamento perante as cargas aplicadas não é homogêneo, como pode ser visto na figura 3 (BEACH; GITTINGS; SOSLOWSKY, 2017; LAKE et al., 2009).

Como é visto na figura 3, a elongação tendínea passa por quatro fases principais, de acordo com o aumento da carga aplicada sobre essas estruturas. No estágio 1 ocorre estiramento gradual das ondulação presentes nos feixes de fibras colágenas, designadas como crimps. Essa primeira fase vai até cerca de 2% da capacidade total de elongação tendínea. Logo em seguida inicia-se a fase 2, a qual compreende a deformação de 2 a 4%. Nela o padrão crimp já foi praticamente perdido, pelo gradativo alinhamento das fibras colágenas em conjunto com adaptações nos demais elementos da MEC. Observa-se esse evento no “Ponto 2” descrito no gráfico, em que as fibras colagenosas estão retificadas. Com a persistência do alongamento das fibras já estiradas, o comportamento mecânico do tendão resulta em aspecto linear no gráfico. O tendão passa de estrutura elástica e resistente a lesões, para o ápice de sua rigidez, ganhando em precisão no movimento e transmissão de cargas, contudo, com maior susceptibilidade a lesões (THOMPSON et al., 2017; WANG; GUO; LI, 2012; FREEDMAN et al., 2014; ABAT et al., 2017).

Ao se chegar a uma deformação de aproximadamente 4%, inicia-se a fase 3. Nela o tendão continua com bom desempenho em termos de elongação e transmissão de cargas, contudo, ocorrem as primeiras lesões estruturais, cursando com gradativo declínio na rigidez do órgão. O “Ponto 3” no gráfico representa as primeiras falhas microscópicas do tecido. Caso as cargas continuem sendo aplicadas até cerca de 8 a 10% do alongamento máximo do tendão, serão notadas lesões macroscópicas e consequente déficit de função do órgão. Estima-se que ao ultrapassar esses 10% de elongação tendínea, ocorra ruptura total da estrutura (THOMPSON et al., 2017; WANG; GUO; LI, 2012; ABAT et al., 2017).

O caráter viscoelástico dos tendões, juntamente com seu aspecto de crimp lhes confere elasticidade e permite a absorção de altas quantidades de energia sem grande deformação. Isso ocorre caracteristicamente nos primeiros estágios de aplicação da carga, momento em que a estrutura é mais resistente a lesões, contudo, apresenta menor precisão na transmissão de cargas. Já com o contínuo aumento no estiramento tendíneo, a intensificação das ligações

cruzadas entre as fibras colagenosas reduz o deslizamento entre os fascículos e a deformação estrutural, dando rigidez ao tendão. O órgão passa a expressar menor elasticidade, adquirindo ótima transmissão de cargas e movimento, entretanto, alta susceptibilidade a lesões. A partir desse ápice de rigidez, com a manutenção das cargas aplicadas, ocorrem as primeiras lesões da estrutura, com consequente declínio da capacidade funcional até a ruptura total do tendão (ABAT et al., 2017; WANG; GUO; LI, 2012; FREEDMAN et al., 2014).

Com base nesses conceitos, as lesões tendíneas podem ser divididas em agudas e crônicas de acordo com o tipo de stress predominante que causou o dano. As lesões agudas resultam de aplicações de cargas intensas e abruptas, chegando até as zonas 3 e 4 da curva carga/elongação com rapidez. Geralmente são lesões relacionadas a atividades de alta intensidade, como as praticadas por atletas de alto rendimento (LIPMAN et al., 2018; SNEDEKER; FOOLEN, 2017; KLATTE-SCHULZ et al., 2018).

Já as lesões crônicas se desenvolvem a partir de cargas repetitivas aplicadas sobre o tendão, as quais alcançam, no mínimo, a região 3 do gráfico da figura 3, mas que não propiciam chegada à região 4. Logo, não ocorre ruptura maciça do órgão. Contudo, as tensões são repetitivas e frequentes, sem disponibilizar tempo suficiente para reparo adequado da estrutura. Esse processo culmina em gradativa desconfiguração da arquitetura tendínea e maior susceptibilidade a novas lesões (WALDEN et al., 2017; SCOTT; BACKMAN; SPEED, 2015; GROSS e HOFFMANN, 2013).

2.3 Reparo tendíneo

Em resposta às tendinopatias é desencadeado o reparo tendíneo. Esse processo ocorre em 3 fases principais e parcialmente sobrepostas: inflamação, proliferação e remodelamento, como é visto na figura 4 (LIPMAN et al., 2018; LI et al., 2016; THOMOPOULOS et al., 2015).

Imediatamente após a lesão ocorre liberação de fatores quimiotáticos e vasoativos pelas células locais. Isso resulta em aumento da permeabilidade vascular e migração de eritrócitos e células inflamatórias para o foco da lesão. Dentre as células inflamatórias, inicialmente predominam os neutrófilos e, após cerca de 24 horas, os macrófagos. Esses últimos agem na limpeza da lesão, realizando fagocitose do tecido necrosado. Em adição a isso, os macrófagos agem na perpetuação da inflamação, com contínua liberação de fatores quimiotáticos e pró-inflamatórios. Simultaneamente, forma-se hematoma que propicia a hemostasia primária do tecido. Essa primeira fase, a de inflamação, dura poucos dias, com

foco na hemostasia inicial e formação de um ambiente rico em células, nutrientes e sinalização, possibilitando a posterior formação de um novo tecido funcional (SNEDEKER; FOOLEN, 2017; LI et al., 2016; ZUMSTEIN et al., 2017).

A segunda fase se inicia com a diferenciação de fibroblastos, remanescentes do tendão e de tecidos vizinhos, em tenoblastos. Esse processo é induzido pelos vários fatores de crescimento e indutores presentes no local da lesão, derivados das células inflamatórias e parenquimatosas que continuam atuando desde a fase inflamatória do reparo. Essa segunda fase descrita é chamada de proliferativa. Dura algumas semanas e se caracteriza pela rápida formação e deposição de tecido de granulação desorganizado e rico em colágeno tipo III, além dos demais componentes da MEC. Há aumento na celularidade e vascularização, culminando em um tecido desorganizado, temporário e frágil (GROSS e HOFFMANN, 2013; LIPMAN et al., 2018; ZUMSTEIN et al., 2017).

Por fim tem-se a fase de remodelamento. Nela os tendões, como tecidos mecanossensíveis, passam por adaptações estruturais para melhor adequação às cargas aplicadas. O órgão já sofreu proliferação substancial como medida hemostática e de preenchimento, agora se inicia o aprimoramento de sua arquitetura, a fim de se aproximar das propriedades biomecânicas prévias à lesão. Isso envolve diminuição na vascularização e na celularidade, com lenta reciclagem da MEC. Ocorre gradual substituição das fibras de colágeno tipo III pelo do tipo I e reorganização dessas fibras em orientação uniaxial. Essa reciclagem se deve a um complexo processo de ativação dos tenócitos e liberação de proteases da MEC, enzimas que quebram o colágeno, proporcionando sua renovação. Essa fase do reparo se inicia por volta da sexta semana após a lesão e perdura por vários anos, com data de término indefinida. Segue com contínuas modificações voltadas para a obtenção de uma maior resistência e funcionalidade tendínea (SHAMASH et al., 2018; DEL BUONO et al., 2013; LAVAGNINO et al., 2015; YANG; ROTHRAUFF; TUAN, 2013).

De maneira geral, o reparo tendíneo é considerado um processo pouco eficiente. Os tendões são tecidos com metabolismo anaeróbico altamente desenvolvido, hipocelularizados e hipovascularizados, com fluxo sanguíneo chegando a ser 7,5 vezes menor do que o encontrado nos músculos esqueléticos. Essas características conferem aos tendões a capacidade de manutenção de tensões e transmissão de cargas com boa segurança contra isquemia e necrose (DAYTON, 2017). Contudo, essa configuração tecidual traz grandes prejuízos ao reparo tecidual descrito anteriormente, cursando com gradativa desorganização tecidual e déficit nas propriedades biomecânicas (SHARMA e MAFULLI, 2006; DAYTON, 2017).

2.4 As Tendinoses

A partir das características das lesões e do reparo tendíneo descritas anteriormente, pode-se descrever um conjunto de patologias que são foco desse estudo, as tendinoses. Trata-se de uma nomenclatura específica para lesões tendíneas crônicas que apresentam como causa base a soma de sucessivos danos ao tecido associados a um reparo ineficaz (SCOTT; BACKMAN; SPEED, 2015; SHAMASH et al, 2018).

Nas tendinoses há alteração na organizada estrutura de um tendão saudável, gerando repercussões na biomecânica e resistência do órgão. Macroscopicamente essas modificações são evidenciadas por um tendão amolecido, espessado, acastanhado e com superfície irregular (LI et al., 2016). Em nível microscópico têm-se alterações como hiper celularidade, com aumento no número de tenócitos; células tendíneas com conformação arredondada, perdendo sua característica estrutura alongada; aumento na vascularização; incremento da substância fundamental na MEC; surgimento de fenótipos aberrantes, como focos de células osteiodes e condroides em meio ao tendão; e, principalmente, desorganização das fibras colagenosas na MEC. Essas características estruturais se concentram nos pontos de lesão, mas também são encontradas em regiões saudáveis do tendão, configurando pontos de fragilidade no órgão (KLATTE-SCHULZ et al., 2018; SCOTT; BACKMAN; SPEED, 2015; SHIM et al., 2019). Walden et al. (2017) reforçam essa explicação ao mostrarem que em cerca de 97% das rupturas tendíneas espontâneas há presença de achados de degeneração patológica prévia, condizentes com uma tendinose.

Além dessa retroalimentação positiva da tendinose em um tendão, em que a lesão favorece cada vez mais a fragilidade do órgão e novo adoecimento, também há aumento no risco de lesões em outros tendões no organismo. Estão envolvidos diversos fatores, como mudanças na cadeia cinemática do indivíduo adoecido, sobrecarregando outras estruturas; déficits neurológicos proprioceptivos decorrentes do reparo tendíneo ineficaz; inatividade física em decorrência das limitações do adoecimento, levando a desarranjos no equilíbrio musculoesquelético; e a predisposição individual a novas lesões. Como exemplo, tem-se que paciente com ruptura de tendão calcâneo, apresenta cerca de 200 vezes mais chances de romper o tendão calcâneo contralateral, em relação às pessoas sem qualquer ruptura prévia (KRILL et al., 2018; FULTON et al., 2014; OPAR; SERPELL, 2014).

Nota-se, portanto, grande importância da microarquitetura tendínea para a resistência desses órgãos a lesões. Essa relação é reafirmada por diversos autores, os quais enumeram as

principais alterações biomecânicas que levam a essa susceptibilidade ao adoecimento. Há marcante redução na rigidez do tecido e déficits em diversos parâmetros usados para determinar a resistência do tendão a lesões, como o número de ciclos de carga capazes de gerar lesão, carga máxima suportada pelo órgão e deformação máxima da estrutura. A figura 5 traz como exemplo os gráficos dos resultados de um dos estudos usados como referência. Nele é feita a comparação de um reparo tendíneo eficaz com um ineficaz, demonstrando as alterações em três propriedades do órgão: força máxima transmitida no movimento, área de seção transversal e elasticidade (FREEDMAN; GORDON; SOSLOWSKY, 2014; GROSS; HOFFMANN, 2013; SHIM et al., 2019).

Observa-se, portanto importante retroalimentação positiva na fisiopatologia das tendinoses, em que as lesões alteram a estrutura tendínea e essas alterações fragilizam o órgão, tornando-o susceptível a novo dano. O grande mediador desse processo é a microarquitetura tendínea, a qual, caso preservada, tende a evitar a ocorrência dessa cascata de adoecimento. Com base nisso, mostra-se promissor o desenvolvimento de métodos de análise que explorem os tendões em sua organização microscópica, identificando alterações patológicas clássicas das tendinoses.

2.5 Métodos diagnósticos para Tendinoses

Dentre os principais métodos de análise tendínea com possibilidade de uso no diagnóstico das tendinoses disponíveis atualmente temos a varredura com microscopia óptica, a transformação de imagens pelo método de Fourier, análise com microscopia de luz polarizada, ultrassonografia (USG) e ressonância magnética (RM). A varredura com microscopia óptica, transformação de imagens pelo método de Fourier e análise com microscopia de luz polarizada são técnicas que requerem preparação tecidual especial, alta demanda de tempo e carecem de evidências clínicas para uso no cotidiano das análises tendíneas (LAKE et al., 2009; JARVINEN et al., 2004; SIVAGURU et al., 2014).

Já a USG e RM são os exames complementares mais utilizados na rotina dos serviços de saúde. Contudo, apresentam algumas limitações nas análises tendíneas. Apresentam bons resultados no diagnóstico de rupturas totais do tendão em sua secção transversal, mas com grande limitação no estudo das lesões parciais, com importante queda na sensibilidade e especificidade dos achados (SEO; YOO; RYU, 2014). Hodgson, Oconnor e Grainger (2012) mostram que para lesões completas de tendão, a USG apresenta sensibilidade de 92 a 96% e especificidade de 93 a 96%, contudo, com as lesões parciais, essa sensibilidade cai para até

67% e a especificidade, para 89%. Weinreb et al. (2014) descrevem que em rupturas totais dos tendões do manguito rotador, a RM apresenta sensibilidade de 92,1% e especificidade de 92,9%. Já nas rupturas parciais, a sensibilidade do exame cai para 63,6% e a especificidade para 91,7%.

Além disso, a USG e a RM apresentam marcante incompatibilidade entre os achados na imagem e o quadro clínico do paciente (BLEY; ABID, 2015; KAUX et al., 2011; TITAN; ANDARAWIS-PURI, 2016). Chimenti et al. (2017) abordam que até 35% de pessoas assintomáticas podem ter achados compatíveis com lesões tendíneas na USG, enquanto até 19% de pessoas sintomáticas, podem apresentar exame totalmente normal. Matthews et al. (2018) trazem valores ainda maiores, descrevendo que em cerca de 59% dos indivíduos, assintomáticos, apresentarão achados compatíveis com tendinopatia na USG.

Outra limitação da RM e da USG é a incapacidade de visualizar o tendão em sua microarquitetura, tão importante para as funções do órgão, como já discorrido anteriormente. Esses exames se limitam a achados por áreas, alteradas em ecogenicidade ou em intensidade de sinal. Essa é a grande lacuna a ser explorada por nosso trabalho, com um método de análise a nível microscópico, estudando a fundamental microarquitetura tendínea (TITAN; ANDARAWIS-PURI, 2016; HODGSON; OCONNOR; GRAINGER, 2012).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de um estudo metodológico para validação de rotina de análise automatizada da organização do tecido tendíneo.

3.1 Experimentação animal e aquisição de imagens

As imagens foram obtidas a partir de tecido tendíneo preservado em parafina de um rato Wistar macho adulto (257 g) proveniente do Biotério do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). Os experimentos descritos a seguir foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da instituição local (CEUA-UFRN, Nº 038/2014). Os procedimentos consistiram na realização de tenotomia parcial no terço médio do tendão calcâneo direito utilizando agulha de seringa (calibre 18) para perfuração, estando o rato previamente anestesiado (isoflurano 2-3%). Durante todo o período experimental, o animal permaneceu alojado em condições controladas de temperatura (24 °C) e iluminação (ciclo claro/escuro 12/12h), com água e ração ad libitum. Após 35 dias de reparo, o animal foi eutanasiado com alta dose intraperitoneal de cetamina e xilazina e os tendões calcâneos direito (lesionado) e esquerdo (controle) foram isolados em solução de paraformaldeído 4% tamponado. Após 24 h de fixação, os dois tendões foram desidratados, embebidos em parafina e seccionados (5 µm) longitudinalmente. As secções foram coradas com H&E, e examinadas em microscópio Leica DM750 acoplado com câmera Leica ICC 50HD, localizados no Laboratório de Microscopia do Departamento de Ciências da Saúde, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, UFRN, Mossoró-RN. Quatro campos histológicos (objetiva de 20x) foram capturados a partir do terço médio de cada tendão.

3.2 Processamento das imagens

As oito imagens obtidas foram submetidas a processamento computacional com uso do software ImageJ v1.52 (NIH, Bethesda, MD, USA; <http://rsb.in-fo.nih.gov/ij/>). As etapas do processamento foram as seguintes:

- a) Realizou-se a abertura da imagem original, utilizando a função Open;
- b) Utilizou-se o plugin Colour Deconvolution (RUIFROK; JOHNSTON, 2001), o qual permite separar canais de cores em três imagens 8-bit distintas (hematoxilina, eosina e

background). Foi selecionada a imagem respectiva ao canal hematoxilina, o qual preserva os perfis nucleares dos tenócitos;

c) Foi criada uma cópia para a imagem selecionada anteriormente, utilizando a função Duplicate;

d) À imagem original foi aplicado o filtro Gaussian Blur, com Sigma de 1.0. Já para a imagem “cópia” foi utilizado o mesmo filtro, mas com Sigma de 30.0;

e) Em seguida, com uso da função Image Calculator, a imagem em canal hematoxilina, obtida na etapa “b”, foi subtraída pela sua cópia previamente submetida ao filtro Gaussian Blur, obtida na etapa “d”;

f) A imagem resultante da etapa “e” foi então invertida (função Invert);

g) A imagem produto da etapa “f” foi submetida à função Find Maxima, com as seguintes especificações: Noise tolerance 20.0, Output type do tipo Maxima Within Tolerance, além de selecionadas as opções Light background e Exclude edge maxima;

h) Executou-se a função Analyze particles com parâmetros Size de 0 a infinito e Circularity de 0 a 1.0. Foram selecionadas as opções Exclude on edges e a exibição de resultados (perfis nucleares) como elipses (opção Show Ellipses).

A execução do processamento descrito acima foi realizada por meio de uma macro a fim de automatizar as análises.

3.3 Cálculo da eficiência do método

A eficiência da rotina computacional em detectar núcleos de tenócitos nas imagens foi calculada a partir da razão entre o número de núcleos automaticamente detectados e o número de tenócitos contabilizados manualmente por examinador experiente (ZACH et al., 2016).

3.4 Análise do Desvio Padrão Circular, da celularidade e da Razão de Aspecto

Os dados obtidos com o processamento das imagens foram tabulados em planilhas utilizando o software Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, USA). Utilizando-se a estatística circular, foi calculado o desvio padrão circular (DPC) entre os ângulos de orientação das elipses representando os perfis nucleares, isolados com o processamento das imagens. O DPC é o equivalente do desvio padrão na estatística linear. Quanto menor o DPC, mais alinhados os núcleos celulares (SILVA et al., 2017).

Foi computado ainda o total de perfis nucleares em cada imagem, indicativo da celularidade tecidual. Adicionalmente foram consideradas as medidas dos eixos dos perfis nucleares para obtenção da razão maior eixo/menor eixo (ou Razão de Aspecto – RA). A RA é representada por valores numéricos ≥ 1 . Contribui na denotação do formato celular, em que valores próximos ao 1 indicam perfis arredondados, e valores distantes do 1, configuração elíptica.

3.5 Análise estatística

Os dados provenientes dos dois grupos de imagens (lesão versus controle) foram analisados com o software Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, USA) e expressos como média $\pm$ desvio padrão. Assumindo um $p < 0,05$, foi aplicado o teste t de Student não pareado na comparação de tais dados (DPC, RA e celularidade).

4 RESULTADOS

A figura 1 ilustra as etapas da rotina computacional desenvolvida, aplicada a uma imagem de tendão controle.

Calculou-se a eficiência da rotina computacional em detectar núcleos de tenócitos nas imagens de tendões controle e lesionado. Os resultados estão expostos na tabela 1, mostrando eficiência que variou entre 87,27% e 96,96%.

Os dados obtidos com o processamento das imagens do grupo controle e grupo lesionados foram submetidos a comparação com uso do teste t de Student não pareado, admitindo $p < 0,05$. Os resultados da comparação estão disponíveis na tabela 2.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que o método desenvolvido é acurado na análise da organização do tecido tendíneo. Apresentou resultados satisfatórios no isolamento dos núcleos tenócitos quando comparado à avaliação de examinador experiente, com eficiência de 87,27% a 96,96%. Também se mostrou relevante na comparação entre tendões saudáveis e lesionados, com expressiva diferença nas variáveis de celularidade, razão de aspecto e desvio padrão celular.

Quando lesionados e reparados, os tendões sofrem diversas alterações em sua estrutura, tanto em seus componentes celulares, quanto nos constituintes da matriz extracelular. Em condições saudáveis, a MEC é formada por uma hierarquizada estrutura colagenosa, organizada em fascículos alinhados e distribuídos paralelamente uns aos outros, características essenciais para as funções e propriedades biomecânicas dos tendões (SNEDEKER; FOOLEN, 2017; FULTON et al., 2014). Em tendões lesados e reparados, esses fascículos assumem orientações diversas, impossibilitando a separação dos feixes colagenosos em unidades, etapa que é necessária para a análise da imagem por meio do ImageJ. Já os núcleos dos tenócitos, apesar de intensa irregularidade em formato, número e disposição, continuam apresentando limites dimensionais visíveis e delimitáveis, independentemente do grau de lesão do tendão. Isso possibilita o isolamento dessas estruturas com maior precisão durante as etapas de processamento com o ImageJ (WALDEN et al., 2017).

Com base nessa possibilidade de isolamento do núcleo dos tenócitos, o presente trabalho se utilizou dessas estruturas como alvos do processamento e análise, a fim de dimensionar o grau de organização do tecido tendíneo. Sabe-se que em um tendão lesionado, suas células sofrem diversas alterações, principalmente em quantidade (aumento da celularidade), fenótipo (passando de células alongadas e fusiformes para uma conformação arredondada) e angulações (células antes uniformemente alinhadas, agora dispostas de maneira variada) (BIASUTTI et al., 2017). A partir disso, foram tomados três parâmetros para estudo da organização do tecido tendíneo: a celularidade, a razão de aspecto e o desvio padrão circular.

Os resultados expostos na tabela 2 mostraram diferenças significativas nessas três variáveis ao serem comparadas as imagens do tendão lesionado às do tendão controle. O DPC mediu a dispersão da angulação dos perfis nucleares a partir de um valor de angulação média obtida na amostra. Assim, quanto maior o DPC, maior a variação na disposição dos tenócitos, um importante indicativo de lesão tecidual (conforme observado na tabela, não preciso

descrever os resultados). Na tabela 2, observa-se desvio padrão circular médio de 10,46 para as imagens do tendão lesionado e de 6,19 para as do tendão controle, dados condizentes com as condições experimentais de cada tendão (SHIM et al., 2019; KLATTE-SCHULZ et al., 2018). Na avaliação do fenótipo das células tendíneas foi utilizada a razão de aspecto. Essa variável é resultado da proporção entre eixo maior e menor de uma determinada forma geométrica, com valores ≥ 1 . Em casos de estruturas mais arredondadas, o comprimento dos eixos são semelhantes, já em formas elípticas, as medidas apresentam diferença mais acentuada, logo, proporções numéricas que tendem a valores bem maiores que 1. Nos tecidos tendíneos saudáveis, a morfologia dos núcleos dos tenócitos apresenta caráter elipsoide, com RA que numericamente se afasta do valor 1. Já nos órgãos lesados, há uma maior proporção de tenócitos com formato arredondado, em que a RA se aproxima de 1. Essas impressões foram confirmadas a partir das análises por meio da rotina computacional desenvolvida, com RA médio de 3,33 para as imagens do tendão lesionado e 4,01 para o tendão controle, como expostos na tabela 2 (FREEDMAN et al., 2018). Em relação à celularidade, os tendões em processo de reparo tecidual apresentam aumento na contagem de células, diferença também exposta na tabela 2 (LI; HUA, 2016).

Um dos pontos cruciais para a execução do trabalho foram as etapas de detecção e isolamento dos núcleos de tenócitos durante o processamento das imagens, diferenciando-os de outros grupamentos celulares (como células endoteliais) e artefatos histológicos (como áreas de MEC com coloração aberrante). Caso a macro desenvolvida não realizasse preciso isolamento dos perfis nucleares dos tenócitos, acabariam sendo envolvidos outros componentes (por exemplo, fibras de colágeno e células endoteliais) dos tendões com orientação completamente diferente das células tendíneas, prejudicando a análise da organização tecidual. Esse obstáculo do estudo foi superado com sucesso, como exposto na tabela 1, em que a eficiência do processamento computacional em isolar os núcleos desejados foi de 87,27% a 96,96%.

Observa-se crescente demanda no contexto da saúde para o desenvolvimento e utilização de métodos diagnósticos cada vez mais acurados e automatizados, a fim de reduzir vieses de aferição. A escolha de um método ideal para análise de um órgão, como os tendões, dependerá de seu custo benefício, considerando pontos positivos e negativos da utilização de tal exame (SCHEERENS et al., 2017; CHANDRA; SKINNER, 2017). Das alternativas atuais para análise da estrutura tendínea, as mais utilizadas na prática clínica são a USG e a RM, além dos métodos mais explorados no âmbito experimental, como a análise por Fast Fourier Transform (FFT) (MATTHEWS et al., 2018; SIVAGURU et al., 2014).

A USG e a RM são exames muito acurados quanto em relação a rupturas totais dos tendões, com sensibilidade de aproximadamente 92% para a USG e de 93% para a RM. Contudo, apresentam importante limitação na observação de lesões parciais dos tendões, com sensibilidade em cerca de 67% para a USG e por volta de 64% no caso da RM (HODGSON; OCONNOR; GRAINGER; 2012; WEINREB et al., 2014). Outra limitação importante diz respeito à marcante incompatibilidade entre os achados na imagem e o quadro clínico do paciente, em que até 35% de pessoas assintomáticas podem apresentar achados compatíveis com lesões tendínea na USG (BLEY; ABID, 2015; CHIMENTI et al., 2017). Além disso, a USG e RM não exploram os tendões em sua organização a nível histológico que, como falado, muito se altera em situações de adoecimento (TITAN; ANDARAWIS-PURI, 2016; SEO; YOO; RYU, 2014). A rotina computacional desenvolvida no presente trabalho analisa os tendões em sua microarquitetura, podendo observar pequenas alterações, como as lesões parciais dos órgãos, uma grande limitação da RM e da USG.

A análise tendínea com uso do FFT é um dos principais métodos de processamento automatizado para quantificação da organização tecidual utilizados na atualidade. Baseia-se na observação e quantificação dos feixes de colágeno, fornecendo dados sobre frequência de disposição dessas estruturas. Nesse aspecto, o método desenvolvido no presente estudo é vantajoso por determinar o grau de organização tecidual a partir da observação dos núcleos dos tenócitos. Os núcleos apresentam limites bem definidos nas visualizações microscópicas, podendo ser isoladas e analisadas em número, dimensões e angulação. Enquanto que os feixes de colágeno exibem dimensões variáveis, com imprecisa delimitação de seus limites, o que prejudica a análise individualizada de cada estrutura (FUNG et al., 2010; FRISCH et al., 2012).

O método desenvolvido nesse trabalho trata-se de uma rotina computacional com execução extremamente rápida, levando poucos segundos. Apresenta caráter automatizado e pouco dependente de examinador, minimizando a subjetividade no estudo morfológico dos tendões. O método foi desenvolvido para o uso em lâminas coradas com H&E, técnica acessível e largamente utilizada em pesquisa básica (FAN et al., 2019; NAKANISHI et al., 2019; ABDOLU et al., 2019). Outra vantagem se refere ao uso do ImageJ, um software de domínio público e amplamente utilizado no meio científico, tornando o método executável com baixo custo (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012).

Apesar de diversos trabalhos terem utilizado biópsias tendíneas humanas em ensaios clínicos, o caráter invasivo da coleta de amostras acarreta em riscos adicionais aos quais não seriam expostos os pacientes submetidos, por exemplo, a avaliação por USG ou RM, sendo

esta a grande limitação da técnica apresentada no presente estudo (DAKIN et al., 2018; AHLÉN et al., 2014; FARFARAS et al., 2018; MINKWITZ et al., 2017; KLATTE-SCHULZ et al., 2018).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do presente estudo mostraram que o novo método desenvolvido para análise automatizada da organização do tecido tendíneo é eficiente na detecção dos perfis nucleares dos tenócitos, assim como na comparação entre tendões saudáveis e lesionados. São necessários novos estudos, especialmente ensaios clínicos voltados para a correlação entre os dados analisados com a rotina computacional e o quadro clínico dos pacientes.

REFERÊNCIAS

- ABAT, F.; ALFREDSON, H.; CUCCHIARINI, M.; et al. Current trends in tendinopathy: consensus of the ESSKA basic science committee. Part I: biology, biomechanics, anatomy and an exercise-based approach. **Journal of Experimental Orthopaedics**, v. 4, n. 1, 2017.
- ABDOU, Mohamed Attia; KIM, Ga-Eon; KIM, Jangho; et al. How Long Should We Wait to Create the Goutallier Stage 2 Fatty Infiltrations in the Rabbit Shoulder for Repairable Rotator Cuff Tear Model? **BioMed research international**, v. 2019, n. 5, p. 1-11, 2019.
- AHLÉN, Martina; LIDÉN, Mattias; MOVIN, Tomas; et al. Histological Evaluation of Regenerated Semitendinosus Tendon a Minimum of 6 Years After Harvest for Anterior Cruciate Ligament Reconstruction. **Orthopaedic journal of sports medicine**, v. 29, n. 10, p. 146-151, 2014.
- APARECIDA DE ARO, Andrea; DE CAMPOS VIDAL, Benedicto; PIMENTEL, Edson Rosa. **Biochemical and anisotropical properties of tendons**, v. 43, n. 2–3, p. 205–214, 2012.
- ASAHARA, Hiroshi; INUI, Masafumi; LOTZ, Martin K. Tendons and Ligaments: Connecting Developmental Biology to Musculoskeletal Disease Pathogenesis. **Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, v. 32, n. 9, p. 1773–1782, 2017.
- BEACH, Zakary M.; GITTINGS, Daniel J.; SOSLOWSKY, Louis J. Tendon Biomechanics. In: CANATA, Gian Luigi; D’HOOGHE, Pieter; HUNT, Kenneth J. (Orgs.). **Muscle and Tendon Injuries**, p. 15–22, 2017.
- BENJAMIN, M.; KAISER, E.; MILZ, S. Structure-function relationships in tendons: a review. **Journal of Anatomy**, v. 212, n. 3, p. 211–228, 2008.
- BIASUTTI, Sara; DART, Andrew; SMITH, Margaret; et al. Spatiotemporal variations in gene expression, histology and biomechanics in an ovine model of tendinopathy. **PloS one**, v. 12, n. 10, 2017.
- BLEY, Bradley; ABID, Waqas. Imaging of Tendinopathy: A Physician’s Perspective. **Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy**, v. 45, n. 11, p. 826–828, 2015.
- CHANDRA, A.; SKINNER, J. Technology Growth and Expenditure Growth in Health Care. **Journal of Economic Literature**, v. 50, n. 3, p. 645-680, 2012.
- CHIMENTI, Ruth L; CYCHOSZ, Chris C; HALL, Mederic M; et al. Current Concepts Review Update: Insertional Achilles Tendinopathy. **Foot & ankle international**, v. 38, n. 10, p. 1160–1169, 2017.

DAKIN, Stephanie Georgina; NEWTON, Julia; MARTINEZ, Fernando O; et al. Chronic inflammation is a feature of Achilles tendinopathy and rupture. **British journal of sports medicine**, v. 52, n. 6, p. 359–367, 2018.

DAYTON, Paul. Anatomic, Vascular, and Mechanical Overview of the Achilles Tendon. **Clinics in Podiatric Medicine and Surgery**, v. 34, n. 2, p. 107–113, 2017.

DEL BUONO, Angelo; OLIVA, Francesco; OSTI, Leonardo; et al. Metalloproteases and tendinopathy. **Muscles, Ligaments And Tendons Journal**, v. 3, n. 1, p. 51-57, 2013.

EGGER, Anthony C.; BERKOWITZ, Mark J. Achilles tendon injuries. **Current Reviews in Musculoskeletal Medicine**, v. 10, n. 1, p. 72–80, 2017.

FAN, Lixia; XU, Bin; LIU, Ning; et al. Histopathological changes in patellar tendon enthesis of rabbit induced by electrical stimulation intensity. **Journal of Orthopaedic Science**, 2019.

FARFARAS, Stefanos; EJERHED, Lars Erik; HALLSTRÖM, Erling K; et al. More histologic and ultrastructural degenerative signs in the subscapularis tendon and the joint capsule in male patients with shoulder impingement. **Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy : official journal of the ESSKA**, v. 26, n. 1, p. 79–87, 2018.

FRANCHI, Marco; TRIRÈ, Alessandra; QUARANTA, Marilisa; et al. Collagen structure of tendon relates to function. **The Scientific World Journal**, v. 7, p. 404–420, 2007.

FREEDMAN, Benjamin R.; RODRIGUEZ, Ashley B.; LEIPHART, Ryan J.; et al. Dynamic Loading and Tendon Healing Affect Multiscale Tendon Properties and ECM Stress Transmission. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 2018.

FREEDMAN, Benjamin R.; SARVER, Joseph J.; BUCKLEY, Mark R.; et al. Biomechanical and structural response of healing Achilles tendon to fatigue loading following acute injury. **Journal of Biomechanics**, v. 47, n. 9, p. 2028–2034, 2014.

FREEDMAN, Benjamin R; GORDON, Joshua A; SOSLOWSKY, Louis J. The Achilles tendon: fundamental properties and mechanisms governing healing. **Muscles, ligaments and tendons journal**, v. 4, n. 2, p. 245–255, 2014.

FREEDMAN, Benjamin R; RODRIGUEZ, Ashley B; HILLIN, Cody D; et al. Tendon healing affects the multiscale mechanical, structural and compositional response of tendon to quasi-static tensile loading. **Journal of the Royal Society**, v. 15, n. 139, 2018.

FRISCH, Kayt E.; DUENWALD-KUEHL, Sarah E.; KOBAYASHI, Hirohito; et al. Quantification of collagen organization using fractal dimensions and Fourier transforms. **Acta Histochemica**, v. 114, n. 2, p. 140–144, 2012.

FULTON, Jessica; WRIGHT, Kathryn; KELLY, Margaret; et al. Injury risk is altered by previous injury: a systematic review of the literature and presentation of causative

neuromuscular factors. **International journal of sports physical therapy**, v. 9, n. 5, p. 583–595, 2014.

FUNG, David T; WANG, Vincent M; ANDARAWIS-PURI, Nelly; et al. Early response to tendon fatigue damage accumulation in a novel in vivo model. **Journal of biomechanics**, v. 43, n. 2, p. 274–279, 2010.

GOOM, Thomas S.H.; MALLIARAS, Peter; REIMAN, Michael P.; et al. Proximal Hamstring Tendinopathy: Clinical Aspects of Assessment and Management. **Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy**, v. 46, n. 6, p. 483–493, 2016.

GREGORY, Bonnie P.; WYSOCKI, Robert W.; COHEN, Mark S. Controversies in Surgical Management of Recalcitrant Enthesopathy of the Extensor Carpi Radialis Brevis. **The Journal of Hand Surgery**, v. 41, n. 8, p. 856–859, 2016.

GROSS, Gerhard; HOFFMANN, Andrea. Therapeutic Strategies for Tendon Healing Based on Novel Biomaterials, Factors and Cells. **Pathobiology**, v. 80, n. 4, p. 203–210, 2013.

HESS, Gregory William. Achilles Tendon Rupture: A Review of Etiology, Population, Anatomy, Risk Factors, and Injury Prevention. **Foot & Ankle Specialist**, v. 3, n. 1, p. 29–32, 2010.

HODGSON, R J; O’CONNOR, P J; GRAINGER, A J. Tendon and ligament imaging. **The British journal of radiology**, v. 85, n. 1016, p. 1157–1172, 2012.

HUTTUNEN, Tuomas T.; KANNUS, Pekka; ROLF, Christer; et al. Acute Achilles Tendon Ruptures: Incidence of Injury and Surgery in Sweden Between 2001 and 2012. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 42, n. 10, p. 2419–2423, 2014.

JARVINEN, Tero A. H.; JARVINEN, Teppo L. N.; KANNUS, Pekka; et al. Collagen fibres of the spontaneously ruptured human tendons display decreased thickness and crimp angle. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 22, n. 6, p. 1303–1309, 2004.

KAUX, Jean-François; FORTHOMME, Bénédicte; GOFF, Caroline Le; et al. Current opinions on tendinopathy. **Journal of Sports Science and Medicine**, v. 10, n. 2, p. 238–253, 2011.

KHAYYERI, Hanifeh; BLOMGRAN, Parmis; HAMMERMAN, Malin; et al. Achilles tendon compositional and structural properties are altered after unloading by botox. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017.

KILLIAN, Megan L.; CAVINATTO, Leonardo; GALATZ, Leesa M.; et al. The role of mechanobiology in tendon healing. **Journal of Shoulder and Elbow Surgery**, v. 21, n. 2, p. 228–237, 2012.

KLATTE-SCHULZ, Franka; MINKWITZ, Susann; SCHMOCK, Aysha; et al. Different Achilles Tendon Pathologies Show Distinct Histological and Molecular Characteristics. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 2, p. 404-420, 2018.

KRILL, Michael K.; HOFFMAN, Joshua; YANG, JaeWon; et al. Previous foot injuries associated with a greater likelihood of Achilles tendon ruptures in professional American football players. **The Physician and Sportsmedicine**, v. 46, n. 3, p. 342–348, 2018.

LACERDA NETO, José C. de; FREITAS, Juliana M.R. de; POGGIANI, Franco M.; et al. Serial superficial digital flexor tendon biopsies for diagnosing and monitoring collagenase-induced tendonitis in horses. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 6, p. 710–718, 2013.

LAKE, Spencer P.; MILLER, Kristin S.; ELLIOTT, Dawn M.; et al. Effect of fiber distribution and realignment on the nonlinear and inhomogeneous mechanical properties of human supraspinatus tendon under longitudinal tensile loading. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 27, n. 12, p. 1596–1602, 2009.

LAVAGNINO, Michael; WALL, Michelle E.; LITTLE, Dianne; et al. Tendon mechanobiology: Current knowledge and future research opportunities: TENDON MECHANOBIOLOGY. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 33, n. 6, p. 813–822, 2015.

LI, Hong-Yun; HUA, Ying-Hui. Achilles Tendinopathy: Current Concepts about the Basic Science and Clinical Treatments. **BioMed research international**, v. 2016, 2016.

LIAN, Østein B.; ENGBRETSSEN, Lars; BAHR, Roald. Prevalence of Jumper's Knee among Elite Athletes from Different Sports: A Cross-sectional Study. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 33, n. 4, p. 561–567, 2005.

LIN, Meng-Ting; CHIANG, Ching-Fang; WU, Chueh-Hung; et al. Comparative Effectiveness of Injection Therapies in Rotator Cuff Tendinopathy: A Systematic Review, Pairwise and Network Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 100, n. 2, p. 336-349.e15, 2019.

LIPMAN, Kelsey; WANG, Chenchao; TING, Kang; et al. Tendinopathy: injury, repair, and current exploration. **Drug Design, Development and Therapy**, v. Volume 12, p. 591–603, 2018.

LONGO, Umile Giuseppe; RONGA, Mario; MAFFULLI, Nicola. Achilles Tendinopathy. **Sports Medicine And Arthroscopy Review**, v. 17, n. 2, p.112-126, 2009.

MAFFULLI, Nicola; VIA, Alessio Gai; OLIVA, Francesco. Chronic Achilles Tendon Disorders. **Clinics in Sports Medicine**, v. 34, n. 4, p. 607–624, 2015.

MAGNAN, Bruno; BONDI, Manuel; PIERANTONI, Silvia; et al. The pathogenesis of Achilles tendinopathy: A systematic review. **Foot and Ankle Surgery**, v. 20, n. 3, p. 154–159, 2014.

MALLIARAS, Peter; BARTON, Christian J.; REEVES, Neil D.; et al. Achilles and Patellar Tendinopathy Loading Programmes: A Systematic Review Comparing Clinical Outcomes and Identifying Potential Mechanisms for Effectiveness. **Sports Medicine**, v. 43, n. 4, p. 267–286, 2013.

MATTHEWS, Wesley; ELLIS, Richard; FURNESS, James; et al. Classification of Tendon Matrix Change Using Ultrasound Imaging: A Systematic Review and Meta-analysis. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 44, n. 10, p. 2059–2080, 2018.

MINKWITZ, Susann; SCHMOCK, Aysha; KURTOGLU, Alper; et al. Time-Dependent Alterations of MMPs, TIMPs and Tendon Structure in Human Achilles Tendons after Acute Rupture. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 10, 2017.

NAKANISHI, Yoshitaka; OKADA, Takamitsu; TAKEUCHI, Naohide; et al. Histological evaluation of tendon formation using a scaffold-free three-dimensional-bioprinted construct of human dermal fibroblasts under in vitro static tensile culture. **Regenerative therapy**, v. 11, p. 47–55, 2019.

OBST, Steven J.; HEALES, Luke J.; SCHRADER, Benjamin L.; et al. Are the Mechanical or Material Properties of the Achilles and Patellar Tendons Altered in Tendinopathy? A Systematic Review with Meta-analysis. **Sports Medicine**, v. 48, n. 9, p. 2179–2198, 2018.

OPAR, David A.; SERPELL, Benjamin G. Is There a Potential Relationship Between Prior Hamstring Strain Injury and Increased Risk for Future Anterior Cruciate Ligament Injury? **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 95, n. 2, p. 401–405, 2014.

PARDES, A. M.; FREEDMAN, B. R.; FRYHOFER, G. W.; et al. Males have Inferior Achilles Tendon Material Properties Compared to Females in a Rodent Model. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 44, n. 10, p. 2901–2910, 2016.

PIETRZAK, Jurek RT; KAYANI, Babar; TAHMASSEBI, Jenni; et al. Proximal hamstring tendinopathy: pathophysiology, diagnosis and treatment. **British Journal of Hospital Medicine**, v. 79, n. 7, p. 389–394, 2018.

RUIFROK, Arnout; JOHNSTON, Dennis. Quantification of histochemical staining by color deconvolution. **Analytical and Quantitative Cytology and Histology**, v. 23, n. 4, p. 291–299, 2001.

SANTOS SILVA, Flávio; BORTOLIN, Raul; ARAUJO, Diego; et al. Exercise training ameliorates matrix metalloproteinases 2 and 9 mRNA expression and mitigates adverse left ventricular remodeling in streptozotocin-induced diabetic rats. **Cardiovascular Pathology**, v. 29, p. 37–44, 2017.

SCHEERENS, H; MALONG, A; BASSETT, K; et al. Current Status of Companion and Complementary Diagnostics: Strategic Considerations for Development and Launch. **Clinical and translational science**, v. 10, n. 2, p. 84–92, 2017.

SCHNEIDER, Caroline A; RASBAND, Wayne S; ELICEIRI, Kevin W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, p. 671-675, 2012.

SCOTT, Alex; BACKMAN, Ludvig J.; SPEED, Cathy. Tendinopathy: Update on Pathophysiology. **Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy**, v. 45, n. 11, p. 833–841, 2015.

SCREEN, Hazel R. C.; BERK, David E.; KADLER, Karl E.; et al. Tendon Functional Extracellular Matrix: TENDON FUNCTIONAL EXTRACELLULAR MATRIX. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 33, n. 6, p. 793–799, 2015.

SEITZ, Amee L.; MCCLURE, Philip W.; FINUCANE, Sheryl; et al. Mechanisms of rotator cuff tendinopathy: Intrinsic, extrinsic, or both? **Clinical Biomechanics**, v. 26, n. 1, p. 1–12, 2011.

SEO, Joong-Bae; YOO, Jae-Sung; RYU, Jee-Won. Sonoelastography findings of biceps tendinitis and tendinosis. **Journal of ultrasound**, v. 17, n. 4, p. 271–277, 2014.

SHAMASH, Kelby B; HANNEY, William J; CHEATHAM, Scott W; et al. Rotator Cuff Tendinopathy: An Evidence-Based Overview for the Sports Medicine Professional. **Strength and Conditioning Journal**, v. 40, n. 4, p. 61-71, 2018.

SHARMA, P; MAFULLI, N. Biology of tendon injury: healing, modeling and remodeling. **J Musculoskelet Neuronal Interact**, v. 6, n. 2, p. 181–190, 2006.

SHIM, Vickie; HANSEN, Wencke; NEWSHAM-WEST, Richard; et al. Influence of altered geometry and material properties on tissue stress distribution under load in tendinopathic Achilles tendons – A subject-specific finite element analysis. **Journal of biomechanics**, v. 82, p. 142-148, 2019.

SIVAGURU, Mayandi; RICHARDS, James; DIBNER, Julia; et al. Quantitative Analysis of Tendon Structural Integrity in Chickens using Fourier Transform-Second Harmonic Generation Imaging. **Cell & Developmental Biology**, v. 3, n. 2, 2014.

SNEDEKER, Jess; FOOLEN, Jasper. Tendon injury and repair – A perspective on the basic mechanisms of tendon disease and future clinical therapy. **Acta Biomaterialia**, v. 63, p. 18-36, 2017.

THOMOPOULOS, Stavros; PARKS, William C.; RIFKIN, Daniel B.; et al. Mechanisms of tendon injury and repair: TENDON INJURY AND REPAIR. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 33, n. 6, p. 832–839, 2015.

THOMPSON, Mark S. Tendon Mechanobiology: Experimental Models Require Mathematical Underpinning. **Bulletin of Mathematical Biology**, v. 75, n. 8, p. 1238–1254, 2013.

THOMPSON, Mark S; BAJURI, M Nazri; KHAYYERI, Hanifeh; et al. Mechanobiological modelling of tendons: Review and future opportunities. Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: **Journal of Engineering in Medicine**, v. 231, n. 5, p. 369–377, 2017.

THORPE, Chavaunne T.; UDEZE, Chineye P.; BIRCH, Helen L.; et al. Specialization of tendon mechanical properties results from interfascicular differences. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 9, n. 76, p. 3108–3117, 2012.

TITAN, Ashley; ANDARAWIS-PURI, Nelly. Tendinopathy: Investigating the Intersection of Clinical and Animal Research to Identify Progress and Hurdles in the Field. **JBJS reviews**, v. 4, n. 10, 2016.

VOLETI, Pramod B.; BUCKLEY, Mark R.; SOSLOWSKY, Louis J. Tendon Healing: Repair and Regeneration. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 14, n. 1, p. 47–71, 2012.

WALDEN, Grace; LIAO, Xin; DONELL, Simon; et al. A Clinical, Biological, and Biomaterials Perspective into Tendon Injuries and Regeneration. **Tissue engineering. Part B, Reviews**, v. 23, n. 1, p. 44–58, 2017.

WANG, James H-C.; GUO, Qianping; LI, Bin. Tendon Biomechanics and Mechanobiology—A Minireview of Basic Concepts and Recent Advancements. **Journal of Hand Therapy**, v. 25, n. 2, p. 133–141, 2012.

WANG, Tao; CHEN, Peilin; ZHENG, Monica; et al. In vitro loading models for tendon mechanobiology. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 36, n. 2, p. 566–575, 2017.

WEINFELD, Steven B. Achilles Tendon Disorders. **Medical Clinics of North America**, v. 98, n. 2, p. 331–338, 2014.

WEINREB, Jeffrey H; SHETH, Chirag; APOSTOLAKOS, John; et al. Tendon structure, disease, and imaging. **Muscles, ligaments and tendons journal**, v. 4, n. 1, p. 66–73, 2014.

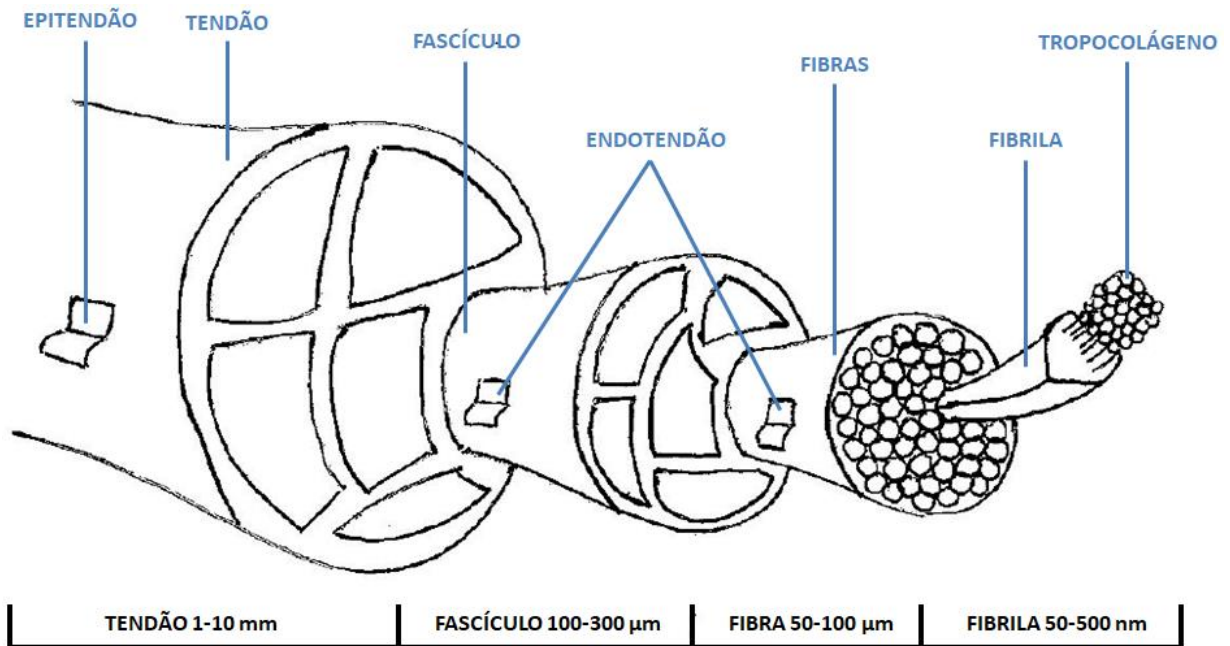
YANG, Guang; ROTHRAUFF, Benjamin B.; TUAN, Rocky S. Tendon and ligament regeneration and repair: Clinical relevance and developmental paradigm: Tendon and Ligament Regeneration and Repair. **Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews**, v. 99, n. 3, p. 203–222, 2013.

ZACH, Bernhard; HOFER, Ernst; ASSLABER, Martin; et al. Automated Texture Analysis and Determination of Fibre Orientation of Heart Tissue: A Morphometric Study. **PLoS One**, v. 11, n. 8, 2016.

ZUMSTEIN, M.-A.; LÄDERMANN, A.; RANIGA, S.; et al. The biology of rotator cuff healing. **Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research**, v. 103, n. 1, p. S1–S10, 2017.

**ANEXO A – ESQUEMA PARA REPRESENTAÇÃO DA ORGANIZAÇÃO
HIERÁRQUICA DO COMPONENTE COLAGENOSO DA MATRIZ
EXTRACELULAR.**

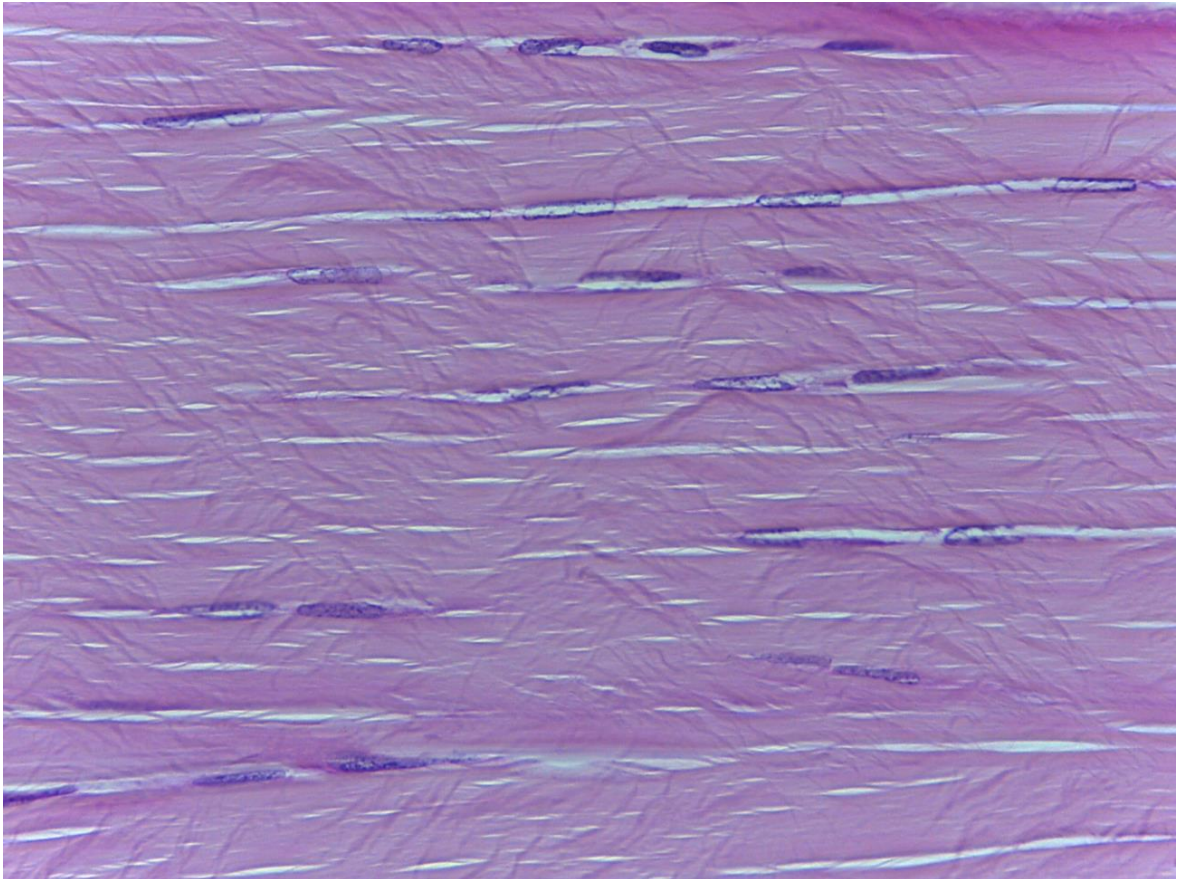
Figura 1 –Esquema para representação da organização hierárquica do componente colagenoso da matriz extracelular.



Fonte: Freedman et al. (2018).

ANEXO B – IMAGEM HISTOLÓGICA TENDÍNEA COM CARACTERÍSTICA DISPOSIÇÃO PARALELA DAS FIBRAS DE COLÁGENO, INTERCALADAS POR GRUPOS DE TENÓCITOS.

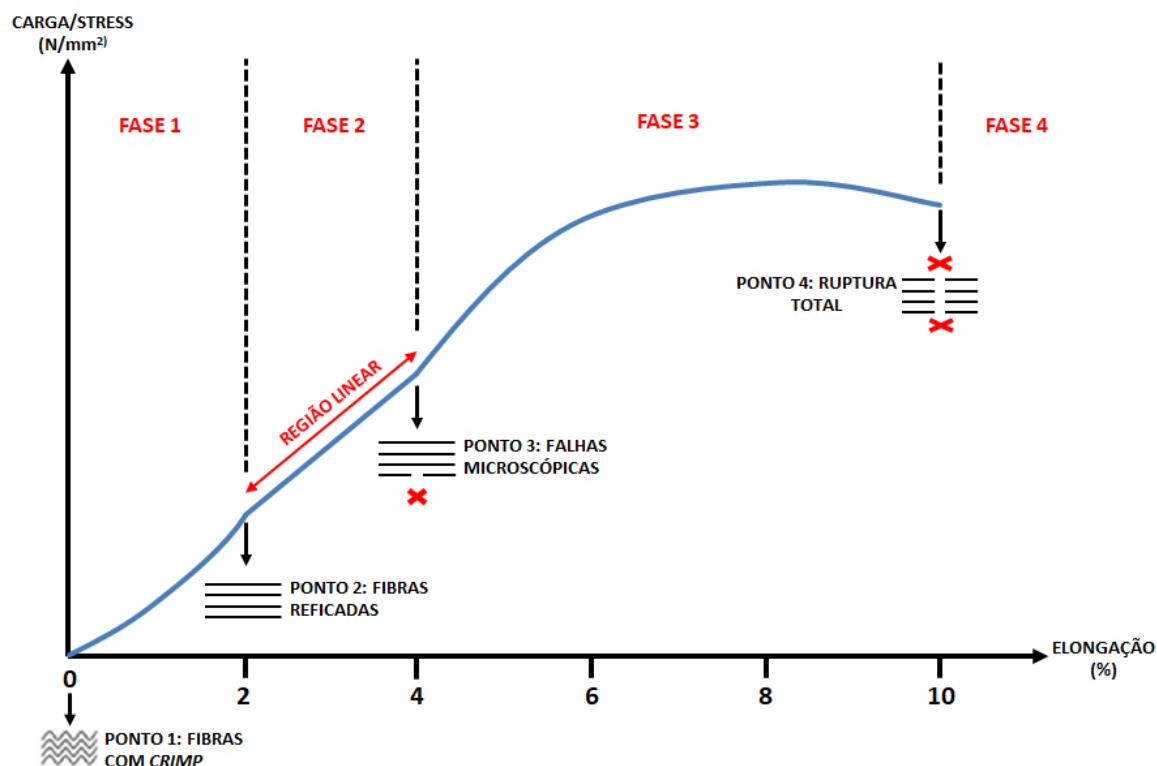
Figura 2 – Imagem histológica tendínea com característica disposição paralela das fibras de colágeno, intercaladas por grupos de tenócitos.



Fonte: Imagem capturada pelo autor (2020).

ANEXO C – GRÁFICO CARGA/ELONGAÇÃO. REPRESENTAÇÃO DOS QUATRO ESTÁGIOS DE ELONGAÇÃO TENDÍNEA PERANTE A APLICAÇÃO CONTINUADA DE CARGAS.

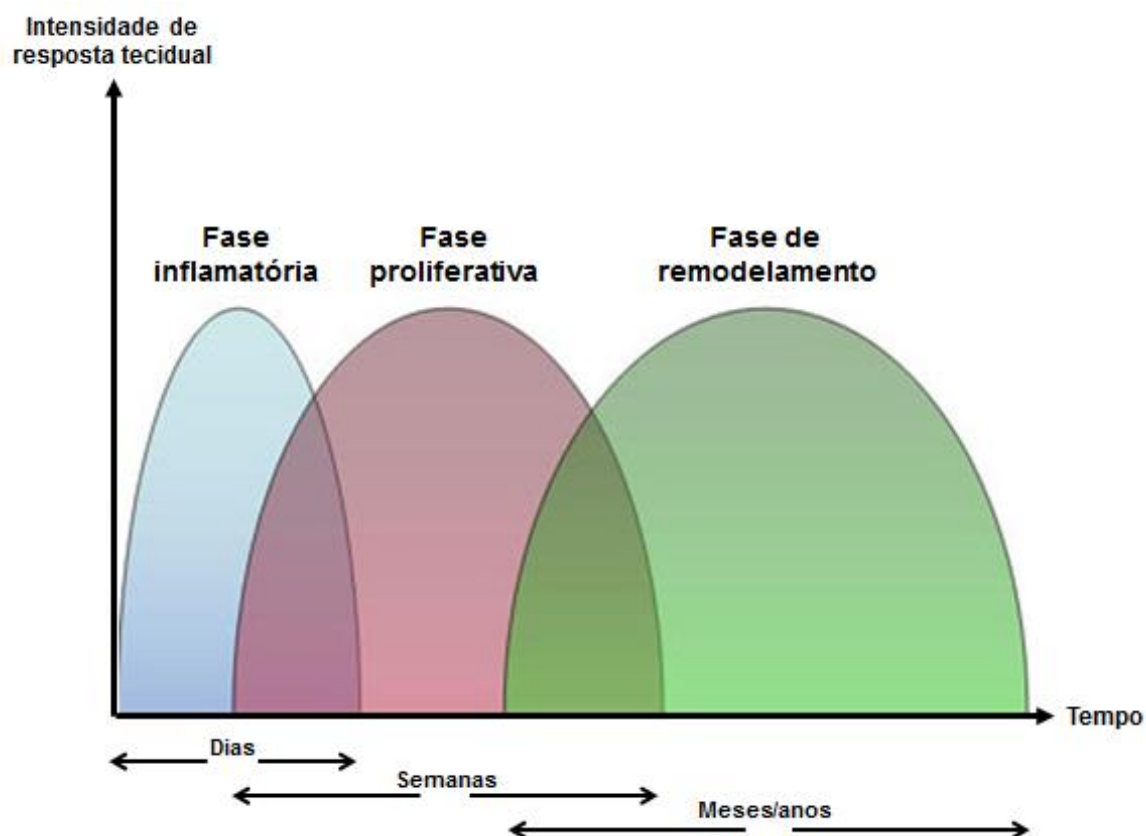
Figura 3 – Gráfico carga/elongação. Representação dos quatro estágios de elongação tendínea perante a aplicação continuada de cargas.



Fonte: Thompson et al. (2017).

ANEXO D – ESQUEMA REPRESENTANDO AS TRÊS FASES DO REPARO TENDÍNEO, SOBREPOSTAS E COM SEUS RESPECTIVOS PERCENTUAIS APROXIMADOS DE TEMPO EM RELAÇÃO AO PROCESSO POR COMPLETO.

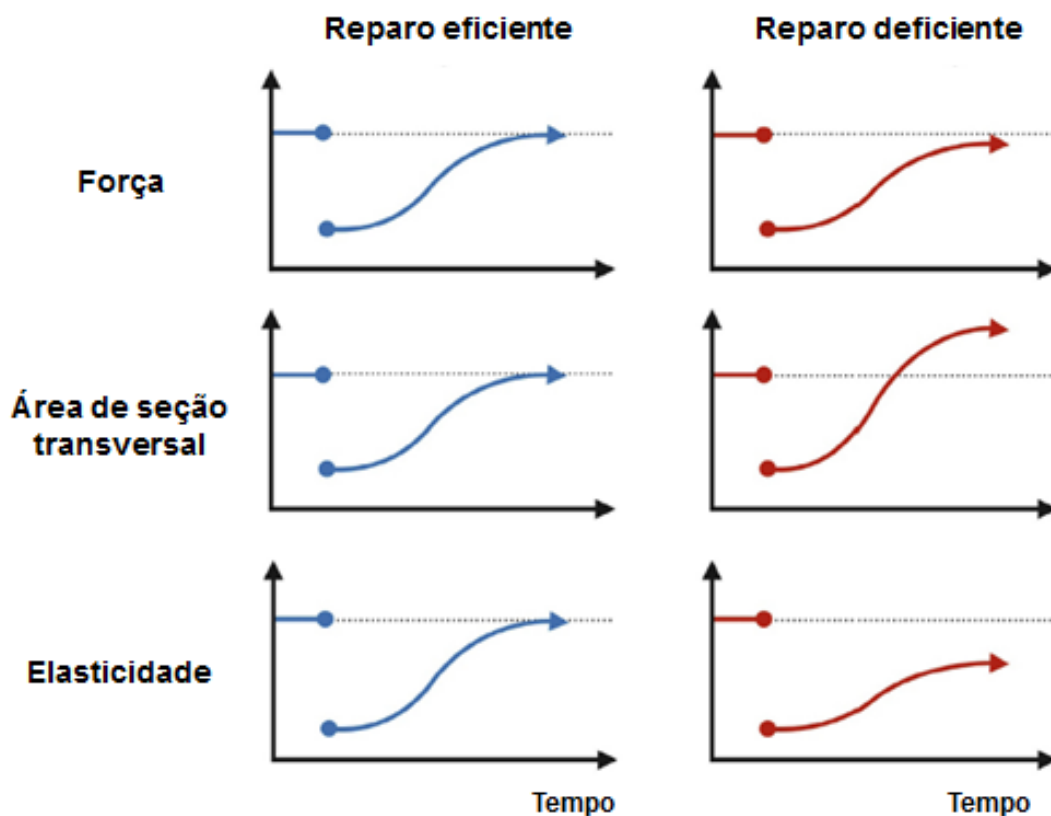
Figura 4 – Esquema representando as três fases do reparo tendíneo, sobrepostas e com seus respectivos percentuais aproximados de tempo em relação ao processo por completo.



Fonte: Lipman et al. (2018).

ANEXO E – GRÁFICOS COMPARANDO O REPARO TENDÍNEO EFICIENTE COM O DEFICIENTE, DESCREVENDO A FORÇA, ÁREA DE SEÇÃO TRANSVERSAL E ELASTICIDADE DO TENDÃO.

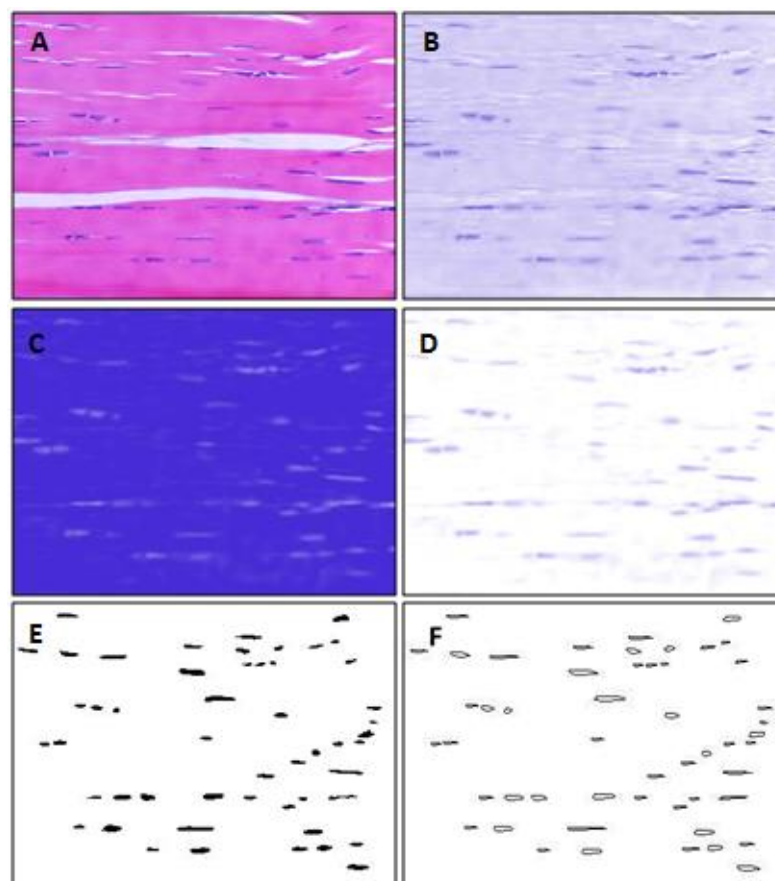
Figura 5 – Gráficos comparando o reparo tendíneo eficiente com o deficiente, descrevendo a força, área de seção transversal e elasticidade do tendão.



Fonte: Snedeker; Foolen (2017).

ANEXO F – ETAPAS DA ROTINA COMPUTACIONAL PARA ANÁLISE DE TECIDO TENDÍNEO CONTROLE. (A) IMAGEM ORIGINAL DE TENDÃO CONTROLE CORADO EM H&E. (B) UTILIZAÇÃO DO PLUGIN COLOUR DECONVOLUTION. (C) RESULTADO DE SUBTRAÇÃO DA IMAGEM B POR SUA CÓPIA SUBMETIDA AO FILTRO GAUSSIAN BLUR, COM USO DA FERRAMENTA IMAGE CALCULATOR. (D) INVERSÃO DA IMAGEM (FUNÇÃO INVERT). (E) ISOLAMENTO DOS PERFIS NUCLEARES DOS TENÓCITOS COM USO DA FERRAMENTA FIND MAXIMA (F) RESULTADOS DO PROCESSAMENTO NA FORMA DE ELIPSES CORRESPONDENTES AOS PERFIS NUCLEARES DOS TENÓCITOS.

Figura 6 – Etapas da rotina computacional para análise de tecido tendíneo controle. (A) Imagem original de tendão controle corado em H&E. (B) Utilização do plugin Colour Deconvolution. (C) Resultado de subtração da imagem B por sua cópia submetida ao filtro Gaussian Blur, com uso da ferramenta Image Calculator. (D) Inversão da imagem (função Invert). (E) Isolamento dos perfis nucleares dos tenócitos com uso da ferramenta Find Maxima (F) Resultados do processamento na forma de elipses correspondentes aos perfis nucleares dos tenócitos.



Fonte: Imagens capturadas pelo autor (2020).

ANEXO G – EFICIÊNCIA DO MÉTODO DE ANÁLISE.

Tabela 1 – Eficiência do método de análise.

Tendões	Eficiência
Imagem TCo 1	87,27%
Imagem TCo 2	90,47%
Imagem TCo 3	95,06%
Imagem TCo 4	96,96%
Imagem TLe 1	93,38%
Imagem TLe 2	89,60%
Imagem TLe 3	91,30%
Imagem TLe 4	89,76%

TCo, tendão controle; TLe, tendão lesionado.

Fonte: Dados obtidos pelo autor (2020).

**ANEXO H – COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS DE IMAGENS TENDÃO
CONTROLE E DE TENDÃO LESIONADO.**

Tabela 2 – Comparação entre grupos de imagens tendão controle e de tendão lesionado.

Variáveis	GCo	GLe
DPC	6,19 ± 0,96	10,46 ± 1,71*
Celularidade	61,50 ± 12,23	111,00 ± 4,08*
RA	4,01 ± 0,43	3,33 ± 0,35*

GCo, grupo controle; GLe, grupo lesionado; DPC, desvio-padrão circular; RA, razão de aspecto; *P<0,05 vs. GCo.

Fonte: Dados obtidos pelo autor (2020).