



**UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE  
FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA**

---

**SCUOLA DI DOTTORATO IN  
MEDICINA CLINICA E MOLECOLARE  
Coordinatore Prof. Roberto Di Primio**

**LA PATOLOGIA TENDINEA:  
FISIOPATOLOGIA, NUOVE STRATEGIE DIAGNOSTICHE E  
TERAPEUTICHE**

*Tesi di Dottorato*  
**Dott. Alberto Busilacchi**

**RELATORE:**  
**Chiar.mo**  
**Prof. Roberto Di Primio**

**TUTOR**  
**Chiar.mo**  
**Prof. Antonio Gigante**

---

## PRESENTAZIONE

La patologia tendinea rappresenta l'oggetto di studio ed il tema di ricerca sin dagli anni della personale formazione specialistica, ed attraverso questo Dottorato sono stati ancor più approfonditi e traslati nella pratica gli aspetti riguardanti diagnosi e la terapia per arrivare attraverso soluzioni sempre più "biologiche" e meno "artificiali" alla rigenerazione o se non altro alla gestione del problema tendineo.

Scopo della seguente Tesi è dunque di ricapitolare, attraverso una discussione ad ampio spettro, il personale percorso di studio che ha toccato vari aspetti della ricerca sperimentale di scienze base e clinica, confermato da studi, review e da capitoli in lingua italiana ed inglese di pubblicati sul tema durante tutto il triennio di Studio.

La Tesi introdurrà dapprima gli aspetti più didattici della fisiopatologia del tendine e della tenogenesi riparativa per poi dettagliare sugli effetti dei *principi nutraceutici* nella prevenzione della tendinopatia, la funzione dei *fattori di crescita piastrinici*, la valutazione preclinica dei *bioscaffold* per la sostituzione dei tessuti tendinei e le considerazioni sulla nuova tecnica di *Real Time Elastosonography*, che sta sempre più trovando impiego nella valutazione diagnosi precoce di patologia tendinea o per il monitoraggio dell'evoluzione post trattamento.

*Alberto Busilacchi*



# INDICE

	Pagina
<b>PRESENTAZIONE</b> .....	2
<b>Capitolo 1 - FISIOPATOLOGIA DEL TENDINE.</b>	
• 1.1- Patologia acuta e cronica del tendine.....	5
• 1.2 - Epidemiologia dei traumi tendinei in ambito lavorativo .....	7
• 1.3 - Epidemiologia dei traumi tendinei in ambito sportivo.....	7
• 1.4 - Eziopatogenesi e fisiopatologia delle lesioni tendinee .....	8
• 1.5 - La curva Carico-Deformazione e sue alterazioni.....	9
• 1.6 - Stiramenti e rotture.....	14
• 1.7 - Tendinopatia degenerativa .....	15
• 1.8 - Anatomia Patologica .....	16
<b>Capitolo 2 - TENOGENESI RIPARATIVA.</b>	
• 2.1 Scopo della tenogenesi riparativa.....	17
• 2.2 Fattori implicati nella restitutio ad integrum.. .....	17
• 2.3 Fasi della riparazione tendinea.....	18
• 2.4 Limiti della tenogenesi riparativa.....	24

### **Capitolo 3 - PREVENZIONE DELLE TENDINOPATIE: I NUTRACEUTICI**

• 3.1 Definizione principi generali.....	24
• 3.2. Glucosamina e Condroitin Solfato.....	27
• 3.3 Vitamina c.....	29
• 3.4 Collagene idrolizzato Tipo 1.....	31
• 3.5 L-arginina alfa keto glutarato.....	32
• 3.6 Curcumina.....	34
• 3.7 Acido boswellico.....	35
• 3.8 Metilsulfonilmetano MSM.....	36
• 3.9 Bromelina.....	37
• 3.10 Stato dell'arte su nutraceutici e teno-protezione.....	38
• 3.11 Conclusioni e considerazioni personali.....	40

### **Capitolo 4 - FATTORI DI CRESCITA E RIPARAZIONE TENDINEA.**

• 4.1 - Introduzione.....	42
• 4.2 Transforming growth factor beta.....	42
• 4.3 Basic fibroblast growth factor (b-FGF).....	43
• 4.4 - Interleuchina 6 e 1 (IL-6 - IL-1).....	43
• 4.5 - Platelet derived Growth Factor (PDGF).....	44
• 4.6 - Bone Morphigenetic Protein (BMPs).....	44
• 4.7 - Insulin like growth factor I (IGF-1).....	45
• 4.8 Epidermal growth factor (EGF).....	47
• 4.9 Cartilage Derived Morphogenetic Prtotein.....	47

### **Capitolo 5 - PLATELET RICH PLASMA E PLATELET RICH-FIBRIN MATRIX**

• 5.1 - Principi generali.....	48
• 5.2 - Composizione e biochimica.....	49
• 5.3 - Preparazione, infiltrazione e post-infiltrazione.....	52
• 5.4 - Indicazioni e controindicazioni cliniche all'uso del PRP.....	58
• 5.5 - Il Platelet Rich Fibrin Matrix.....	58
• 5.6 - Utilizzo del PRP nella patologia endinea.....	60

**STUDIO SPERIMENTALE.**

- 5.7 - Obiettivo e disegno dello studio.....66
- 5.8- Materiali e Metodi.....67
- 5.9 Risultati.....75
- 5.10- Discussione.....87

**Capitolo 6 - ELASTOSONOGRAFIA**

- 6.1 - La palpazione come base dell'elastsonografia.....90
- 6.2 - Principi generali.....91
- 6.3 - RTSE nella patologia tendinea: review sistematica.....96

**STUDIO SPERIMENTALE.**

- 6.4.1 - Obiettivo e disegno dello studio.....113
- 6.4.2- Materiali e Metodi.....114
- 6.4.3 - Risultati.....124
- 6.4.4 - Discussione.....127
- 6.4.5 - Limiti dello studio .....132
- 6.4.6 - Rilevanza clinica e prospettive future.....133

**BIBLIOGRAFIA.....134**

# CAPITOLO 1

## FISIOPATOLOGIA TENDINEA

### 1.1– Patologia acuta e cronica del tendine.

**L**e patologie del tendine sono ad oggi un problema di interesse crescente, in corrispondenza dell'aumento della speranza di vita, della complessità dei gesti lavorativi e della popolazione sportivamente attiva. Annualmente, dei 33 milioni di infortuni muscolo-scheletrici registrati negli Stati Uniti<sup>1</sup>, le lesioni dei tessuti molli costituiscono almeno il 45% del totale e tra queste ben più di 30.000 riguardano patologie a carico dei tendini meritevoli di trattamento chirurgico.

Considerando quindi questi sostanziosi numeri, al fine di fornire le migliori cure e soprattutto per prevenire l'insorgere del quadro patologico, sta divenendo sempre più centrale il ruolo della ricerca in scienze base per spiegare la patogenesi e la patomeccanica dei disturbi tendinei, e perché dallo studio della fisiopatologia possono oggi essere proposti nuovi approcci di trattamento che vadano ad interferire con le cause determinanti il danno.

La biologia dei tendini è stata ampiamente studiata negli scorsi decenni<sup>2</sup>, tuttavia ancora si rileva una carenza di dati biomeccanici in vivo, in quanto la maggior parte conoscenze biologiche e biomeccaniche sui tendini derivano da studi in vitro e ricerca traslazionale o ancora da studi cadaverici laddove ovviamente le proprietà biomeccaniche sono differenti dal vivente<sup>3-5</sup>. Le lesioni del tendine possono classificarsi come *acute o croniche* in base alla loro modalità di insorgenza e di presentazione. Le caratteristiche delle lesioni differiscono dal punto di vista clinico ma anche e soprattutto dal

punto di vista anatomo-patologico. Effettuare le opportune distinzioni è vuol dire effettuare poi le corrette scelte terapeutiche. Tra le forme *acute* annoveriamo le tendiniti e le *rottture* che possono essere spontanee atraumatiche oppure lesioni occorse in seguito a trauma. L'altra famiglia di problematiche tendinee riguarda invece forme *croniche* che possono essere secondaria ad un over use piuttosto che secondari a processo infiammatori cronici, uso di farmaci O micro traumatismi ripetuti.

Dalla lettura dei dati epidemiologici le lesioni tendinee da uso eccessivo si verificano in conseguenza di stimoli ripetitivi seguiti da contrazioni dell'unità muscolo tendinea e le situazioni che più di frequente espongono soggetti alle lesioni sono le attività lavorative e gli sport. Quelle cosiddette spontanee si osservano prevalentemente nella traumatologia sportiva anche se non poche sono le difficoltà classificative: non sempre è possibile indagare nel paziente con trauma una pregressa patologia tendinea causa di un processo degenerativo di fondo.

Le tendinopatie croniche *non* legate ad un overuse sportivo o lavorativo rappresentano una problematica di maggior riscontro nella pratica clinica del territorio, presentandosi *in primis* all'attenzione del medico di medicina generale, per il quale queste possono costituire motivo di consulto per il 30% delle patologie dell'apparato locomotore. Infatti le tendinopatie di natura infiammatoria e/o degenerativa non interessano in modo esclusivo gli sportivi ma al contrario riguardano la popolazione generale e i soggetti anziani.

In ciascuna di queste due categorie cliniche due sono i comuni denominatori anatomo-funzionali: la qualità tissutale intendendo le alterazioni anatomo-patologiche e biochimiche e l'*overuse* dall'altro. La partecipazione della popolazione generale ad attività sportive, l'aumento della vita media ed altre variabili come fattori ambientali, dieta, patologie sistemiche e le relative terapie farmacologiche hanno portato ad un aumento dell'incidenza delle tendinopatie.

### **1.2 - Epidemiologia dei traumi tendinei in ambito lavorativo.**

In ambito lavorativo, le lesioni tendinee sono prevalentemente su base degenerativa e si localizzano per lo più agli arti superiori, dove le sedi più colpite sono gli epicondili omerali, avambraccio polso e mano.

I lavoratori manuali, gli artigiani, i macellai, gli imballatori che sono soliti compiere movimenti ripetitivi, sono i più esposti, con un rischio relativo dodici volte maggiore delle altre professioni.

Nel 1981 Kivi<sup>1</sup> ha svolto uno studio retrospettivo sull'incidenza e il rischio relativo delle patologie nell'arto superiore da uso eccessivo associate a lavori ripetitivi in Finlandia.

Su 3090 casi, l'Autore osservò che:

- Il 69% erano donne e 31 % erano uomini;
- L'età media era 41 anni;
- Il coinvolgimento dell'arto superiore era pari al 93%;
- 63% dei casi mostrava problemi al gomito;
- Peritendinite, tenosinovite erano diagnosticati nel 58% dei casi.

### **1.3 - Epidemiologia dei traumi tendinei in ambito sportivo.**

Nella pratica sportiva odierna si presta molta più attenzione alla registrazione dei traumi, poiché vi è un sempre maggior interesse nell'identificare le cause che possano determinare l'incidenza di nuovi casi per identificare strategie mediche e non solo di prevenzione.

Tuttavia, nella maggior parte dei casi registrati, i traumi tendinei sono identificati come acuti: ai fini epidemiologici ciò impedisce di stilare la reale percentuale dei traumi in tendini precedentemente sani e dei traumi consequenziali ad uso eccessivo o a pre-esistenti condizioni croniche.

Attualmente, nei Paesi industrializzati, le lesioni traumatiche che arrivano al pronto soccorso dovute alla pratica sportiva rappresentano il



10% di tutte le lesioni. Le statistiche attuali mostrano un trend in aumento negli anni come conseguenza di una maggiore partecipazione della popolazione generale ad attività sportive di vario livello e di una maggiore assiduità della pratica<sup>6</sup>.

Ad esempio nel *running*, attività sempre più diffusa a livello agonistico ed amatoriale nella popolazione generale, Van Mechelen<sup>7</sup> riporta da 2.5 a 12.1 traumi per 1000 ore di corsa. Il 50-75% dei traumi è dovuto alla ripetizione sequenziale dei movimenti, con interessamento principale di probabilità a carico del sistema estensore del ginocchio e del tendine d'Achille, seguiti dai traumi delle tendiniti tibiali posteriori<sup>1</sup>.

Anche nell'epidemiologia dei traumi sportivi contano l'età ed il sesso oltre ad altri fattori intrinseci di rischio. Essi sono rappresentati in tabella.

#### **1.4 – Eziopatogenesi e fisiopatologia delle lesioni tendinee.**

La patologia del tendine si può generalmente suddividere in *acuta* e *cronica*, causata da fattori intrinseci ed estrinseci che possono agire singolarmente o in combinazione. Generalmente nel trauma acuto prevalgono fattori estrinseci che agiscono alterando la normale biomeccanica delle unità funzionali osteo-tendinea e teno-muscolare, mentre nella lesione cronica l'eziologia è legata al persistere della causa lesiva, che nel tempo porta a modificazioni profonde del contesto strutturale del tendine, fino all'esito finale della rottura.

**Tabella 1.1:** Fattori di rischio intrinseci nel trauma da overuse tendineo

1 - Malallineamenti: <i>Iperpronazione/ipopronazione del piede</i> <i>Piede piatto/cavo</i> <i>Avampiede varo/valgo</i> <i>Retropiede varo/valgo</i> <i>Tibia vara</i> <i>Ginocchio varo/valgo</i> <i>Rotula alta/bassa</i> <i>Anteversione del collo del femore</i>
2 - Discrepanza della lunghezza degli arti inferiori
3 - Debolezza muscolare
4 - Ridotta flessibilità
5 - Lassità articolare
6 - Sesso Femminile
7 - Età giovane /anziana
8 - Sovrappeso - Obesità
9 - Malattie predisponenti del connettivo

### **1.5- La Curva Carico-Deformazione e sue alterazioni.**

Come altri tessuti connettivi, i tendini sono assimilabili ad un materiale anisotropo direzionale: sono cioè caratterizzati da un comportamento meccanico di tipo non lineare<sup>3</sup>. E' bene ricordare che un tessuto è definito elastico se ritorna alla sua forma geometrica originale dopo aver eliminato la tensione; se invece non vi ritorna è detto viscoso. Per quanto riguarda il tendine la curva

carico-deformazione mostra un andamento di tipo *viscoelastico* per la presenza di un area di isteresi, espressione dell'energia interna dissipata nel ciclo di lavoro.

Due aspetti rilevanti delle proprietà del materiale viscoelastico sono:

1. l'incremento nel tempo della deformazione anche in presenza di un carico costante (creep);
2. la diminuzione della tensione interna nel tempo anche in presenza di una deformazione costante (stress relaxation).

Tali aspetti hanno importanti ripercussioni sul piano fisiologico e clinico.

Infatti durante la corsa la quantità e la frequenza delle deformazioni dei tendini del ginocchio si mantengono pressoché costanti ma l'entità delle tensioni interne diminuisce progressivamente per proteggere il tendine dalla rottura da fatica.

Come espressione del fenomeno di creep, è stato dimostrato che la deformazione del legamento collaterale mediale tende ad aumentare durante un ciclo di lavoro a carico costante. Tale fenomeno inoltre spiega l'incremento dell'escursione articolare cioè l'aumento della lassità articolare che si riscontra dopo l'esercizio prolungato di un'articolazione e rende comprensibile l'aumento della rigidità articolare dopo prolungata immobilizzazione.

La teoria viscoelastica quasi-lineare è stata sviluppata per descrivere le proprietà viscoelastiche dei tessuti connettivi ed è stata utilizzata anche per i tendini ed i legamenti. Non bisogna tuttavia trascurare il fatto che, da un punto di vista anatomico, il tendine possiede delle zone di transizione, come la MTJ e la OTJ, che rappresentano punti chiave nelle biomeccanica e nella trasmissione della forza. Infatti si può osservare a livello della MTJ la presenza di ripiegamenti che si distendono sotto stress fino a 10-20 volte la lunghezza originale: tale stiramento dipende dal rapporto forza-superficie<sup>8</sup>.

La determinazione delle caratteristiche meccaniche rende evidente la necessità di valutare con attenzione il metodo di fissazione, la definizione delle caratteristiche geometriche del legamento, la separazione delle proprietà

intrinseche del tessuto dalle proprietà della OTJ e l'influenza della temperatura<sup>9</sup>. I dati più attendibili sono stati ricavati sperimentando su campioni comprendenti il tendine e le due inserzioni. Così facendo è stata ricavata la curvacarico-deformazione di alcuni tendini ed è stata inoltre analizzata l'influenza dell'età sulle proprietà meccaniche del tessuto e gli adattamenti strutturali all'esercizio fisico o all'immobilizzazione. Quando sottoposto ad una forza traente, il tendine subisce un'iniziale allungamento pari al 2% della lunghezza originaria. In seguito, per incrementi anche notevoli della trazione, il tessuto tendineo mostra una notevole rigidità. Per carichi ancora più elevati si ha un maggiore aumento dell'entità della deformazione che conduce infine alla rottura del tendine. Dalla lettura della curva tensione-deformazione del tendine si possono evincere alcune considerazioni: la *prima parte* della curva esprime la perdita della configurazione ad onda delle fibre tendinee (crimp): se infatti viene sottratta la forza deformante, il tendine ritorna alla lunghezza originale ed alla struttura a fasci ondulati. I carichi fisiologici cadono per la maggior parte all'interno di questa prima parte, permettendo il supporto delle strutture dell'organismo senza difficoltà. Nella *seconda parte* della curva, per incrementi anche notevoli delle sollecitazioni tensorie, il tendine subisce solo modeste deformazioni. In tale fase la deformazione si verifica sostanzialmente a carico delle fibre collagene, probabilmente per l'interruzione dei legami ad idrogeno, delle forze di Van der Waals e di tutti gli altri legami chimici non covalenti. I legami covalenti intra- ed intermolecolari invece sono ancora capaci di resistere. La deformazione è irreversibile quando si supera il 4% della lunghezza originale campione<sup>10</sup>. Per sollecitazioni meccaniche cicliche, quando il primo stiramento supera il valore critico del 4% di deformazione, la curva si sposta a destra: nei successivi stiramenti sono richiesti carichi sempre *minori* per ottenere deformazioni anche più elevate. Infine nella *terza parte* della curva si assiste al cedimento finale del tessuto che termina con la rottura del tendine, cioè la *quarta parte* (Figura 1).

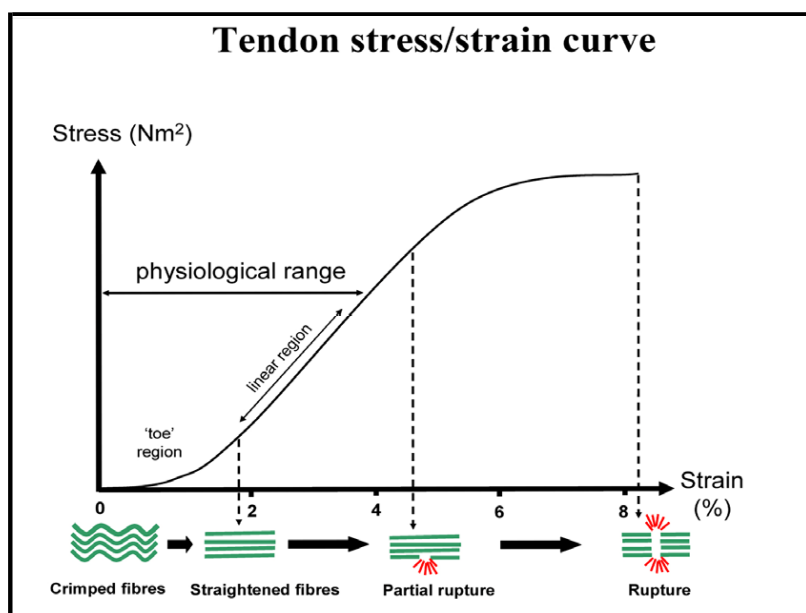


Figura 1: Curva tensione-deformazione del tendine.

Le condizioni intrinseche ed estrinseche capaci di modificare le caratteristiche biomeccaniche del tendine sono numerose. Ad esempio è stata dimostrata una correlazione importante tra l'avanzare dell'età e l'aumento del diametro delle fibre collagene, del carico di rottura e della resistenza alla trazione<sup>11</sup>. Nell'anziano inoltre la rottura del tendine non ha più luogo nel contesto del corpo ma per avulsione in prossimità della OTJ.

Come per la legge di Wolff per l'osso, anche per il tendine è possibile identificare una regola generale che descriva il processo di adattamento agli stimoli meccanici. La sottrazione del carico o del movimento in corso di rigidità articolare altera la struttura macro e microscopica dei tendini e dei legamenti: le fibre collagene sono infatti in numero inferiore, presentano un ridotto diametro, il loro orientamento spaziale è alterato e la matrice amorfa interfascicolare

aumenta in percentuale mentre si riduce il contingente di fibre elastiche mature e di PGs.

Tali alterazioni morfologiche modificano le proprietà meccaniche del complesso osso-tendine-muscolo, tanto che il carico di rottura si riduce al 31% e l'energia massima di deformazione al 18%<sup>9</sup>.

Anche le proprietà intrinseche del tendine si modificano in maniera inversamente proporzionale a quelle del complesso articolare: paradossalmente, all'aumentare della rigidità articolare, si riduce la rigidità del tendine.

E' stato dimostrato che tali alterazioni si correlano significativamente con la diminuzione del contingente di PGs nel tessuto<sup>12</sup>. Tuttavia rimane ancora poco definito l'effetto indotto dall'incremento della sollecitazione meccanica sulle strutture teno-ligamentose. Sul piano morfologico è stato descritto un aumento dell'area della sezione trasversa e del peso secco del tendine nonché l'ipertrofia dei fasci di fibre collagene dopo allenamento prolungato<sup>13,14</sup>. Parallelamente sul piano biomeccanico è stato documentato l'aumento di resistenza meccanica del complesso osso-tendine-muscolo<sup>15-18</sup>.

La risposta delle strutture teno-ligamentose all'incremento dell'esercizio fisico sembra essere molto specifica. Mentre infatti le proprietà meccaniche dei tendini flessori si modificano in modo non significativo, la resistenza dei tendini estensori aumenta notevolmente<sup>19</sup>.

L'azione dei fattori biomeccanici è inoltre essenziale per l'orientamento spaziale e per la maturazione delle fibre collagene e delle fibre elastiche nei processi di riparazione<sup>20</sup>.

Infine è importante notare che, a seconda dell'età, le proprietà meccaniche del tendine variano, adattandosi al peso corporeo, alla maturità scheletrica ed al tipo di attività svolta.

## 1.6 - Stiramenti e Rotture.

Alla base dei traumi acuti dei tendini sono presenti molti meccanismi ed i fattori da considerare sono numerosi: è necessario esaminare il tendine nel sito di inserzione

La giunzione miotendinea ricopre in ruolo importante in questo evento e nell'unità muscolo-tendinea il tessuto muscolare è spesso sito di danno. La posizione dell'articolazione inoltre può predisporre alla rottura delle fibre muscolari più stressate poiché il carico le interessa singolarmente. L'eventualità del danno è inoltre influenzata dalla microstruttura del tendine, dalla larghezza delle fibre e soprattutto dal loro orientamento. Altri fattori, quali l'età, il sesso, l'attività fisica, l'immobilità e le precedenti malattie, possono poi provocare la degenerazione delle fibre, condizionando la curva forza-allungamento. Nelle rotture totali la sede di lesione è in genere a nel terzo distale alla giunzione osteotendinea (OTJ), che appare come meno vascolarizzata e più sottile. Le rotture iuxtainsertionali e quelle prossimali alla giunzione miotendinea (MTJ) rappresentano un'altra categoria di rotture in acuto piuttosto frequenti, mentre le disinserzioni a livello del *tidemark osteo-tendineo* sono ritenute del tutto eccezionali. Nelle rotture spontanee recenti, la diastasi tra i due monconi tendinei è misurabile ed è mediamente tra i 2 e i 4 cm a seconda del tendine. Alcuni importanti studi in passato hanno dimostrato come il più frequente punto di rottura in un'unità precedentemente integra sia rappresentato dalla giunzione miotendinea. Ulteriori studi di Garret hanno confermato tale dato, constatando come strutture passive, tra le quali il connettivo, non siano sufficienti a proteggere il tendine dalla rottura. Per tale motivo la debolezza muscolare e l'affaticamento sono fattori predisponenti alle rotture tendinee, in quanto responsabili della riduzione della capacità contrattile del muscolo.

Più recentemente è stato dimostrato come anche uno stiramento ciclico di routine può diminuire l'eventualità di danno; inoltre l'aumento di appena 1° C di temperatura nel muscolo sollecitato è sufficiente a generare forze e resistenze maggiori alla rottura <sup>21</sup>.

Un meccanismo di accelerazione decelerazione è, ad esempio alla base del 90% delle lesioni di tendine d'Achille riportate in letteratura<sup>22</sup>. Anche un malfunzionamento del complesso muscolo-tendineo può essere un determinante di lesione. Un aspetto molto comune quanto sottostimato nella rottura è infatti la tendinopatia degenerativa sottostante, che rimane ignota fino all'estrinsecarsi del fenomeno acuto. Kannus e Jozsa hanno riscontrato infatti aspetti degenerativi in 865 (97%) su 891 tendini affetti da rottura spontanea nonché hanno verificato presenza di segni di degenerazione in 149 (33%) su 445 controlli definiti come sani<sup>23</sup>.

### **1.7 - Tendinopatia degenerativa.**

Le lesioni *degenerative* hanno un'origine multifattoriale, evidenziando che nella patologia cronica del tendine vi è una molteplice interazione tra fattori intrinseci ed estrinseci. Tra i fattori intrinseci il malallineamento articolare o difetti biomeccanici hanno un ruolo decisivo in 2/3 delle rotture del tendine d'Achille negli atleti<sup>24</sup> in quanto variazioni dell'asse biomeccanico creano delle leve svantaggiose in cui i tendini diventano alla lunga un *locus minoris resistentiae* dove si va alla fine estrinsecare il danno. E' ormai chiaro che un sovraccarico in presenza di fattori di rischio intrinseci può essere un aggravante per l'insorgenza di una tendinopatia. Il tendine risponde al carico oltre la soglia fisiologica in due modi: l'infiammazione delle guaine e la degenerazione del corpo, sia separatamente che insieme. Il danno tendineo può anche verificarsi in situazioni di stress ripetuti pur *al di sotto* della soglia fisiologica. Essi procurano dei micro-traumatismi che impediscono inficiano il fisiologico processo di riparazione, in quanto di volta in volta alimentano una risposta infiammatoria locale<sup>25</sup>. Microtraumi da stress non uniformi possono produrre delle lesioni in punti in cui la concentrazione di forze è maggiore o dove si hanno più forze frizionali, con conseguente tendinopatia in fibre ben localizzate. L'eziologia della tendinopatia è ancora poco chiara: ipossia, danno ischemico, stress



meccanico, ipertermia, mediatori dell'inflammatione, uso di fluorochinoloni, sproporzionata attività delle metallo-proteasi; tutto questo concorre a sviluppare la lesione degenerativa<sup>26</sup>.

### **1.8 - Anatomia Patologica della patologia tendinea**

Macroscopicamente, la porzione di tendine affetta da patologia perde la normale lucentezza ed il colore bianco avorio diventa progressivamente grigio-marrone. Si rileva inoltre un ispessimento del tendine, in forma diffusa, nodulare o fusiforme<sup>27</sup>. Istologicamente, il tendine affetto da tendinopatia degenerativa mostra un quadro con un tentativo di riparazione casuale, disomogenea, con degenerazione del collagene intratendineo, disorientamento delle fibre, ipercellularità, proliferazione vascolare sparsa e non orientata, e con una maggiore quantità di glicosaminoglicani interfibrillari<sup>28</sup>. Il numero di tenociti risulta diminuito nelle aree interessate da patologia, con modificazioni della forma e perdita del tipico orientamento in filiere. Vari sono i quadri istopatologici che indicano la natura degenerativa del processo: degenerazione ialina, degenerazione mucoide, degenerazione grassa calcificazione, aree di metaplasia cartilaginea ed ossea. La distribuzione della rete vascolare nel quadro patologico si presenta irregolare con gruppi di vasi distribuiti in maniera caotica. Laddove si dimostrino le alterazioni qualitative e quantitative della matrice, sarà possibile confermare anche la grave compromissione delle caratteristiche biomeccaniche tendinee.

Dunque, grazie allo studio anatomico patologico del tendine degenerato si può arrivare a comprendere come spesso l'evento finale della rottura di tendine sottocutanea sia di fatto anticipato da tali sovvertimenti isto- strutturali.

Nella tendinopatia degenerativa sono infrequenti gli aspetti infiammatori franchi o il tessuto di granulazione, reperti anatomico patologici piuttosto caratteristici della rottura acuta o di importanti lesioni recenti.

## CAPITOLO 2

### TENOGENESI RIPARATIVA

#### 2.1 – Scopo della tenogenesi riparativa.

Lo scopo della tenogenesi riparativa è la restituzione al tendine della robustezza e resistenza originarie. Tuttavia, la fisiologica *restitutio ad integrum* è impossibile in caso di rottura completa o di ampie lacerazioni; di fronte a queste evenienze la soluzione è ancora chirurgica. Purtroppo però l'uso di ancore o di fili di sutura per ripristinare la continuità del non restituisce la completa funzione a causa delle aderenze fibrose o in seguito alla recidiva di rottura da improprio carico o da riparazione imperfetta tra tendine e tendine o tendine ed osso. Va premesso che gli studi sulla riparazione dei tendini sono stati eseguiti solo su preparati animali o su tendini umani danneggiati, pertanto la rilevanza delle conclusioni viene da molti ancora messa in discussione. In letteratura si riportano numerosi studi riguardanti gli aspetti morfologici, biochimici e biomeccanici del processo di riparazione delle lesioni tendinee<sup>29</sup>.

#### 2.2 – Fattori implicati nella *restitutio ad integrum*.

Diversi fattori possono influenzare positivamente o negativamente la riparazione incidendo sui fenomeni catabolici e anabolici delle varie fasi del processo. Gli agenti che condizionano la riparazione tendinea nella matrice sono le macromolecole fibrillari quali: *collagene VI*, *fibronectina*, *trombospondina*, *laminina*, *tenascina ed elastina*<sup>30</sup>.

La quantità del *collagene VI* è trascurabile nel tessuto tendineo normale, ma aumenta notevolmente durante il processo riparativo<sup>20</sup> mentre la *fibronectina* e la *trombospondina* svolgono un ruolo importante nella prima organizzazione della matrice extracellulare; la *laminina* svolgerebbe un'azione chemiotattica

sui neutrofili e sulle mast-cellule ed un'azione neoangiogenetica. La *tenascina* nella riparazione controbilancia invece gli effetti della fibronectina mentre l'*elastina* stimola sia in vivo che in vitro la proliferazione fibroblastica e la neoangiogenesi. Nella riparazione come nella formazione della matrice intervengono vari meccanismi anabolici con la mediazione di collagene, laminina, acido ialuronico e fibronectina, i quali, a mezzo delle integrine, stabiliscono una comunicazione tra matrice e cellule. Essi risultano determinanti per la riuscita del processo riparativo. Oltre il meccanismo anabolico, sono importanti anche i meccanismi catabolici, in cui l'attivazione di sistemi enzimatici produce un rimaneggiamento della matrice mediati dalle metallo proteasi (MMP). Ruolo importante è attribuito al CGRP (Calcitonin gene-related protein) e dalla sostanza P. Questi neuropeptidi determinano fenomeni di vasodilatazione, essudazione, chemiotassi sui neutrofili neoangiogenesi e mitosi. I fattori di crescita (PGDF, TGF $\beta$ , EGF, IGF I e II) agiscono su particolari cellule mediante recettori di superficie (integrine); esercitano inoltre un'azione aspecifica, agendo sulla proliferazione cellulare, sulla sintesi proteica e sulla differenziazione cellulare. Non bisogna infine trascurare l'azione dei fattori biomeccanici, i quali agiscono principalmente sulla distribuzione, nell'orientamento tridimensionale delle fibre collagene e delle fibre elastiche<sup>20</sup>. Il tendine rigenerato, infatti, è in grado di giungere ad adeguata maturazione solo se sottoposto a sollecitazioni meccaniche idonee per intensità e durata. Non tutto il processo di riparazione tendinea è completamente chiarito come ad esempio la fibrillogenesi del collagene e delle fibre elastiche, processo che porta alla ricostituzione del tessuto tendineo. Sono tuttora controverse le interazioni esistenti tra processo biologico di riparazione da una parte e tipo di sutura e stimoli meccanici dall'altra.

### **2.3 – Fasi della riparazione tendinea.**

Lo studio sperimentale su materiale autoptico e su animali di de Palma, Gigante et al<sup>31</sup>, ha riportato gli aspetti biologici (istologico ed ultrastrutturale) e

meccanici, caratterizzanti il processo di riparazione delle lesioni tendinee. La riparazione del tendine si compie in 3 fasi:

1. fase infiammatoria;
2. fase proliferativa;
3. fase di rimodellamento (figura 5.1).

La prima è la *fase infiammatoria*, in cui gli eritrociti e soprattutto i neutrofilii, penetrano nel sito di lesione formando un ematoma. Entro le prime 24 ore i monociti e macrofagi colonizzano la lesione e li compiono la loro attività di fagocitosi della superficie necrotica. Il release di fattori vasoattivi, citochine e fattori chemiotattici determina una maggiore vaso-permeabilità con successiva neoangiogenesi. Questo background stimola la proliferazione di tenociti e il reclutamento di ulteriori cellule infiammatorie. Nuovi tenociti accorrono nel sito di lesione, mentre è già iniziata la sintesi di nuovo collagene di tipo III<sup>32</sup>. Lo spazio fra i monconi tendinei è colmato da un tessuto lasso, costituito da matrice amorfa, eritrociti, leucociti, macrofagi e fibroblasti. L'analisi ultrastrutturale dimostra la presenza di RER ed apparato del Golgi ben sviluppato. Si riscontrano altresì fenomeni di iperemia e neoangiogenesi ed una iniziale fibrillogenesi collagenica con fibrille di 200-400Å; è presente anche un iniziale sviluppo di fibrille elastiche, rappresentate da filamenti di 10-12 nm. di diametro senza deposizione di elastina. Dopo alcuni giorni si entra nella seconda fase, o *fase proliferativa o ipercellulare*. La sintesi di collagene III arriva al suo massimo in questo periodo, per ultimarsi entro qualche settimana. Durante questa fase si rileva un'alta concentrazione di acqua e di glicosaminoglicani. I fibroblasti si orientano lungo il maggior asse del tendine. Le fibre collagene neosintetizzate sono disposte in fasci irregolari e presentano un aumento del diametro rispetto alla fase precedente (400-600 Å). Le fibrille elastiche immature in questa fase raggiungono la massima concentrazione tissutale sia in rapporto al tessuto normale sia in relazione alle altre fasi del processo riparativo; istometricamente esse sono valutate intorno al 30% della superficie del tessuto di riparazione. Si osservano inoltre ampie interdigitazioni

tra network collagenico ed elastico. Alla fine di questa fase, il tessuto appare più compatto; i tenociti e le fibre collagene sono disposti secondo l'asse longitudinale del tendine; uguale orientamento, sebbene immature, viene osservato anche per le fibre elastiche. Dopo 6 settimane circa si assiste alla terza fase o *fase di rimodellamento* che si caratterizza col decremento della componente cellulare come pure della componente di collagene e dei glicosaminoglicani. Il rimodellamento si sviluppa in due fasi: la consolidazione e la maturazione<sup>33</sup>.

La consolidazione si completa in 6-10 settimane. In questo periodo si riduce la cellularità ed aumenta la componente fibrosa, ovvero la quota di collagene I<sup>34</sup>. I tenociti in questa fase hanno un alto metabolismo e tendono a disporsi allineati all'asse longitudinale del tendine, parallelamente alla direzione dello stress. Si osservano inoltre le caratteristiche ondulazioni (*crimp*) del tessuto tendineo che non presentano la periodicità e l'ampiezza del tendine adulto normale. Le fibre collagene raggiungono il diametro di 800-1000 Å. Nelle fibre elastiche si osserva una più abbondante deposizione di elastina ed una ridotta quantità di fibrille oxytalan. Alla fine di questa fase (6-8 settimane dopo la tenotomia sperimentale) il tendine presenta caratteristiche simili alla normalità, ma è ancora evidente una relativa immaturità delle fibre collagene e soprattutto del sistema delle fibre elastiche. Dopo 10 settimane si ha la maturazione del tessuto fibroso che assume una struttura simil-tendinea, dunque non ancora identica al tendine definitivo (*scar like tendon tissue*). Analizzando i rapporti tra collagene e tipo di fibra elastica nelle varie fasi della fibrillogenesi riparativa<sup>35</sup>, si sono documentate significative variazioni nel tipo di fibra e nel diametro delle fibrille. In particolare si notavano un numero di fibrille oxytalan e di elastina molto elevato nelle prime fasi del processo di riparazione. Tali fibrille hanno mostrato un ampio contatto con la membrana plasmatica cellulare ed una diffusa interdigitazione con il network di collagene. Nelle fasi successive viene sintetizzata una quota di elastina molto più abbondante rispetto al tessuto tendineo sano, tanto da determinare una rapida, benché parziale, maturazione

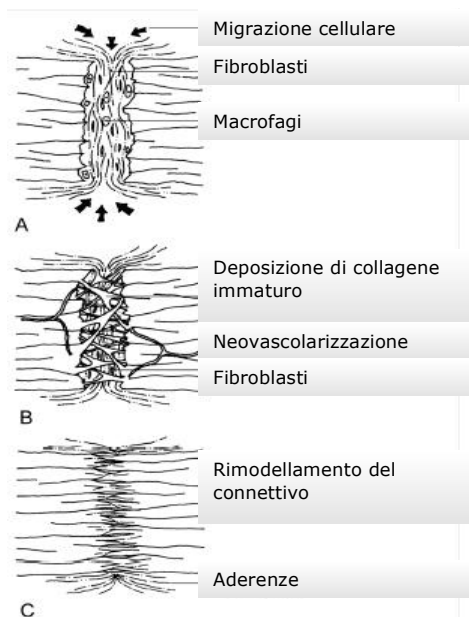
delle fibre elastiche. Tuttavia, anche negli stadi avanzati dell'evento riparativo, il tessuto di presenta caratteristiche istologiche e biomeccaniche qualitativamente e quantitativamente diverse da quelle del tendine adulto, soprattutto per ciò che concerne le fibre collagene ed elastiche. Le fibre collagene, infatti, conservano un diametro simile a quello degli stadi iniziali del processo riparativo. Le fibre elastiche restano immature o maturano solo parzialmente. Per ciò che attiene agli effetti dell'immobilizzazione prolungata sulla di riparazione tendinea, sperimentalmente sono state osservate differenze nell'evoluzione del processo riparativo tra lesioni immobilizzate e lesioni mobilizzate precocemente. In queste ultime, la fibrillogenesi appare notevolmente accelerata, con fibre collagene ed elastiche maggiormente organizzate e dal diametro maggiore. Aree in degenerazione e calcificazioni sono repertate solo nei casi prolungatamente immobilizzati Tali osservazioni sperimentali portano a dedurre che gli stimoli meccanici, ed in particolare una precoce mobilizzazione, rivestono una funzione decisiva nel regolare positivamente il processo di riparazione del tendine leso.

Viene così confermato da un punto di vista biologico quanto rilevato da altri Autori con analisi biomeccanica sul tessuto di riparazione. Tali Autori hanno rilevato che la mobilizzazione precoce offre dei vantaggi funzionali rispetto alla immobilizzazione prolungata<sup>36,37</sup>. Si può dire che un livello di maturità pari a quello del tendine sano può essere raggiunto entro circa un anno dall'infortunio. Durante questo lungo periodo osserviamo essenzialmente una riduzione del metabolismo dei tenociti, una riduzione della vascolarizzazione e una costante riorganizzazione della matrice connettivale. Un'altra classificazione generale delle riparazioni tendinee parla di riparazione *estrinseca* e riparazione *intrinseca* (figura 2.2).

La riparazione estrinseca prevede l'invasione delle cellule dalla guaina sinoviale circostante, mentre quella intrinseca prevede la proliferazione dei tenoblasti a partire dall'epitenon e endotenon. Le due direzioni di riparazione in realtà non si sostituiscono l'una all'altra, ma piuttosto si complementano nella

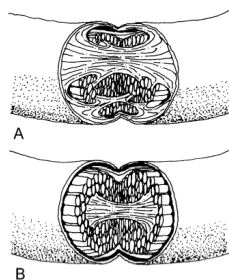
parte di tendine riparato (superficiale o profonda) e nel timing riparatorio. Inoltre la funzione secretoria dei tenociti sembra essere sito-dipendente: le cellule adiacenti alla guaina tendinea producono, infatti, meno collagene e glicosaminoglicani rispetto all'epitenon ed all'endontenon. Tuttavia, mentre la riparazione intrinseca non dà complicanze e mostra un miglior risultato da un punto di vista biomeccanico, la riparazione estrinseca può di frequente determinare delle aderenze che complicano il quadro funzionale impedendo lo scorrimento dei tendini e proprie guaine. A seconda dei tendini considerati pare vi sia una via di riparazione preferenziale: è accertato che a livello della cuffia dei rotatori si osservi una riparazione estrinseca<sup>38</sup>. Nel rimodellamento del tessuto connettivale non possiamo tralasciare alcune proteine fondamentali quali le metalloproteasi (MMPs) o zinco-proteasi. E' noto che i livelli di varie MMPs si modificano variamente in seguito ad una lesione e soprattutto durante la sua riparazione. Nel tendine di ratto, in seguito a lesione sperimentalmente praticata, le MMP-9 ed MMP-13 aumentano tra il settimo e il quattordicesimo giorno dall'intervento. Tuttavia MMP-9 e MMP-13 fanno parte di quelle metalloproteasi deputate alla sola degradazione del connettivo; piuttosto sono le MMP-2 MMP-3 e MMP-14 a prendere parte al rimodellamento tissutale. L'Ossido nitrico (N.O.) è un altro fattore che può avere un suo peso nel processo riparativo del tendine.

Esso viene prodotto a partire dalla L-arginina mediante l'enzima N.O. sintasi. Dopo settimana da una tenotomia, ad esempio del tendine di Achille, il livello di ossido nitrico raggiunge un picco e poi decresce<sup>39</sup>. Peraltro l'inibizione dell'N.O. sembrava ridurre la sezione trasversale e il carico di rottura. Sono state identificate ben 3 isoforme di ossido nitrico sintasi, ciascuna delle quali risponde in tempi diversi ad un danno.



**Fig. 2.1 :** Fasi della tenogenesi riparativa.  
**A-** Fase Infiammatoria.  
**B-** Fase ipercellulare  
**C-** Fase di rimodellamento.

Adattato da: Strickland 1999.



**Fig. 5.2 :** Rappresentazione schematica della via estrinseca (A) e della via intrinseca (B) della riparazione tendinea.

Ad esempio l'isoforma neuronale raggiunge il picco funzionale a due settimane dalla rottura. Probabilmente l'incremento di questo fattore svolge un'attivazione più intensa dei meccanismi di riparazione. La sostanza P e il peptide correlato al gene della calcitonina (CGRP) sono pro-infiammatori e



vengono rilasciati dalle strutture nervose localmente alla lesione tendinea, raggiungendo il loro picco massimo durante la fase proliferativa.

#### **2.4 - Limitazioni della tenogenesi riparativa.**

Le *aderenze* sono il più grosso problema che segue ad una lesione tendinea, soprattutto la intrasinoviale. L'alterazione della guaina tendinea porta alla formazione di tessuto di granulazione mentre i tenociti sopraggiungono dalle aree circostanti. Questi ultimi, assieme alle cellule del tessuto di granulazione tendono ad avere un'azione prevalente rispetto alle cellule già presenti: tutto ciò esita nella formazione di aderenze con i piani superiori o altre parti illese del tendine. Nonostante sia possibile una riparazione spontanea della lesione tendinea, degli studi sperimentali su pecora<sup>40</sup> hanno osservato che il carico di rottura è solo il 56.7 % del carico normale, a 12 mesi dall'intervento. Ciò trova verosimilmente spiegazione nell'assenza di un opportuno carico durante il periodo di immobilizzazione.

L'assenza di carico si traduce in uno scarso irrobustimento del tendine. Una giustificazione alla frequente formazione di aderenze è che in tal modo sia possibile trasferire parte della tensione su altre strutture in modo tale da non ledere ulteriormente il tendine in riparazione<sup>41</sup>. Nella formazione delle aderenze viene attribuita grande importanza ai miofibroblasti in virtù della loro attività secretiva e contrattile<sup>42</sup>.

Per prevenire le aderenze o per ridurle al minimo sono state impiegate diverse soluzioni, meccaniche come il polietilene o il silicone, o ancora servendosi di farmaci inibenti la fibroplasia come l'Indometacina e l'Ibuprofen. Successivamente è stato impiegato lo Ialuronato prelevato dal liquido sinoviale delle guaine, e che ha rivelato una minor formazione aderenziale significativa nei tendini flessori di ratto. Tuttavia questo prodotto non influiva sulla formazione di aderenze di quei tendini come l'Achilleo non provvisti di una guaina sinoviale circostante<sup>43</sup>. Infine sono stati introdotti gli antimetaboliti come il 5-fluorouracile dotato di una funzione inibitrice sulle cellule con un'intensa

attività metabolica tra cui i fibroblasti <sup>44,45</sup>. La somministrazione di una concentrazione di 25 mg/ml risultava in grado di prevenire effettivamente la fibrosi.

## CAPITOLO 3

# PREVENZIONE DELLE TENDINOPATIE: I NUTRACEUTICI

### 3.1- Definizione e principi generali

**A**d oggi vengono impiegati trattamenti conservativi nella cura delle tendinopatie e nella prevenzione delle recidive<sup>46,47</sup>. In questo ambito, negli ultimi anni è stato proposto l'uso di supplementi orali volti al sostegno del fisiologico *turnover* dei tessuti tendinei, allo scopo di prevenirne l'infiammazione e soprattutto la degenerazione.

Nel 1989 De Felice, nel suo libro *The NutraCeutical Revolution: Fueling a Powerful, New International Market* introdusse il neologismo sincretico "nutraceutico", derivante dai termini "Nutrizione" e "Farmaceutica", per indicare una sostanza alimentare o "alimento funzionale" che per le sue proprietà biochimiche si colloca al limite tra l'alimento ed il farmaco<sup>48</sup>. Concettualmente questo rappresenta una rivoluzione in tema di alimentazione: il nutriment non più interpretato come semplice fonte di energia ma anche come fonte di medicinali con finalità di tipo protettivo/preventivo per la salute. Riguardando la Storia tuttavia questo concetto di commistione tra alimento e farmaco non è del tutto nuovo: già Ippocrate nel IV secolo a.C. asseriva: "*Lasciate che il cibo sia la vostra medicina e la vostra medicina sia il cibo*". L'impiego dei prodotti nutraceutici "teno-protettivi" hanno oggi un crescente impiego commerciale, sostenuto dalla diffusione di studi che attestano il ruolo teno-protettivo dei principali molecole quali: Glucosamina e Condroitin solfato

(GlcN-CS)<sup>49-56</sup>, Vitamina C (Vit C)<sup>57-71</sup>, Idrolisato di Collagene tipo I (Col 1)<sup>72-74</sup>, L-arginina alfa-cheto-Glutarato (AAKG)<sup>75-91</sup>, Curcumina<sup>92-95</sup>, Boswellina (BA)<sup>96-102</sup>, Metilsulfonilmetano (MSM)<sup>80,88,99,103-108</sup> e Bromelina<sup>109-114</sup> Tabella.

*L'utilizzo dei nutraceutici nelle tendinopatie – A. Gigante, A. Busilacchi, F. Fusini .*

Anche se alcuni di questi prodotti hanno ricevuto l'autorizzazione alla distribuzione come farmaci in molti Paesi Europei, per queste sostanze, che vengono commercializzate all'interno del mercato degli integratori alimentari, non sono soggette a controlli eccessivamente rigorosi rispetto ai farmaci, (Tabella 2). Studi preclinici e *trial* randomizzati controllati (RCTs) sono stati condotti per stabilire l'efficacia di questo approccio conservativo nella gestione delle tendinopatie con risultati che possiamo definire ancora “aperti”: nonostante in forte clamore commerciale, la comunità scientifica su tale argomento è ancora piuttosto prudente.

Nel corso di questo capitolo si prenderanno criticamente in esame le varie sostanze per comprenderne un possibile ruolo nel processo di protezione o riparazione del tendine affetto da patologia.

### **3.2- Glucosamina e condroitin solfato.**

Glucosamina (GlcN) e Condroitin-Solfato (CS) sono tra i più comuni integratori nutraceutici già ampiamente impiegati nella prevenzione dell'osteartrosi<sup>55</sup>. . Recentemente alcuni studi hanno proposto l'uso queste medesime sostanze anche nella cura delle tendinopatie e nel sostegno al processo di guarigione delle rotture tendinee.

*In vitro* dimostrerebbero che i tenociti e cellule fibroblastic-like possono essere stimulate positivamente con l'aggiunta in combinazione di GlcN e CS al mezzo di coltura . L'analisi con idrossiprolina radiomarcata (marcatore specifico per la sintesi del collagene) mediante cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC) ha confermato la specificità dell'effetto ipotizzato sul metabolismo. L'idrossiprolina marcata è risultata aumentata del 132 % nelle cellule del

legamento, del 27% nei tenociti e del 49% nelle cellule dell'*epitenon* dopo 48 ore di esposizione a 5 mcg/ml GlcN + 4 pg/ml CS. Basse dosi di combinazioni di GlcN e CS hanno stimolato e cacemente *in vitro* la neosintesi di collagene e di proteine non collageniche (NCP) da parte delle cellule del legamento, dei tenociti e dei condrociti<sup>50</sup>..

Inoltre, l'iniezione di glicosaminoglicani polisolfati (GAGPS) ha mostrato, in un modello sperimentale su tendine flessore digitale superficiale di cavallo trattato con collagenasi batterica per simulare un processo in ammatore, un effetto positivo nella sintesi di collagene I rispetto al gruppo di controllo infiltrato con salina [10].

Da uno studio *ex vivo*, su ratti tenotomizzati trattati con supplemento orale di GlcN e CS, è stata dimostrata la formazione di collagene meglio organizzato e una ridotta infiammazione rispetto al gruppo di controllo alimentato con placebo. Test biomeccanici hanno mostrato maggiore resistenza del tendine nel gruppo sperimentale a otto settimane che tuttavia non è statisticamente significativa ( $55.3 \pm 4.84N$ ,  $p = 0,078$ ), ma ai ratti a cui sono stati dati GlcN-CS hanno avuto una maggiore resistenza del tendine che invece è statisticamente significativa ( $50,01 \pm 5,62$ ,  $p = 0,014$ ). Questo risultato potrebbe essere dovuto alla diminuzione dell'infiammazione ed alla stimolazione della sintesi di collagene<sup>54</sup>. Anche l'applicazione topica di CS in lesioni tendinee indotte da collagenasi nel tendine superficiale di conigli *New Zealand White* prevenirebbe gli effetti degenerativi dovuti al processo in ammatore preservando l'integrità morfologica e ultrastrutturale del tendine, la composizione biochimica e le proprietà biomeccaniche.

Il CS sembra inoltre in grado di proteggere i fascicoli tendinei dagli effetti della fatica durante cicli di carico/scarico e di carico statico, probabilmente favorendo anche un'adeguata idratazione<sup>52,53</sup>.

### 3.3- Vitamina C

Da tempo già diversi studi suggeriscono che la vitamina C sia un fattore cruciale nella sintesi della catena di procollagene. Il collagene di tipo 1 è una proteina ricca di 4-idrossiprolina e l'acido ascorbico è un fattore co-enzimatico critico della prolina-idrossilasi<sup>115</sup>.

Kao ha dimostrato che la vitamina C è un valido induttore della sintesi dell'idrossiprolina del procollagene nei tenociti<sup>59,60</sup>.

Altri esperimenti su tendine aviario hanno dimostrato che la presenza di un adeguato livello di vitamina C sia fondamentale per la normale sintesi di collagene: i tenociti infatti coltivati in medium senza ascorbato, sintetizzano solo un terzo del collagene normalmente prodotto<sup>68,69</sup>.

Gli esperimenti di Schwarz hanno mostrato che la vitamina C è un buon induttore di funzioni tessuto-specifiche; è uno stimolatore altamente specifico e potente della sintesi del collagene pur non avendo alcun effetto sulla proliferazione delle cellule in coltura. L'idrossilazione completa dei residui di prolina nel collagene sono un passaggio necessario per l'induzione di collagene stesso, ma da sola non è sufficiente per raggiungere l'aumento della sintesi<sup>70</sup>.

Schwarz ha inoltre scoperto che l'ascorbato aggiunto a cellule tendinee aviarie è in grado di causare un incremento di circa 6 volte nella traduzione del procollagene, osservabile dopo 4 ore dalla somministrazione con un picco massimo dopo 48 ore. Analogamente, è stato osservato che l'mRNA del procollagene stesso aumenta dopo aggiunta di ascorbato di circa 6 volte a 12 ore dalla somministrazione raggiungendo un livello massimo del 72 h. La costante di velocità per la secrezione del procollagene ha essa stessa mostrato un aumento di circa 6 volte. Ciò si traduce in una diminuzione del tempo di dimezzamento di procollagene all'interno della cellula da 120 minuti a 20. In netto contrasto con gli altri passi nella via del procollagene, la variazione della costante di velocità di secrezione è estremamente veloce e si è verificata in meno di 30 min. Inoltre, dopo aggiunta di ascorbato, più del 80 % del procollagene interno può essere secreto ad un tasso più veloce<sup>67,69</sup>.

Valutando più in dettaglio la forma isomerica è risultato che l'isoascorbato si è dimostrato 3 a 5 volte meno attivo nell'indurre la produzione di procollagene rispetto all'ascorbato anche perché viene acquisito dalle cellule circa cinque volte meno dell'ascorbato nonchè viene stato degradato ad una velocità leggermente superiore (emivita di 1,6h) rispetto all'ascorbato ascorbato (2,1 h). I dati sono coerenti con un modello che postula che una volta all'interno della cellula l'isoascorbato sia ugualmente efficace nell'indurre la produzione di procollagene ma la selettività nella fase di trasporto limita la percentuale effettivamente internalizzata<sup>61</sup>.

Biopsie di tendine di pollo, trattate ogni giorno con vitamina C fresca (0,1 mm) hanno evidenziato una significativa maggiore migrazione rispetto ai fibroblasti di controlli. La proliferazione cellulare, la sintesi del collagene e la sintesi di proteine totali non sono stati significativamente modificati dal trattamento con ascorbato<sup>116</sup>.

L'acido ascorbico inoltre, come un agente anti-ossidante, ha mostrato un miglioramento della stabilità termica e meccanica del tendine della coda di ratto, in particolare riducendo i legami riducibili di aldimina<sup>65</sup>. Lo stesso effetto potrebbe essere visto in un modello di tendine di pollo. La vitamina C è in grado di ridurre lo stress ossidativo e quindi la formazione di aderenze con i tessuti circostanti; infatti è in grado di apportare livelli tissutali più elevati di GSH dopo due settimane dalla lesione, rispetto al gruppo di controllo. I tendini trattati con vitamina C hanno mostrato anche un significativo miglioramento della resistenza alla trazione e una significativa riduzione delle dimensioni della cicatrice fibrotica a sei settimane. Inoltre, l'esame istologico ha mostrato una minore adesione tra tendine e tessuto peritendineo<sup>58</sup>.

L'esperimento di Russell et al. nel 1991, ha voluto stabilire il livello ottimale di acido ascorbico con il quale ottimizzare il processo di guarigione della ferita del tendine. Essi hanno monitorato l'effetto di vari livelli di acido ascorbico con la formazione di 3H-timidina, collagene e sintesi proteica non-collagenica, l'utilizzazione del glucosio e la produzione di lattato. Segmenti del tendine

flessore profondo sono stati ottenuti da conigli bianchi giovani-adulti della Nuova Zelanda e mantenute in coltura per periodi di 1 , 2 o 3 settimane. Le concentrazioni di acido ascorbico sono state fatte variare da 50 a 300µg/ml e sono stati raggiunti freschi ad ogni 48 h di cambiamento del medium. La sintesi proteica del tendine, il metabolismo del glucosio, e la permeabilità cellulare/vitalità sono significativamente correlati con il livello di acido ascorbico nel medium di coltura. I risultati suggeriscono che livelli di acido ascorbico in eccesso rispetto ai tradizionali 50 µg/ml sono necessari per mantenere in modo ottimale tendini flessori di animali adulti in coltura<sup>66</sup>.

Un altro studio riguardante l'inoculazione di vitamina C in tenotomie complete del tendine d'Achille ha dimostrato che alte dosi di supplementazione di vitamina C sortiscono effetti stimolanti sulla riparazione tendinea consistenti in una maggiore neo-angiogenesi e in un aumento della neosintesi di collagene<sup>63</sup>.

### **3.4- Collagene Idrolizzato Tipo I**

Il ruolo del collagene I sui tenociti o colture di tenoblasti è tuttavia ancora poco studiato. Uno studio sperimentale dimostra che l'assunzione orale di Col I possa influenzare la dimensione delle fibrille di collagene e la composizione di glicosaminoglicani del tendine di Achille: esso aumenta la quantità di dermatan-solfato ed abbassa la percentuale di acido ialuronico, soprattutto dopo somministrazione di collagene idrolizzato in dosi elevate.

Questa modulazione della percentuale di macromolecole della matrice si ritiene possa migliorare le proprietà biomeccaniche, almeno in un modello animale<sup>72,74</sup>.

Un recente studio su tenociti primari umani isolati da tendine flessore superficiale delle dita ha indicato che una supplementazione con una formulazione nutraceutica basata su mucopolisaccaridi, collagene idrolizzato tipo I e vitamina C, sia in grado di sopprimere l'attivazione di NF-kB IL-1β indotta e la traslocazione nucleare di p65. Questi eventi correlano con la *down-*



*regulation* dei bersagli di NF- $\kappa$ B, tra cui COX-2, MMP-1 e la caspasi-3 attivata e dunque i processi degenerativi cellulari e della matrice tendinea<sup>117</sup>.

### **3.5- L-arginina-alfa-keto-glutarato**

La L-Arginina è un aminoacido essenziale della famiglia enzimatica delle ossido nitrico sintasi (NOS) implicato nella produzione di ossido nitrico (NO): quest'ultima molecola fattore cruciale nella riparazione tendinea<sup>79,82</sup>. Essa sembra anche essere un fattore protettivo contro i prodotti di glicazione iniziali e terminali dei tendini trattati con concentrazioni di glucosio differenti simulando quadri simili alla tendinopatia associata a forme diabetiche: infatti entrambi i prodotti di glicazione sono significativamente ridotti in presenza di arginina<sup>89</sup>.

Dopo l'induzione di una lesione sperimentale si è osservato un incremento di cinque volte dell'attività di NOS all'interno del tendine a 7 giorni, con un ritorno vicino ai livelli basali dopo 14 giorni dal trauma. L'inibizione della NOS con somministrazione orale di N $\omega$ -nitro-L-Arginina Metil Estere (L-NAME), che è un analogo della L-arginina, ha determinato una significativa riduzione dell'area della sezione trasversale e del carico di rottura del tendine d'Achille<sup>81,87</sup>.

La somministrazione di L-arginina per infusione endovenosa o tramite assorbimento orale ha mostrato la capacità di indurre vasodilatazione periferica nell'uomo, e di migliorare la vasodilatazione endotelio-dipendente<sup>75</sup>.

Nello studio di Bode-Boger, a distanza di 4 giorni dalla induzione del danno si sono registrati aumenti nei livelli di mRNA per tutte e tre le isoforme di NOS, con preva,e per l'isoforma inducibile (iNOS) (23 volte superiore) al giorno 4, l'isoforma endoteliale (eNOS) (24 volte maggiore) al giorno 7 e l'isoforma neuronale (bNOS) (7 volte maggiore) al giorno 21. Tutte e tre le isoforme di NOS sono espresse durante la guarigione del tendine con pattern di espressione differenziale durante le varie fasi di guarigione<sup>83</sup>.

In modelli animali, quando l'attività NOS è inibita da inibitori competitivi della NOS, la guarigione del tendine è ridotta. Quando si aggiunge al contrario NO, la guarigione del tendine tende al miglioramento<sup>85</sup>.

Durante la riparazione fisiologica del tendine i livelli di TGF- $\beta$  aumentano in un primo tempo e diminuiscono gradualmente dopo 3 settimane dal trauma per raggiungere i livelli dei tendini illesi di controllo. Tuttavia, quando L-NAME è stato somministrato al momento della lesione, i macrofagi infiltrati esprimevano alti livelli di TGF- $\beta$  anche a 5 settimane dopo la lesione, senza evidenza di riduzione. In una lesione standard l'attività iNOS è più alta nella fase acuta dell'infiammazione e poi gradualmente tende a tornare normale. Il trattamento con L-NAME, tuttavia, ha provocato l'inibizione dell'attività iNOS a 3 giorni e una riduzione dell'attività nei momenti successivi. I ratti L-NAME trattati hanno mostrato livelli aumentati di adesione dei macrofagi al monostrato di epitenonio in vitro, che rifletterebbe lo squilibrio cronico tra espressione del TGF- $\beta$ , che è iperespresso, ed espressione di ossido nitrico, che è sottoespresso. Così in conclusione si può valutare che la formazione di ossido nitrico è un evento importante nel corso della guarigione tendinea poiché la sua inibizione sfocia in infiammazione cronica e fibrosi a causa di uno squilibrio nell'espressione del TGF-beta in vivo<sup>77,90</sup>.

Il trattamento di lesioni tendinee acute con inibitore di NOS ha suscitato una risposta infiammatoria cronica caratterizzata da un accumulo persistente e straordinariamente alto di un gran numero di cellule infiammatorie nel tessuto sottocutaneo, muscolare e tendineo<sup>78</sup>.

La deposizione di collagene è un processo importante che si verifica durante la guarigione della lesione tendinea come di qualunque lesione dei tessuti molli. L'aggiunta di L-Arginina ad una coltura di tenociti umani, attraverso l'enhancement della produzione di ossido nitrico, può incrementare significativamente la sintesi del collagene per lo meno in vitro<sup>91</sup>. Un corrispettivo in modelli animali ex vivo viene descritto da Moraes et al. Che hanno osservato che il trattamento locale con L-NAME migliora

significativamente i parametri funzionali ed accelera il recupero istomorfologico in lesioni sperimentali del tendine d'Achille<sup>84</sup>.

### 3.6- Curcumina

La curcumina è un antiossidante estratto dalla *Curcuma Longa* che ha mostrato un effetto nella prevenzione di prodotti finali del processo di glicosilazione animali sperimentali in cui è stato indotto il diabete: il danno da stress ossidativo, l'accumulo di prodotti di perossidazione lipidica e l'accumulo di AGE-collagene nel siero diabetico risultava significativamente decrementati. Anche il cross-linking del collagene nei tendini e nella cute di animali diabetici è stato diminuito dalla somministrazione di curcumina<sup>95</sup>.

Nello studio di Sajithlal et al. la curcumina ha mostrato la capacità di inibire la proliferazione delle cellule endoteliali sia in presenza che in assenza di bFGF, così come la capacità di inibire la proliferazione di una linea di cellule endoteliali immortalizzate. Prendendo un modello murino ad esempio, la curcumina ha inibito efficacemente la proliferazione endoteliale in modo dose-dipendente dimostrando una significativa inibizione della neovascolarizzazione bFGF-mediata. Considerando che la presenza di un aumento della vascolarizzazione è un reperto molto comune riscontrato in corso di tendinopatia, la curcumina agendo da inibitore della neoangiogenesi patologica può essere una utile risorsa di trattamento<sup>92</sup>.

Nei ratti diabetici, l'idrossiprolina e il contenuto di collagene così come il grado di cross-linking risultano aumentati, come evidenziato dalla misura di glicazione, la fluorescenza dei legami collagenici, il collagene sale neutro, e la diminuzione di solubilità in acido e pepsina. La somministrazione di curcumina per 45 giorni a ratti diabetici si è dimostrata efficace nel ridurre significativamente l'accumulo ed il cross-linking del collagene<sup>94</sup>.

La curcumina ha come target la via di segnalazione NF-kb. In un modello di tenociti umani, la curcumina a concentrazioni di 5-20 mcg ha inibito l'infiammazione indotta da IL-1 $\beta$  e l'apoptosi dei tenociti. Gli effetti anti-

infiammatori della curcumina incluso l'abbassamento dei prodotti genici che mediano la degradazione della matrice (MMP-1, -9 e -13), la produzione di prostanoidei (COX-2), l'apoptosi (Bax e caspasi-3), e la stimolazione della sopravvivenza cellulare (Bcl-2), tutti noti per essere regolati dalla via NF- $\kappa$ B. Inoltre, la curcumina risulta in grado di sopprimere l'infiammazione IL-1 $\beta$  indotta dall'attivazione di NF- $\kappa$ B attraverso l'inibizione della fosforilazione e degradazione dell'inibitore di  $\kappa$ B $\alpha$ , inibitore dell'inibitore della chinasi  $\kappa$ B, e l'inibizione della traslocazione nucleare di NF- $\kappa$ B<sup>93</sup>.

### 3.7- Acido Boswellico

L'acido Boswellico (BA), estratto dalla pianta *Boswellia Serrata*, ed alcune sue isoforme (acido 11-keto-beta-boswellico e acetil-11-keto-beta-boswellico) sono state descritte come inibitori dell'elastasi e della proliferazione cellulare, induttori della cascata apoptotica e l'inibitori di alcuni tipi di topoisomerasi nei leucociti. BA inibisce la biosintesi dei leucotrieni nei granulociti neutrofili tramite una inibizione non-redox, non competitiva dell'enzima 5-lipossigenasi<sup>97</sup>. Gli esperimenti in vivo hanno mostrato attività anti-infiammatoria con un meccanismo di azione diverso da quello dei FANS e piuttosto relativo al controllo di altri enzimi presenti nei leucociti ed in altre cellule locali. L'azione più evidente è l'inibizione della 5-lipossigenasi (5-LO) ma anche l'elastasi leucocitaria ed i radicali dell'ossigeno<sup>98</sup>.

BA oltre ad essere in grado di inibire l'attivazione di NF- $\kappa$ B ha mostrato una *down regulation* di citochine pro infiammatorie quali TNF $\alpha$ , IL-1, IL-2, IL-4, IL-6 e IFN- $\gamma$ <sup>100</sup>. La soppressione della via classica del complemento è risultata essere causata dall'inibizione della conversione di C3 in C3a e C3b. L'inibizione della sintesi delle prostaglandine sembra svolgere un ruolo marginale. D'altra parte l'azione inibitoria di BA sulla 5-LO portando ad una diminuzione della produzione di leucotrieni ha ricevuto notevole attenzione dalla comunità scientifica in quanto alcune malattie infiammatorie croniche sono associate con un'aumentata attività dei leucotrieni. Tuttavia, l'acido 11-keto-beta-boswellico

e l'acido acetil-11-cheto-beta- boswellico non hanno dimostrato di inibire la formazione di leucotrieni nel sangue intero umano ed i dati farmacocinetici hanno rivelato che concentrazioni molto basse di acido 11-keto-beta-boswellico e acetil-11-keto-beta-boswellico nel plasma siano largamente inferiori alle concentrazioni efficaci di bioattività in vitro<sup>98</sup>.

Concentrazioni plasmatiche di acido  $\beta$ -boswellico 100 volte superiori ai valori normali sono state in grado di inibire a livello microsomiale la prostaglandina-E-sintasi-1 e la serina-proteasi-catepsina G.<sup>96</sup>

Sebbene l'acido Boswellico sia spesso usato in associazione con altri nutraceutici nel trattamento delle tendinopatie, non sono stati trovati articoli specifici riguardo l'uso di BA nel trattamento delle lesioni dei tendini. Per questo motivo è impossibile valutare il ruolo specifico di acido Boswellico nel trattamento della tendinopatia sebbene venga desunto dagli effetti cellulari un suo ruolo benefico.

### **3.8- Metilsulfonil Metano (MSM)**

Il metilsulfonilmetano (MSM) è un integratore dietetico molto popolare utilizzato in una grande varietà di condizioni, tra cui il dolore, le infiammazioni, le allergie, artriti, le infezioni parassitarie, batteriche ecc...<sup>105,106</sup>. MSM è un composto contenente zolfo che si trova in una vasta gamma di alimenti, tra cui frutta, verdura, cereali e bevande. La somministrazione orale di MSM può essere assorbita rapidamente, viene ben distribuita ubiquitariamente nell'organismo e successivamente è completamente eliminata dal corpo<sup>107</sup>.

Il MSM è considerato un analgesico naturale e un efficace agente anti-infiammatorio tanto che se ne suggerisce l'uso nella gestione dell'artrosi, patologia in cui ha mostrato evidenze in termini di analgesia, riduzione dell'edema, e quindi nel miglioramento generico della capacità funzionale dell'articolazione patologica<sup>108</sup>. Anche in questo caso non esistono in letteratura studi clinici con evidenze di peso circa l'uso dell'MSM nella patologia tendinea né opportuni studi preclinici su colture di tenociti o su modello animale con

lesioni tendinee. Due studi clinici italiani di Notarnicola e Gumina hanno posto l'attenzione sulla supplementazione orale di MSM assieme ad altri nutraceutici per la gestione di tendinopatie<sup>80,88</sup> riportando solo incoraggianti dati clinici in termini di riduzione della sintomatologia locale.

### **3.9- Bromelina**

Sin dagli anni Sessanta la bromelina ha un impiego farmacologico nel trattamento di edema ed ecchimosi post traumatici<sup>113,114</sup>. La bromelina è una miscela di proteasi derivate dal fusto dell'ananas che è stato annoverato avere benefici terapeutici in una varietà di malattie infiammatorie. L'esposizione alla bromelina in vitro ha dimostrato di rimuovere un numero di molecole di superficie cellulare che sono vitali per i leucociti, tra cui CD128a/CXCR1 e CD128b/CXCR2, i quali fungono da recettori per il fattore IL- 8, noto chemiotattico dei neutrofilo. Nonostante la bromelina induca una riduzione nella migrazione dei leucociti la risposta agli antigeni batterici è comunque inalterata. Più in dettaglio, da studi in vivo il trattamento con bromelina ha generato un 50-85% di riduzione nella migrazione dei neutrofilo in 3 diversi modelli murini di migrazione: Viene diminuito transitoriamente il rolling leucocitario, mentre il suo effetto principale a lungo termine è stato quello di impedire la ferma adesione dei leucociti nei vasi sanguigni a livello del sito di infiammazione. Questi cambiamenti dell'adesione sono stati correlati con un rapido ripristino dell'espressione delle molecole CD62L/L-selectina bromelina sensibile che mediano il rotolamento dopo il trattamento con bromelina ed una minima ri-espressione del CD128 nel tempo<sup>104,112</sup>.

Non tutte le parti di ananas hanno le stesse proprietà sui tenociti e sullo stress ossidativo. Aiyegbusi et al. hanno osservato in un modello sperimentale che la polpa e l'estratto di corteccia della pianta di ananas, contenenti l'enzima bromelina, hanno indotto sì la proliferazione dei tenoblasti, ma che tale dato non era significativamente diverso da quanto riportato nei controlli non trattati; al contrario parti della pianta come le foglie e gli estratti del nucleo sono in grado

di ridurre la popolazione di tenociti. La malonildialdeide (MDA), che viene prodotta durante la prima fase di guarigione di una lesione tendinea può essere considerata un marker di stress ossidativo tendineo: l'estratto della polpa dell'ananas è in grado di ridurre significativamente il livello di MDA mentre le foglie e l'estratto del

nucleo lo aumentano significativamente. L'estratto di corteccia non ha un impatto significativo sulla produzione di MDA rispetto ai tendini non trattati. Ciò suggerisce che i componenti antiossidanti e terapeutici della pianta di ananas siano concentrati nella polpa <sup>110</sup>.

Confrontando gli effetti della bromelina commerciale e del succo di ananas fresco sulla proliferazione tenocitaria ed il livello di MDA nella fase iniziale della guarigione di lesioni del tendine di Achille, Aiyegbusi ha osservato che vi è una differenza significativa nella popolazione tenocitaria tra il gruppo trattato con bromelina e il gruppo di controllo, mentre il succo di ananas è in grado di aumentare la popolazione di tenociti, anche se non in modo statisticamente significativo. Il succo d'ananas, tuttavia, risulta essere in grado di ridurre notevolmente il livello MDA rispetto sia al controllo che al gruppo trattato con bromelina<sup>109,111</sup>.

### **3.10 –Stato dell'arte su nutraceutici e teno-protezione**

La mancanza di studi clinici sugli integratori non ancora ad oggi consente una valutazione specifica per ciascuna sostanza. Infatti i lavori attualmente disponibili in letteratura comunemente analizzano più sostanze e spesso analizzano preparazioni farmaceutiche o la combinazione di integrazione orale con attività fisiche o altri trattamenti.

Confrontando gli effetti della glucosamina e dell'indometacina nella gestione della peritendinite del tendine d'Achille, Sundqvist et al. hanno dimostrato che la glucosamina ha un buon effetto terapeutico complessivo su due terzi dei

pazienti rispetto a un terzo dei pazienti trattati con indometacina. In pazienti con dolore persistente, la glucosamina ha dimostrato di essere più efficace dell'indometacina ed anche in pazienti non responsivi ad indometacina, la glucosamina ha mostrato un piccolo/moderato miglioramento del dolore<sup>56</sup>.

Nel 2009 lo studio clinico randomizzato di Szurcko nella gestione della tendinopatia della cuffia dei rotatori che confrontava l'esercizio fisico rispetto al supplemento nutraceutico contenente bromelina (con l'aggiunta di sedute di agopuntura), ha dimostrato che gli esercizi fisici e gli integratori orali hanno fornito entrambi miglioramenti significativi, con un maggiore miglioramento della funzione della spalla nel gruppo trattato con i nutraceutici rispetto al gruppo con solo esercizio fisico. Lo stesso gruppo ha anche mostrato un miglioramento statisticamente significativo in termini di qualità della vita<sup>118</sup>.

Lo studio clinico MESACA coordinato da Notarnicola et al., che ha ricercato gli effetti dell'associazione BA-MSM, pur essendo incentrato sulla gonartrosi e non avendo confermato i promettenti risultati degli studi preclinici, ha sollevato un interessante interrogativo riguardo l'eventuale uso di queste sostanze come una possibile terapia adiuvante in quelle persone che hanno controindicazioni alla terapia con fans. Dai risultati di questo studio, si evince che le due sostanze riducono significativamente la necessità di farmaci anti-infiammatori, attualmente somministrati nella terapia convenzionale delle tendinopatie<sup>99</sup>.

La supplementazione orale di Col I, AAKG, MSM e bromelina ha avuto un ruolo potenziale nella guarigione del tendine mitigando il dolore causato dalla tendinopatia. Si è dimostrato essere un valido strumento per la riparazione artroscopica della cuffia dei rotatori. Gumina et al. hanno scoperto che la tenointegrazione orale per 3 mesi dopo la riparazione della cuffia, è efficace nel diminuire il dolore post-operatorio alla spalla e di portare ad un leggero miglioramento dell'integrità della riparazione. Questo miglioramento non sembra essere in relazione con un miglior risultato obiettivo funzionale. Tuttavia, questi effetti potrebbero facilitare ed abbreviare il programma di riabilitazione post-operatoria e ridurre il tasso di nuova rottura<sup>80</sup>.



Notarnicola et al. hanno valutato se la terapia con onde d'urto extracorporee potesse produrre buoni risultati nel trattamento della tendinopatia inserzionale Achillea, efficacia che sembrerebbe essere potenziata dalla somministrazione contestuale di integratori alimentari contenenti L-arginina- $\alpha$ -cheto-glutarato, Vinitrox®, MSM, bromelina, collagene di tipo I e vitamina C. L'effetto della supplementazione nutraceutica e la terapia con onde d'urto ha dimostrato che il trattamento combinato con onde d'urto extracorporee e la supplementazione orale aveva un livello inferiore di dolore, misurato con scala analogica visiva, rispetto al gruppo di controllo. Il risultato clinico e funzionale, misurato con scala VAS e Ankle-Hindfoot scale e Roles and Maudsley score, hanno dimostrato che la terapia combinata vada meglio rispetto alla terapia con onde d'urto extracorporee da sola<sup>88</sup>.

Anche se Nakhostin-Roohi si sia interessato dello studio del potenziale riduttivo del MSM dopo un esercizio vigoroso, questo studio clinico sembra sostenere l'ipotesi che anche una singola dose di MSM potrebbe ridurre significativamente i valori sierici di MDA, acido urico, carbonile proteico (PC) come marker di stress ossidativo, i quali potrebbero verificarsi anche in caso di disturbi tendinei<sup>103</sup>.

### **3.11 –Conclusioni e considerazioni personali.**

Il trattamento e la prevenzione delle tendinopatie rappresentano un argomento ancora discusso in medicina non esistendo iter diagnostico-terapeutici universalmente e scientificamente condivisi. Il primo step di trattamento, in particolare nelle forme acute e subacute, deve necessariamente essere conservativo ed in questo ambito una proposta è la supplementazione orale nutraceutica. Numerosi studi preclinici e ancora limitati trials clinici mostrano risultati incoraggianti che giustificano una indicazione d'uso sempre più ampia. Tuttavia, l'assenza di evidenze incontrovertibili che dimostrino la reale

efficacia clinica delle singole sostanze nutraceutiche nel trattamento e prevenzione delle tendinopatie non consente di trarre conclusioni<sup>119</sup>.

Nell'esperienza clinica ambulatoriale personale maturata in questi anni, vi è stato modo di poter verificare in modo personale gli effetti della somministrazione di alcuni dei mix di nutraceutici sopra citati, in particolare modo per la tendinopatia Achillea.

(dati non pubblicati – *studio di valutazione e comparazione di TendHyal<sup>®</sup> 2 bustine al dì per 2 mesi vs Tendi-Joint<sup>®</sup> 2 2 cp al dì per 2 mesi*) I risultati preliminari valutati dal sottoscritto attraverso scala VAS e VISA-A non hanno se non in singoli casi riportato miglioramenti statisticamente significativi della sintomatologia.

# CAPITOLO 4

## FATTORI DI CRESCITA e RIPARAZIONE TENDINEA

### 4.1 – Introduzione

I fattori implicati nel processo di riparazione tendinea sono molteplici: fondamentali per la riparazione dei tessuti molli sono il Transforming Growth Factor beta (TGF- $\beta$ ), l'Insuline-like Growth Factor 1 (IGF-1), il Basic Fibroblast Growth Factor (b-FGF o FGF-2), l'Epidermal Growth Factor (EGF), il Platelet Derived Growth Factor (PDGF) ed il Vacular Endothelial Growth Factor (VEGF). Altrettanto importante risulta il ruolo di alcune citochine come le Interleuchine (IL) 1 e 6.

### 4.2- Transforming Growth Factor $\beta$ (TGF- $\beta$ ).

Il TGF- $\beta$  è un fattore di crescita stimolante la formazione e la degradazione di collagene attraverso l'induzione degli Inibitori tissutali della metalloproteinasi (TIMPs) e la soppressione delle metalloproteinasi della matrice (MMPs) favorendo un turnover della ECM<sup>120</sup>.

Inizialmente, durante la riparazione il TGF- $\beta$  è iperespresso per favorire la riparazione ma in seguito, se tali livelli non si riducono, si va ad indurre fibrosi. Inoltre ad alte concentrazioni di TGF- $\beta$  si attivano meccanismi autocrini di stimolazione della Prostaglandine E2 (PGE2) agente sulla proliferazione fibroblastica<sup>121</sup>.

Il TGF- $\beta$  si concentra attorno all'area di lesione fin dalle prime ore dopo il trauma mentre tutti gli altri fattori si accumulano più gradualmente ed entro 10 giorni dal trauma sono tutti presenti in differenti cellule e sedi<sup>122,123</sup>.

I livelli di TGF- $\beta$  inoltre risultano aumentati attorno al tendine d'Achille e nel circolo sistemico in risposta ad un'ora di attività fisica, indicando un ruolo di questo fattore di crescita anche nella risposta al carico meccanico.

#### **4.3- Basic Fibroblast Growth Factor (b-FGF).**

Il b-FGF è un fattore angiogenetico avente un'azione fitogenica su molte cellule di origine mesenchimale come i fibroblasti<sup>124,125</sup>.

La sovra-espressione dell'FGF e dei suoi recettori è coinvolta nella riparazione dei legamenti come pure di altri tessuti molli. E' stato ipotizzato che l'azione dell'b-FGF si espliciti nella prima fase della riparazione<sup>126,183</sup>: infatti si è osservato un aumento della proliferazione cellulare ed un incremento notevole della sintesi di uno stabilizzatore del processo, il collagene di tipo III, nella prima settimana. Inoltre i crosslinks di piridinolina ed il carico di rottura risultano aumentati in questo stesso periodo. L'b-FGF sembra infine capace di accelerare il processo stesso di riparazione tendinea.

#### **4.4- Interleuchina 6 (IL-6) ed Interleuchina 1 (IL-1).**

L'IL-6 è prodotta dai fibroblasti e dagli osteoblasti ed è stata recentemente studiata per il suo ruolo nel rimodellamento tendineo. Nel tendine la sua secrezione è considerevolmente indotta da un'azione di stretching ciclico biassiale per 15 minuti e la sua concentrazione rimane elevata per circa 8 ore<sup>127</sup>.

L'IL-1 è un potente induttore delle MMPs nei fibroblasti, enzimi preposti alla

degradazione dell'ECM, e nelle cellule cardiache sembra contribuire anche al rimodellamento muscolare.

Il carico sui tendini stimola il rilascio di ATP ed induce la secrezione di IL-1; quest'ultimo a sua volta stimola la Ciclossigenasi 2 (COX-2), l'IL-6, l'MMP-1 e 3, fattori coinvolti nell'inizio, nella degradazione e nel rimodellamento precoce<sup>128,129</sup>.

#### **4.5- Platelet Derived Growth Factor (PDGF).**

Il PDGF funge da mediatore di numerosi processi coinvolti nella riparazione, tra cui la chemiotassi di monociti, neutrofilo e fibroblasti, la proliferazione fibroblastica, muscolare ed endoteliale, l'induzione della sintesi di matrice extracellulare come pure delle metalloproteasi che rimodellano la struttura in riparazione. Possiede inoltre la capacità di potenziare l'attività riparativa su lesioni cutanee<sup>130,131</sup>.

Tali proprietà lo rendono un candidato ideale all'impiego per l'accelerazione del processo riparativo dei connettivi, tra cui tendini e legamenti<sup>132</sup>. Infatti, se iperespresso in un tessuto lesso, il PDGF sembra in grado di indurre la sintesi di collagene I e di proteoglicani, come la laminina, e la precoce rivascolarizzazione in un modello sperimentale, inoltre, se somministrato entro 24 ore da un infortunio, permette un più rapido incremento del carico.

133

#### **4.6- Bone Morphogenetic Proteins (BMPs).**

Le BMPs appartengono alla famiglia proteica del TGF- $\beta$  ed il loro ruolo consiste nel determinare l'inizio della osteogenesi e della condrogenesi,

promuovendone lo sviluppo e permettendone il mantenimento nel tempo. Rappresentano quindi importanti segnali capaci di guidare l'embriogenesi.

Queste proteine inoltre sono implicate nella proliferazione, nell'apoptosi, nella morfogenesi e nel modellamento di diversi organi, tra cui il rene, i polmoni, l'intestino tenue, il cuore ed i denti<sup>133,134</sup>.

Una volta legato il proprio recettore, alcuni fattori di crescita, tra cui le BMPs, si servono di speciali proteine chiamate *Smad*: esse fungono da fattori di trascrizione formando complessi con altre Smad e penetrando quindi nel nucleo<sup>135</sup>. Le Smad associate ai BMPs sono Smad-1, Smad-2 e Smad-8 ma solo Smad-8 L+MH2 è capace di indurre una differenziazione verso i tenociti e promuovere quindi la generazione tendinea. Inoltre Smad-8 inibisce Smad-1 e Smad-5 ed in questo modo blocca la proliferazione degli osteoblasti, interferendo con lo stimolo dei BMPs sul solo versante della osteogenesi e condrogenesi.

#### **4.7– Insuline-like Growth Factor 1 (IGF-1).**

L'IGF è una glicoproteina prodotta dal fegato sotto lo stimolo dell'ormone della crescita (GH). Poiché vari fattori possono incidere sui livelli circolanti di GH, come ad esempio la dieta, l'esercizio fisico ed alcuni stimoli ambientali, essi possono dunque influenzare anche l'IGF. L'azione di tali ormoni è ubiquitaria, agendo sia sullo scheletro che sui tessuti molli, promuovendone la crescita tissutale e cellulare.

Sono state identificate due isoforme dell'IGF, IGF-1 e 2, agenti sugli stessi tessuti ma con affinità differenti. In alcuni studi su animale è stato dimostrato come l'IGF-1 sia capace di stimolare la sintesi di collagene ed accelerare la sintesi proteica della matrice extracellulare. Tale proprietà è dovuta anche alla capacità di questo fattore di crescita di richiamare localmente i fibroblasti e fungere quindi da fattore di migrazione. In uno studio inoltre si è potuto notare che l'IGF-1 riduce i tempi di ripresa funzionale a seguito di una lesione

suggerendo anche un probabile meccanismo antiflogistico . Al pari del precedente, l'IGF-2 si è rivelato un potente stimolatore del turnover della matrice. Oltre all'effetto post-recettoriale dell'IGF, la proliferazione cellulare e la neosintesi di collagene dipendono anche dal tipo di recettore legato e dalle proteine che lo veicolano fino al recettore. Esistono infatti sei *IGF-binding proteins* (IGFBPs), ciascuna con una diversa affinità di legame per l'IGF-1 e 2<sup>136</sup>: oltre a fungere da mezzo di trasporto per l'IGF, esse proteggono l'ormone dall'azione di proteasi pericellulari ed incrementano la sua emivita esponenzialmente. E' stato dimostrato come durante il trauma non si verifichi solo un aumento della sintesi di IGF da parte del tessuto leso, bensì anche una modificazione del sistema delle IGFBPs. In particolare si assiste, a distanza di 2, 4 ed 8 settimane dal danno inflitto, ad un aumento delle IGFBPs -2, 3 e 4 ed ad un decremento delle 5 e 6, avvalorando l'ipotesi di un loro probabile ruolo attivo nel controllo della risposta riparativa del tendine<sup>137,138</sup>.

#### **4.8- Epidermal Growth Factor (EGF).**

L'EGF è un fattore di crescita capace di stimolare la migrazione dei tenoblasti a partire dall'interfaccia dell'endotenonio.

Nell'animale è stato ben dimostrato il suo effetto mitogenico, sia per la proliferazione cellulare che per la deposizione di matrice sui legamenti<sup>139</sup>. In seguito è emersa anche un'attività chemiotattica per i tenociti, dettaglio che lo rende certamente importante nella riparazione tendinea.

#### **4.9- Cartilage Derived Morphogenetic Proteins (CDMPs).**

I CDMPs vengono espressi dal tessuto cartilagineo maturo dell'adulto ed anche dalle cartilagini di accrescimento nel periodo embriogenetico e post-natale. Tra le varie proteine, le ricerche si sono concentrate maggiormente sul CDMP-

3 poiché esso sembra indurre la differenziazione verso linee cellulari non osteoblastiche. E' stato dimostrato infatti che CDMP-3 è in grado di indirizzare l'attività proliferativa verso il tendine o la cartilagine e la mancata induzione degli osteoblasti è confermata dalla non modificazione dei livelli di fosfatasi alcalina, noto indice di attività osteogenetica.

Ulteriori esperimenti hanno dimostrato come CDMP-3 sia implicato nell'incremento della resistenza meccanica e dei parametri biomeccanici del tendine lacerato e riparato<sup>140</sup>.



# **CAPITOLO 5**

## **PLATELET RICH PLASMA e PLATELET RICH FIBRIN MATRIX**

### **5.1- Principi Generali**

**I**l notevole sviluppo delle biotecnologie nell'approccio riparativo e rigenerativo di lesioni tissutali ha portato la Ricerca Scientifica a concentrarsi su filoni di ricerca di particolare interesse. I Fattori di Crescita di origine piastrinica ne sono un esempio.

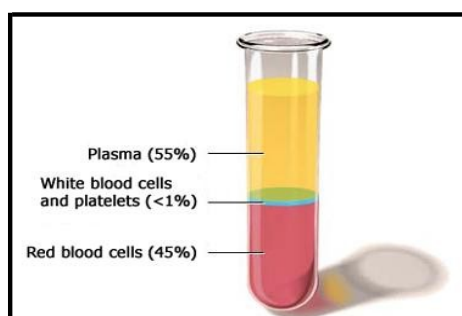
L'impiego dei fattori di crescita di derivazione autologa in particolare è stato largamente proposto in Ortopedia<sup>141</sup> ma anche in Chirurgia Maxillo Facciale e Chirurgia Plastica: questa nuova proposta terapeutica si inserisce nel clima di ricerca di nuove metodiche di prevenzione e cura che si è creato negli ultimi anni, dettato dalla determinazione del medico e del paziente nel voler ottenere il più rapidamente possibile e nel modo più completo la "restituito ad integrum".

Il trattamento conservativo più tradizionale delle tendinopatie si avvale dei comuni farmaci antinfiammatori, di varie forme di terapia fisica, della riabilitazione funzionale e dell'ultrasuonoterapia. Se tali terapie falliscono, possono essere indicate infiltrazioni di cortisonici a lento assorbimento, almeno per alcuni tendini, nonostante i numerosi effetti collaterali di questa classe di farmaci e la scarsa efficacia a lungo termine. Solo negli stadi più avanzati, dopo il fallimento delle metodiche conservative, vi può essere indicazione al trattamento chirurgico (tenolisi, scarificazioni tendinee, toilette inserzionali). Tuttavia è proprio nelle condizioni non responsive, prima di contemplare una soluzione chirurgica, che è possibile proporre, sulla base di considerazioni

eziopatogenetiche e fisiologiche, l'infiltrazione intratendinea di concentrato piastrinico. Il razionale dell'impiego di tale tecnica si basa sull'ottenimento di un'alta concentrazione locale di piastrine che, rilasciando i fattori di crescita, innescano, amplificano ed ottimizzano il processo di guarigione. Tale terapia nei tessuti affetti dovrebbe promuovere e sostenere la risposta biologica riparativa fino alla completa riparazione.

## 5.2- Composizione e biochimica.

Il Platelet Rich Plasma è costituito dalla porzione di plasma ricco di piastrine ottenuto mediante centrifugazione di una o più provette di sangue del paziente. Esso rappresenta la fonte da cui attualmente sono ottenuti i fattori di crescita (GFs), proteine capaci di stimolare la proliferazione ed il differenziamento cellulare<sup>142-144</sup>. Il sangue contiene plasma, globuli rossi, globuli bianchi e piastrine (Figura 1). Il plasma è la parte liquida del sangue: è costituito prevalentemente da acqua e funge da trasportatore per le cellule.



*Figura 1: Composizione del sangue periferico.*

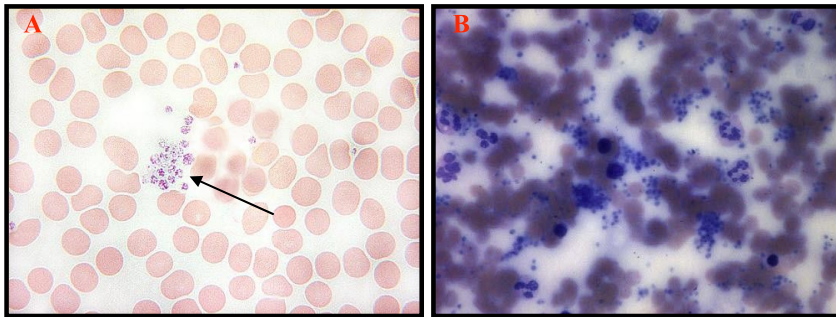
Esso inoltre contiene fibrinogeno, una proteina che viene trasformata in fibrina dalla trombina e che promuove l'aggregazione piastrinica.

Il rapporto tra le cellule presenti nel sangue normalmente è così rappresentato:

- ❖ 93% globuli rossi;
- ❖ 6% piastrine;
- ❖ 1% globuli bianchi.

Nel PRP questo rapporto è invertito in quanto abbiamo un decremento della percentuale di globuli rossi al 5% ed un incremento fino al 94% delle piastrine.

Il PRP tipicamente contiene un milione e più di piastrine per microlitro mentre normalmente nel sangue sono presenti nella misura di 180000/400000 unità per microlitro (Figura 2).



**Figura .2:** (A): globuli rossi e piastrine (freccia) nel sangue periferico; (B): PRP, notare l'elevata concentrazione di piastrine. (Microscopio ottico)

Le piastrine sono cellule anucleate di forma discoidale presenti nel tessuto sanguigno. Al microscopio elettronico si possono evidenziare al loro interno numerosi granuli di secrezione classificabili in tre tipi: granuli  $\alpha$ , granuli densi e lisosomi<sup>145</sup>. I granuli  $\alpha$  contengono numerosi fattori di crescita:

1. il PDGF (*platelet derived growth factor*) promuove l'angiogenesi, l'epitelizzazione, la formazione di tessuto di granulazione e stimola la replicazione cellulare;
2. il TGF (*transforming growth factor*) favorisce la formazione della matrice extracellulare e regola il metabolismo delle cellule del tessuto osseo;
3. il VEGF (*vascular endothelial growth factor*) promuove l'angiogenesi;
4. l'EGF (*epidermal growth factor*) favorisce la differenziazione cellulare e stimola la riepitelizzazione, l'angiogenesi e l'attività delle collagenasi;
5. l'FGF (*fibroblast growth factor*) promuove la proliferazione delle cellule endoteliali e dei fibroblasti e stimola l'angiogenesi<sup>146</sup>.

I granuli densi contengono adenosina, serotonina, istamina e calcio. L'*adenosina* è un nucleotide che gioca un ruolo importante in molti processi biochimici ed in particolare nel trasporto di energia. Rappresenta inoltre un agente citoprotettivo in grado di prevenire il danneggiamento tissutale.

La *serotonina* è un neurotrasmettitore monoaminico che localmente può aumentare la permeabilità capillare anche più dell'istamina. Inoltre possiede un effetto chemiotattico sui macrofagi e sui fibroblasti, stimolando anche la proliferazione di questi ultimi.

L'*istamina* è un'ammina responsabile della reazione immunitaria locale e ricopre anche il ruolo di vasodilatatore, aumentando la permeabilità dei capillari e delle venule e favorendo l'accesso delle cellule del sistema immunitario e delle cellule coinvolte nella risposta infiammatoria locale nel tessuto danneggiato. L'istamina è inoltre un potente attivatore dei macrofagi.

Il *calcio* infine rappresenta l'ultimo componenti dei granuli densi ed è coinvolto nei processi di proliferazione e differenziazione dei cheratinociti oltre che nella migrazione e rigenerazione delle cellule dell'epidermide.

È ormai chiaro che il PRP induce la proliferazione di diversi tipi di cellule. In studi in vitro è stato dimostrato che il PRP inibisce il rilascio di IL-1 da parte dei macrofagi e riduce la proliferazione dei macrofagi stessi limitando il processo infiammatorio iniziale. Si ritiene inoltre che i fattori di crescita, rilasciati dopo l'attivazione del PRP da parte del collagene del tessuto connettivo, possano stimolare cellule staminali quiescenti a differenziarsi nel tipo di tessuto danneggiato portando quindi ad una rigenerazione del tessuto stesso.

### **5.3 - Preparazione, infiltrazione e post-infiltrazione.**

Le metodiche con cui può essere ottenuto il PRP sono diverse: tra queste le due più utilizzate sono il sistema Biomet© ed il sistema Regen Lab©.

Il sangue del donatore viene prelevato asetticamente attraverso una siringa in quantitativi diversi (30 mL/ 60 mL) a seconda del numero di sedi da infiltrare.

La siringa impiegata per il prelievo è pretrattata con una soluzione anticoagulante ACD (acido-citrato-destrosio) o CPD (citrato-fosfato-destrosio) in quantità tale che il sangue intero si mescoli con esso in proporzione 10:1<sup>147</sup>.

Il sangue deve essere raccolto nel modo meno traumatico, utilizzando un ago 18G o maggiore per evitare l'attivazione prematura delle piastrine attraverso la loro esposizione ad eccessive forze di taglio. Successivamente il sangue viene mescolato all'anticoagulante capovolgendo delicatamente la siringa un paio di volte.

Si procede quindi alla centrifugazione del campione prelevato ed avvenuta la separazione, si ottengono circa 3 ml o 6 ml di PRP a seconda del reservoir utilizzato. Al concentrato così ottenuto si può aggiungere una piccola quantità (50 -150µL) di bicarbonato di sodio all'8,4% in modo da ristabilire il pH fisiologico ed ottimizzare l'azione piastrinica. Così facendo viene permessa la degranolazione delle piastrine nel collagene circostante il sito di infiltrazione e

viene eliminata la necessità di un attivatore piastrinico esogeno come la trombina bovina (Figura 3).

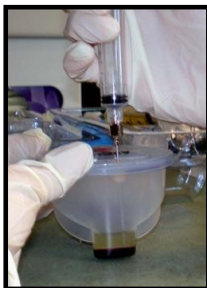
**Figura 7.3:** Schema riassuntivo della preparazione del PRP.



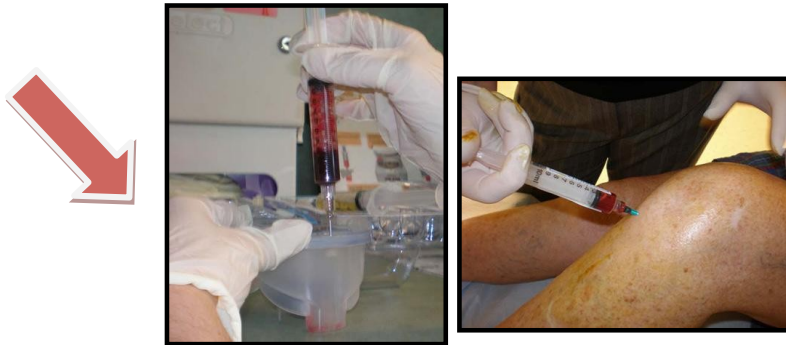
**Fase 1:** Prelievo di una piccola quantità di sangue (30-60 mL).



**Fase 2:** Le piastrine vengono separate dagli eritrociti, dai leucociti e dal plasma tramite un'apposita centrifuga.



**Fase 3:** *Gli eritrociti, i leucociti ed il plasma si stratificano ed il plasma viene rimosso.*



**Fase 4:** *Il PRP viene aspirato in una siringa, viene aggiunto bicarbonato di sodio ed infine viene iniettato nella zona da trattare.*

Si procede poi in prima istanza all'allestimento di un campo sterile, a cui segue l'infiltrazione di anestetico locale. Dopo qualche minuto, ottenuta una buona anestesia della sede da trattare, si procede alla iniezione del PRP (Figure 4 e 5). L'obiettivo della terapia intra-lesionale con il PRP è quello di minimizzare i danni alle zone circostanti il tessuto danneggiato: ciò richiede il posizionamento preciso del PRP all'interno della lesione.

Gli ultrasuoni risultano particolarmente affidabili per inserire l'ago accuratamente all'interno della zona lesionata nella maggior parte dei siti. La radiografia invece viene generalmente utilizzata per il posizionamento dell'ago qualora non sia possibile utilizzare l'ecografia.

L'immagine migliore per il posizionamento dovrebbe ottenersi ponendo perpendicolarmente l'uno all'altro il trasduttore di ultrasuoni e l'ago. Questo può essere difficoltoso da ottenere in alcune sedi dove sia richiesto che il trasduttore e l'ago giacciano sul medesimo piano. In questi casi l'ago deve essere angolato verso il trasduttore una volta entrato nella cute.



**Figura 7.4:** *Iniezione di PRP in un paziente con tendinosi cronica del gomito.*

Il volume da iniettare è soggettivo, dipende dalla dimensione della lesione e dalla disponibilità del volume della sospensione cellulare. L'obiettivo nelle lesioni più gravi è quello di colmare il difetto nel miglior modo possibile senza separare le fibre e creare ulteriori danni. Le lesioni cicatriziali croniche sono più difficili da trattare e spesso il PRP viene iniettato ad una certa pressione in associazione a scarificazioni locali con ago. Poiché spesso viene penetrata una porzione di tessuto tendineo relativamente sana per accedere alla lesione, sarebbe preferibile usare un ago di piccolo calibro. Nella maggior parte delle sedi è utilizzato un ago calibro 22 mentre aghi più piccoli possono rendere un'iniezione di PRP abbastanza difficile.

L'inserimento inoltre dell'ago longitudinalmente rispetto alle fibre del tendine sembrerebbe causare meno danni connessi all'iniezione e facilitare il riempimento della zona lesa.





*Figura 7.5: Iniezione di PRP in un paziente con tendinopatia cronica del tendine d'Achille 236 .*

Il PRP viene quindi iniettato in piccole dosi riposizionando l'ago 5-7 volte nel tessuto patologico. Dopo aver infiltrato tutto il volume tamponato, si rimuove l'ago, si esegue una nuova disinfezione e si medica sterilmente. Il paziente, nel periodo immediatamente successivo all'infiltrazione, può svolgere le normali attività quotidiane astenendosi però da attività fisiche e sportive pesanti.

Il programma riabilitativo si distingue essenzialmente in due fasi:

- la prima in cui, a partire dal 3° giorno dall'infiltrazione, sono indicati esercizi di stretching muscolare, esercizi isometrici e isotonici sulla resistenza, che favoriscono la diffusione locale dei fattori piastrinici;
- la seconda in cui, all'incirca alla terza settimana, si integra il protocollo riabilitativo con esercizi di potenziamento muscolare .

#### **5.4- Indicazioni e controindicazioni cliniche all'uso del PRP.**

I candidati all'iniezione di PRP dovrebbero essere:

1. pazienti sopra i 18 anni con lunga storia di tendinopatia trattata precedentemente senza successo o che non possono tollerare una terapia anti-infiammatoria per via orale a causa di allergia o patologie concomitanti;
2. tali pazienti dovrebbero avere una sintomatologia tale da essere presi in considerazione l'intervento chirurgico o iniezioni ripetute.

Non candidati all'iniezione di PRP sono:

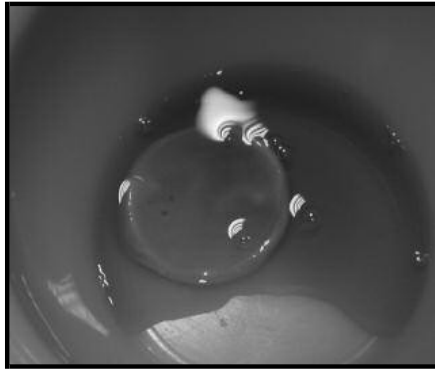
1. pazienti in terapia con anticoagulanti per coagulopatia o fibrillazione atriale;
2. pazienti incapaci di rispettare le istruzioni post-infiltrazione a causa di esigenze personali o professionali;
3. pazienti che non possono sospendere l'aspirina o altri anti- infiammatori prima e dopo la procedura;
4. pazienti per cui non è indicato rimuovere e poi iniettare derivati del sangue nel loro corpo;
5. pazienti allergici ad ogni farmaco utilizzato nella procedura (bupivacaina con adrenalina e bicarbonato di sodio)

#### **5.5- Il Platelet Rich Fibrin Matrix (PRFM).**

Nelle normali formulazioni di gel piastrinico, i fattori di crescita vengono rilasciati precocemente e la maggior parte delle piastrine si attiva prima dell'applicazione chirurgica. Il PRFM è formato invece da una fitta matrice di fibrina autologa che mantiene all'interno le piastrine intatte, vitali ed inattivate

garantendo un lento rilascio dei fattori di crescita nel sito di applicazione. La stessa matrice di fibrina si comporta da scaffold per la proliferazione cellulare indotta dalle citochine, evitando la dispersione dei fattori di crescita e garantendo una migliore e pronta rigenerazione tissutale.

Il PRFM si presenta in forma di gel stabilizzato e può essere suturato o ancorato con facilità (Figura 6).



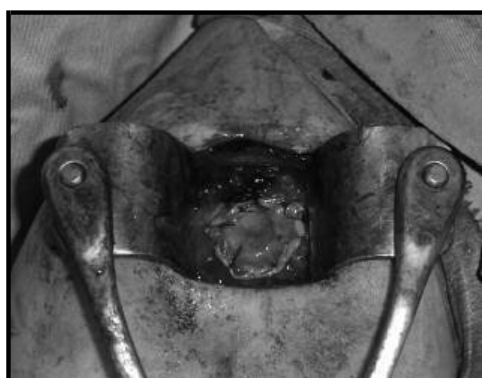
**Figura 6:** Il PRFM prima della sua applicazione.

Le metodiche di preparazione del PRFM sono diverse: le più utilizzate sono il sistema Cascade® ed il sistema Regen Membrane©.

Il sistema Cascade® permette la preparazione del PRFM a ciclo chiuso e presenta un elevato grado di riproducibilità: non ci sono variabili o fasi di lavorazione intermedie che possano determinare un'alterazione del risultato finale. Attraverso questo sistema inoltre è possibile ottenere 2 mL di PRFM da soli 9 mL di sangue autologo.

Si può effettuare il prelievo di sangue prima o durante l'intervento chirurgico da una linea non eparinizzata. Si prelevano 9 mL di sangue dal paziente in una prima provetta (tappo giallo) contenente un separatore inerte in gel poliestere e citrato di sodio. Il citrato previene la coagulazione e la centrifugazione

successiva consente di separare il plasma e le piastrine dai globuli rossi. Questa prima provetta viene centrifugata per 6 minuti a 1100 RCF ed in seguito il suo contenuto viene trasferita in una seconda provetta (tappo rosso) usando un dispositivo di trasferimento specifico. Questa seconda provetta contiene cloruro di calcio che consente alla fibrina naturale di formare una densa matrice tra le cui maglie si concentrano le piastrine. Essa viene poi centrifugata per 15 minuti a 1450 RCF. In meno di 30 minuti il gel piastrinico suturabile è pronto per l'applicazione (*da tecnica tecnica-preparazione Cascade*) (Figura 7).



**Figura 7:** Posizionamento del PRFM per colmare una lacuna. Notare le suture.

#### **5.6- Utilizzo del PRP nella patologia tendinea.**

Il razionale dell'utilizzo del PRP nella patologia tendinea si basa su una serie di recenti studi volti ad indagare, prima in vitro e successivamente in vivo, l'effetto del gel piastrinico non solo in termini di riparazione della lesione ma anche di attenuazione del dolore e ripresa del movimento.

In uno studio in vitro Anitua et al.<sup>148</sup> hanno confrontato, su colture cellulari tendinee, gli effetti dei GFs rilasciati da coaguli ricchi o poveri in piastrine (PDGF, TGF- $\beta$ 1, IGF-1, HGF, VEGF ed EGF) rispetto a quelli del plasma

povero in piastrine ma non coagulato. Gli Autori hanno così dimostrato che le cellule esposte a tali sostanze presentavano un incremento della proliferazione e che la quantità di VEGF e HGF sintetizzata dalle cellule era maggiore nelle colture esposte ai GFs rilasciate dai coaguli ricchi in piastrine. Questi risultati suggerivano un possibile utilizzo di tali coaguli nel trattamento delle lesioni tendinee attraverso lo stimolo alla proliferazione ed alla sintesi di fattori angiogenetici durante il processo di guarigione. Altri studi condotti in vitro hanno dimostrato da un lato che il PRP è capace di potenziare la proliferazione di cellule staminali stromali e mesenchimali<sup>149</sup> mentre dall'altro Woodall et al.<sup>150</sup> hanno dimostrato che la PRP può sopprimere la proliferazione di macrofagi e la produzione di IL1 entro le prime 72 ore dall'iniezione. Questa differente induzione cellulare determina implicazioni importanti nelle lesioni tendinee. Il PRP infatti potrebbe inibire inizialmente l'eccessiva infiammazione e nello stesso momento potrebbe stimolare la proliferazione e la maturazione. Ciò risulterebbe particolarmente importante nella prevenzione della fibrosi del tessuto cicatriziale mediata dai macrofagi<sup>151</sup>.

Ulteriori studi condotti su colture cellulari equine ed umane sostengono l'utilizzo della PRP per il trattamento delle lesioni tendinee: Schnabel et al. hanno documentato un potenziamento dell'espressione del gene del collagene di tipo I e delle molecole di matrice COL1A1, COL3A1 e COMP nelle cellule tendinee coltivate con PRP mentre non vi era traccia di un aumento concomitante di molecole cataboliche come la metalloproteinasi 3 e 13 (MMP-3, MMP-13)<sup>152</sup>. Analogamente McCarrel et al. hanno osservato una correlazione positiva tra la concentrazione piastrinica e l'espressione di COL1A1, con l'incremento del rapporto COL1A1/COL3A1 e con l'espressione di COMP; gli Autori hanno inoltre notato una correlazione negativa con COL3A1, con MMP-3 e MMP-13<sup>153</sup>.

Viceversa altri Autori hanno dimostrato che il PRP non solo stimola la proliferazione dei tenociti e l'intera produzione di collagene ma sembra aumentare leggermente anche l'espressione della MMP-3<sup>154</sup>226.

Anitua et al. suggeriscono inoltre che l'equilibrio tra TGF- $\beta$  ed altre citochine potrebbe controllare l'angiogenesi e la fibrosi .

A tal proposito Bosch et al. hanno documentato come la PRP sia in grado di aumentare significativamente la vascolarizzazione almeno fino alla 23<sup>a</sup> settimana rispetto al trattamento con il placebo. Ciò è stato dimostrato utilizzando l'ultrasonografia color Doppler e la colorazione immunologica del FattoreVIII. La neovascolarizzazione potrebbe essere una spiegazione dell'effetto duraturo di un singolo trattamento intratendineo con PRP 228 .



**Figura 8:** *Ultrasonografia color Doppler di un tendine d'Achille 45 giorni dopo il trattamento con PRFM: notare l'aumentata organizzazione del collagene, i bassi livelli di fibrosi e l'incremento dei capillari sanguigni. [Crane D. et al.: PRP matrix grafts. Practical Pain Management, January/February 2008]*

Gli stessi Autori inoltre, analizzando i tendini flessori digitali di 6 cavalli, hanno concluso che il PRP è in grado di aumentare l'attività metabolica ed anticipare la maturazione del tessuto riparato.

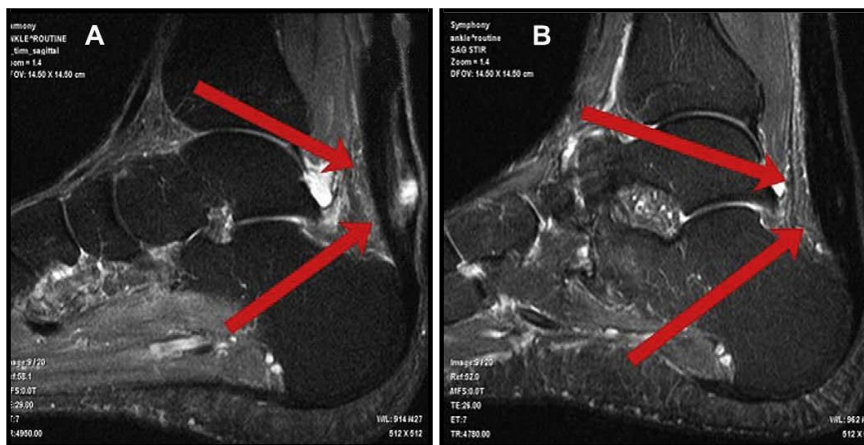
In uno studio condotto sui tendini d'Achille di 48 conigli, Lyras et al. hanno dimostrato non solo che il PRP potenzia la neovascolarizzazione ma promuove anche la formazione di un tessuto cicatriziale di qualità migliore <sup>230</sup>. In un ulteriore studio inoltre gli stessi Autori, dopo aver analizzato il tendine rotuleo di 20 conigli trattati con il PRP e confrontati con i 20 del gruppo di controllo, hanno rilevato che le proprietà meccaniche del tendine rigenerato nel gruppo PRP erano significativamente migliorate.

Aspemberg e Virchenko hanno osservato una maturazione significativa del callo tendineo dopo aver utilizzato il PRP per rigenerare le lacerazioni del tendine d'Achille di ratto <sup>155</sup>. Per di più essi hanno notato un aumento della resistenza tendinea allo stress ed un miglioramento delle proprietà meccaniche del tendine rigenerato in 4 settimane rispetto al gruppo di controllo. Lo stesso Aspemberg sostiene che la riparazione delle rotture sottocutanee di tendine può essere stimolata attraverso una singola applicazione di un GF (PDGF, TGF, IGF-1, VEGF, BMPs, GDF-5, 6, 7) oppure attraverso la PRP <sup>155,156</sup>.

In un importante studio Kajikawa et al. <sup>157</sup> hanno dimostrato che il PRP promuove la migrazione delle cellule dalla circolazione ematica verso il sito di iniezione. Secondo tale studio inoltre il PRP stimola la produzione di collagene di tipo I ed aumenta la proliferazione dei macrofagi dopo 3 e 7 giorni dall'iniezione. Questo studio però non misura la proliferazione nelle prime 48 ore e perciò non è possibile confrontarlo direttamente con il lavoro svolto da Woodall et al. <sup>150</sup>

Mishra e Pavelko <sup>158</sup> furono i primi a descrivere l'utilizzo del PRP per pazienti considerati chirurgici a causa di una grave tendinosi cronica del gomito. Tutti questi pazienti non avevano risposto al trattamento conservativo convenzionale. Partendo da questo potenziale, con l'utilizzo di PRP inattivata e tamponata, gli Autori hanno osservato un miglioramento del 60% nel punteggio del dolore

contro il solo 16% nei pazienti del gruppo di controllo dopo 8 settimane di trattamento. Nonostante questo primo studio fosse relativamente esiguo e non randomizzato, al follow-up finale, dopo circa 25 mesi, i pazienti trattati con il PRP mostravano per più del 90% una riduzione del dolore rispetto al punteggio pre-trattamento ed inoltre il 93% era completamente soddisfatto<sup>159</sup>.



**Figura 9:** RM esemplificativa di un tendine d'Achille prima (A) e 4 mesi (B) dopo trattamento con PRP. (A): rottura parziale del tendine d'Achille (freccie); (B): guarigione della rottura parziale. [da Mishra et al.: *Treatment of tendon and muscle using PRP*<sup>160,161</sup>]

de Mos et al. hanno dimostrato che l'utilizzo in vivo del PRP nelle lesioni tendinee sembra accelerare l'area di demarcazione catabolica della matrice tendinea oltre a promuovere l'angiogenesi e la formazione del callo fibrovascolare<sup>154</sup>.

Sanchez, Anitua et al. hanno documentato una ripresa più rapida negli atleti con lesione del tendine d'Achille trattata con PRP. Nel studio atleti trattati chirurgicamente e con PRP sono stati messi a confronto con un gruppo di



controllo retrospettivo di atleti trattati con la sola chirurgia. I pazienti sottoposti al PRP recuperavano prima il range di movimenti, non avevano complicanze della ferita e tornavano ad allenarsi prima rispetto al gruppo di controllo. Inoltre l'area di sezione trasversa dei pazienti trattati con il PRP, misurata con gli ultrasuoni, era minore rispetto al controllo<sup>162</sup>.

Recentemente Randelli et al. hanno documentato uno studio condotto su pazienti con lesione della cuffia dei rotatori trattata artroscopicamente con il PRP. Questi Autori hanno osservato non solo che tale tecnica risultava sicura e scevra da ogni complicanza ma anche che tutti i pazienti recuperavano completamente il range di movimento in solo un mese dopo il trattamento<sup>163</sup>.

Tuttavia, in uno studio condotto su 54 pazienti randomizzati di età compresa tra 18 e 70 anni con tendinopatia cronica da 2 a 7 cm sopra l'inserzione del tendine d'Achille, de Vos et al. hanno dimostrato che l'iniezione del PRP confrontata con quella di soluzione salina non comportava un maggior miglioramento del dolore e del movimento<sup>164</sup>. Secondo lo stesso Autore esiste una forte evidenza contraria all'utilizzo di iniezioni di sangue intero autologo.

Egli afferma inoltre di non aver trovato studi di elevata qualità sul trattamento con il PRP e sostiene l'esistenza di scarse prove a sostegno dell'utilizzo delle iniezioni del PRP per la gestione della tendinopatia cronica. In uno studio randomizzato condotto su 30 pazienti con rottura del tendine d'Achille, Schepull, Aspemberg et al.<sup>165</sup> hanno osservato che, dopo controlli effettuati alla 7<sup>a</sup>, 19<sup>a</sup> e 52<sup>a</sup> settimana dopo l'iniezione del PRP, non erano presenti differenze tra il gruppo con il PRP ed il gruppo di controllo per quanto riguardava le proprietà meccaniche, la tensione, l'area trasversa e l'elasticità. Da questi risultati si conclude che il PRP rappresenta un'alternativa alla chirurgia in quanto promuove una guarigione sicura e fisiologica.

## STUDIO SPERIMENTALE

### IL PLATELET RICH PLASMA MATRIX (PRFM) NELLE LESIONI SUBTOTALI DEL TENDINE D'ACHILLE: STUDIO IN VITRO ED EX VIVO SU ANIMALE

#### 5.7- OBIETTIVI E DISEGNO DELLO STUDIO

Scopo del presente studio è quello di verificare alcuni aspetti biologici e biochimici del pool di fattori di crescita contenuti nel PRP o meglio nel suo derivato e di un suo derivato, il Platelet Rich Fibrin Matrix (PRFM).

Lo studio è composto da una parte in vitro che procede contemporaneamente ad una parte in vivo su animale sperimentale.

Nello studio in vitro l'obiettivo è stato quello di verificare attraverso la metodica del Liquid Chip la presenza di alcuni dei fattori di crescita del PRFM, ed analizzarli in un intervallo di tempo dal tempo zero a 7 giorni dall'attivazione con valutazioni intermedie al fine di quantificarne non solo il release finale ma anche le modalità di rilascio nel tempo. Lo studio in vitro su ratto Wistar si è posto invece altri obiettivi quali:

- *L'obiettivo primario* del nostro studio è stato quello di analizzare l'effetto del PRFM sulle lesioni subtotali del tendine d'Achille nell'animale da esperimento in termini di efficacia a breve ed a lungo termine.
- *L'obiettivo secondario* riguarda la sua sicurezza, valutata ricercando la presenza di metaplasia, calcificazioni od ossificazioni nel contesto del tendine, ipoteticamente causata dalla concentrazione dei GFs del PRFM.

## 5.8- MATERIALI E METODI

- **PRP E PRFM: Aspetti generali.**

Diversi GFs ricoprono un ruolo fondamentale nell'accelerare il processo di riparazione tendinea, rendendolo più veloce e completo.

Numerosi studi documentano il ruolo dei GFs nella rigenerazione del tendine: alcuni in particolare, come il b-FGF, IGF-1, il VEGF ed il PDGF, sono stati capaci di potenziare la guarigione tendinea.

Come precedentemente descritto, il PRP è un derivato del sangue autologo, definito tipicamente come volume di plasma con una concentrazione di piastrine 5 volte maggiore (approssimativamente 1000000/microlitro) rispetto ai livelli fisiologici. Può essere preparato in differenti forme, da liquido a gel. Tuttavia, riguardo le sue applicazioni in Chirurgia Ortopedica, sembra chiaro che il chirurgo necessiti spesso di un materiale solido e malleabile da porre nel sito della lesione e non di un liquido che comporterebbe un'alta eluzione subito dopo l'operazione.

Nella pratica medica, il PRP viene realizzato da una quantità prestabilita di sangue periferico, tipicamente <15 mL. Il sangue viene sottoposto ad una prima centrifugazione effettuare la separazione tra la componente cellulata ed ottenere il PRP sotto forma di sovranatante. Quest'ultimo viene in seguito posto in una provetta con Calcio-Cloruro e centrifugato nuovamente per creare il PRFM, una matrice di fibrina densa e con caratteristiche solide tali da renderla suturabile. Essa è ancora formata da piastrine non attivate. Il PRFM rilascerà in seguito un gruppo di GFs noti (IGF-1, EGF, b-FGF, PDGF-A e B, TGF- $\beta$ 1 e VEGF) ritenuti dei determinanti ed enhancer della riparazione tendinea. Il rilascio dei GFs tramite il PRFM è prolungato, anche se non è ad oggi chiaro quanto a lungo il rilascio avvenga attraverso la forma in matrice. Sono inoltre presenti studi che documentano un ridotto tasso di infezioni ed un potenziamento dell'analgesia dopo la somministrazione di PRP. Esistono diverse metodiche di preparazione del PRP: alcune si basano sull'attivazione

della coagulazione per far degranulare le piastrine utilizzando la trombina esogena. In questo caso non c'è un rilascio prolungato dei fattori di crescita. Noi invece abbiamo preferito utilizzare il PRFM, una matrice di fibrina nella quale risiedono le piastrine non degranulate, in grado quindi di rilasciare gradatamente nel tempo i GFs.

Nello studio sperimentale si è scelta la forma del “Platelet Rich Fibrin Matrix” (PRFM) invece del PRP ritenendo che questa sia più utile agli scopi sia dello studio in vitro che dello studio su animale.

- **Processo di preparazione.**

Il PRFM è stato preparato utilizzando il Cascade Medical Enterprises 2 tube kit (Cascade Medical Enterprises, Wayne, NJ). Il sangue necessario alla sua preparazione è stato ottenuto attraverso una puntura intracardiaca praticata su tre ratti utilizzando una siringa da 10 mL (Figura I).



*Figura I: Puntura intracardiaca per prelievo di sangue arterioso.*

Seguendo gli step della tecnica di preparazione così come fornite dal produttore il sangue raccolto è stato addizionato a CPD (citrato-fosfato-destrosio) in rapporto 1 mL / 5 mL.

Quanto il campione è stato centrifugato nella prima provetta per la separazione a 1100 x g per 6 minuti, allo scopo di separare il PRP dai globuli bianchi e rossi. Il sovranatante è stato infine trasferito in una seconda provetta, contenente calcio coluro, e centrifugato a 1450 × g rpm per 15 minuti.

Il risultato è il PRFM, una matrice densa. Una volta attivata, la matrice può essere utilizzata subito dopo oppure conservata al freddo a 4° C per quasi 24 ore. Come soluzione di controllo, in accordo con Virchenko e Aspenberg, è stata utilizzata una parte di CPD in 9 parti di soluzione salina 0,9%<sup>155</sup>.

- **Analisi dei fattori di crescita e modalità di rilascio nel PRFM.**

Una aliquota del PRFM realizzato dai ratti sacrificati di 2ml è stato impiegato per eseguire una analisi quantitativa e qualitativa mediante LIQUID CHIP (Luminex – Austin TX). Sono stati valutati attraverso il sistema i seguenti fattori di crescita, i cui anticorpi sono disponibili per ratto Wistar: TGF-beta, IL-1a, IL-1b, IL-6, TNF-alpha, bNGF, IFN-gamma, VEGF-A, sV-CAM. In ogni well sono state posizionate delle diluizioni di PRFM 1:10. Si è verificato il rilascio nel tempo dei fattori di crescita nel PBS, partendo dalla concentrazione in PRP a t0, poi il rilascio nel mezzo alcalino a t1 (1 ora), t6 (6 ore) t24 (24 ore) t48 (48 ore) t96 (96 ore) e valutazione finale del PRP a 7 giorni, sia del totale rilasciato che del quantitativo residuo nella matrice.

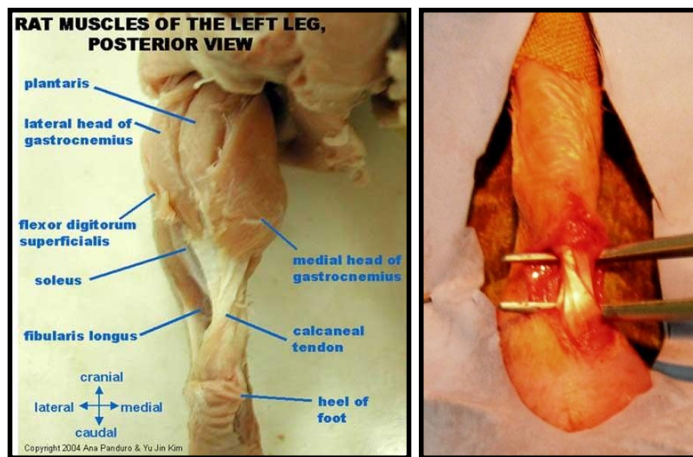
- **Esperimento in vivo.**

Per questo studio sono stati utilizzati 30 ratti Wistar maschi (Figura II) con 450- 500 gr di peso corporeo. Essi sono stati operati e stabulati al “*Experimental Animal Models For Aging Units Research Department, I.N.R.C.A./I.R.R.C.S.*” di Ancona.



**Figura II:** *Ratto Wistar.*

I metodi e le procedure da loro utilizzate nonché la manutenzione erano in accordo con quelle elencate nella direttiva n°86/609/CEE riguardante la cura degli animali ed il loro utilizzo sperimentale. Il Comitato Etico INRCA ha approvato questo studio sperimentale (n° 1 rif CI/11). I ratti sono stati sottoposti all’operazione bilateralmente nella stessa seduta: la lesione sperimentale consisteva in una sezione trasversa di 2/3, in modo da lasciare integro il fascio più profondo dei tre che compongono il tendine d’Achille (Figura III).



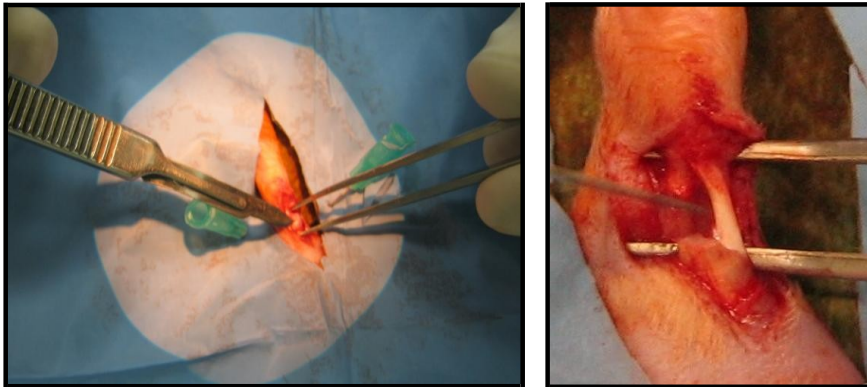
**A B**

**Figura III:** Tendine d'Achille di ratto post-mortem (A) ed in vivo (B).

Ogni ratto ha ricevuto i due trattamenti scelti in modo randomizzato: un tendine è stato trattato con la PRFM mentre il controlaterale con una soluzione inerte di controllo.

- **Tecnica Chirurgica e Preparazione del Campione.**

I ratti Wistar sono stati anestetizzati con un'iniezione intramuscolare di ketamina (40 mg/kg) e xilazina (5 mg/kg) e posizionati proni su un cuscinetto riscaldato (38,5° C). Durante la procedura il campo è stato mantenuto sterile. Dopo aver rasato completamente entrambe le zampe posteriori dell'animale, sono state praticate incisioni cutanee bilaterali di 2,5 cm di lunghezza (2 per animale) in posizione paramediana. Una volta effettuato l'accesso chirurgico mediale para-achilleo, è stato inciso il paratenon e sono stati sezionati i due fascicoli più anteriori dei tre del tendine d'Achille (Figura IV), con l'ausilio di microscopia ottica per migliorare la visione del campo chirurgico.



*Figura IV: Accesso chirurgico e sezione dei due fascicoli più anteriori del tendine d'Achille.*

Nel lato trattato, scelto in modo randomizzato, la lesione parziale con il PRFM (Figura V). Per il lato di controllo controlaterale invece, la lesione è stata trattata con la soluzione salina. La quantità di PRFM da inoculare è stata precedentemente standardizzata con una pipetta: la dose di impiantata era quantificata in 0,5 mL.

La scelta di eseguire la lesione subtotale del tendine perché molte lesioni del tendine d'Achille nell'uomo sono incomplete e perché in questo modo si è ipotizzata una continuità anatomica che potesse in qualche modo guidare il processo riparativo del difetto sperimentale.

Una volta inserito il PRFM all'interno della lesione sperimentale, il paratenonio è stato suturato accuratamente con punti di sutura riassorbibili e la cute suturata con fili di nylon 4:0 (Figura VI).





**Figura V:** *Posizionamento del PRFM all'interno della lacuna creata.*



**Figura VI:** *Cute suturata con fili di nylon 4:0.*

La scelta del lato delle lesioni per il trattamento e per il controllo è stata randomizzata.



**Figura VII:** *Procedura eseguita bilateralmente.*

Dopo la procedura agli animali è stata praticata una profilassi antibiotica ed una medicazione della ferita ogni due giorni. Essi sono stati nutriti con acqua ad libitum. Per ridurre il dolore nella sede di lesione, è stato somministrato un analgesico dalla prima settimana dopo l'intervento.

Ai controlli effettuati a 40 e a 60 giorni dopo l'intervento, gruppi di 10 ratti selezionati a caso sono stati sacrificati in un camera con CO<sub>2</sub>. Abbiamo scelto questi target temporali poiché gli eventi biologici presenti nel periodo precedente sono stati già descritti in letteratura<sup>155,156</sup>. I tendini d'Achille del trattamento del controllo sono stati prelevati, facendo attenzione a rimuovere sia la giunzione miotendinea che quella osteotendinea sulla tuberosità calcaneare.

- **Analisi Istologica.**

Una volta prelevati, i campioni di tendine sono stati immediatamente fissati in formaldeide al 4%, formalina neutra, decalcificati in acido formico 4N e sodio citrato, quindi inclusi in paraffina e sezionati. Le sezioni istologiche avevano uno spessore di 4-6  $\mu\text{m}$ . Sono state analizzate con

Ematossilina-Eosina e Fuxina Paraldeide di Gomori controcolorata con la soluzione di Halmi. E' stata inoltre eseguita un'analisi istomorfometrica mediante Leica Quantimet System ed una valutazione immunistochemica (M-caderina, CD34, V-CAM1).

- **Analisi Statistica.**

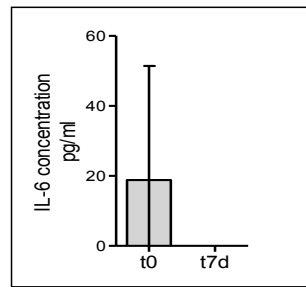
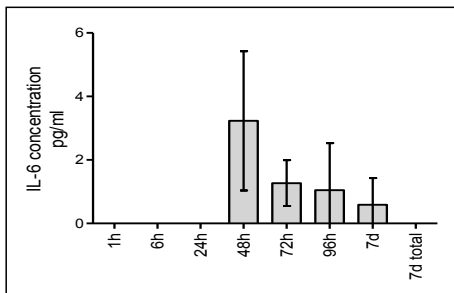
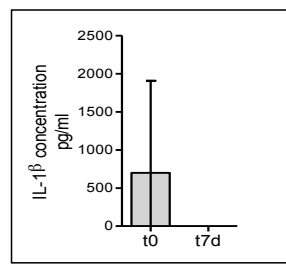
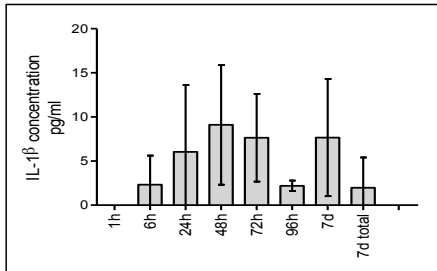
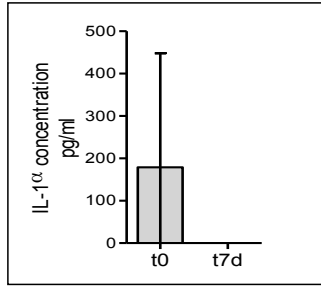
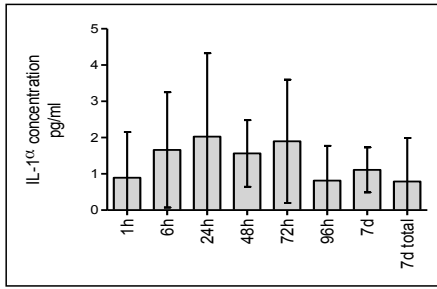
L'analisi statistica è stata eseguita tramite il Wilcoxon test non parametrico, considerando come valore significativo  $p \leq 0,05$ .

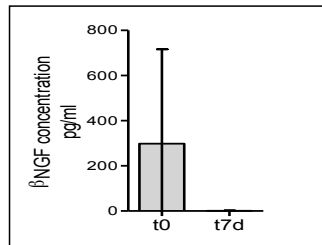
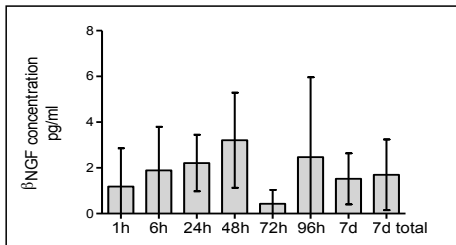
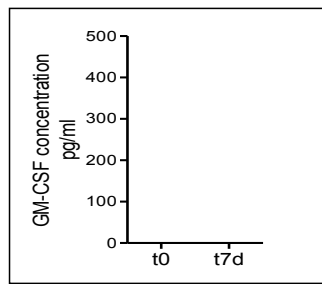
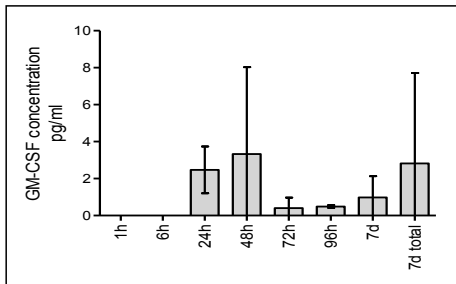
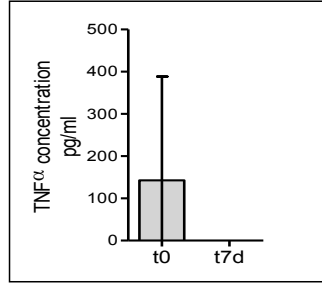
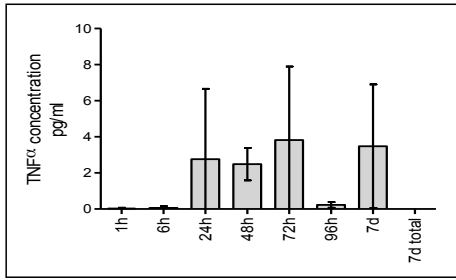
## **5.9- RISULTATI**

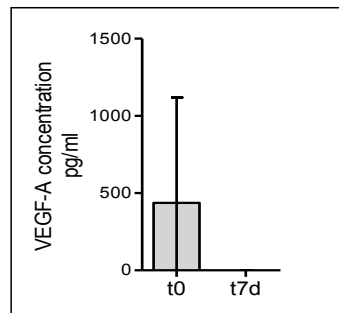
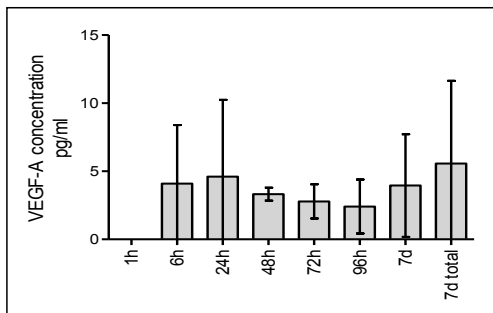
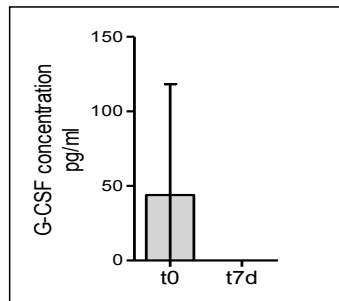
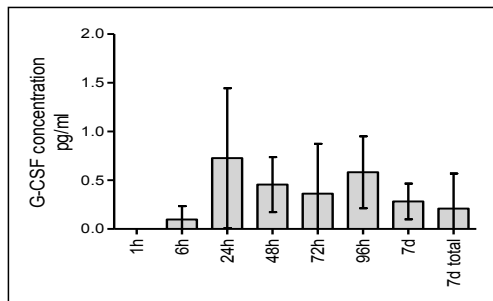
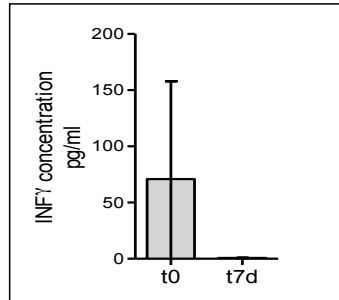
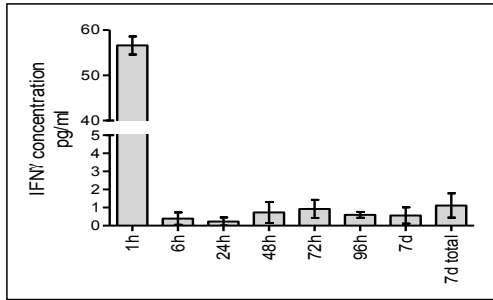
- **Risultati dell'analisi quali- quantitativa dei fattori di crescita in PRFM e rilascio nel tempo.**

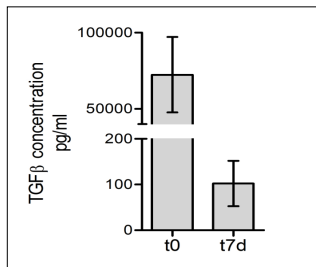
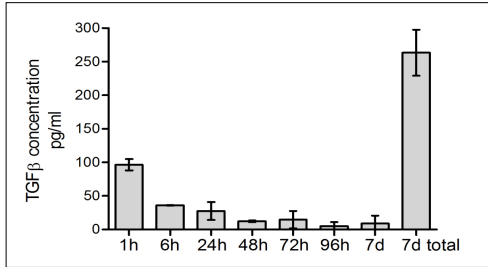
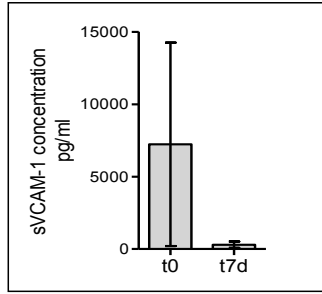
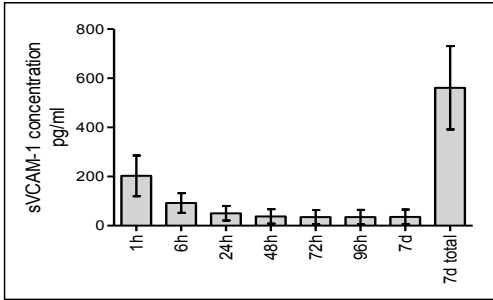
Con la strumentazione a disposizione è stato possibile quantificare solo alcuni dei fattori di crescita in dipendenza della disponibilità degli anticorpi specifici per l'animale da esperimento. La lettura delle diluizioni mostra la presenza di tutti i fattori di crescita eccetto il GM-CSF che risulta assente nel PRFM al t0 come pure al t7. Negli altri casi si verifica invece una presenza di fattori che alla rivalutazione a 7 giorni appaiono assenti, in quanto completamente rilasciati dalla matrice-veicolo.

I dati sono riportati per praticità interpretativa nelle seguenti tabelle. Nel link (*versione d tesi digitale*), è possibile direttamente verificare i dati sorgente e le tabelle con i valori relativi ai singoli fattori analizzati.







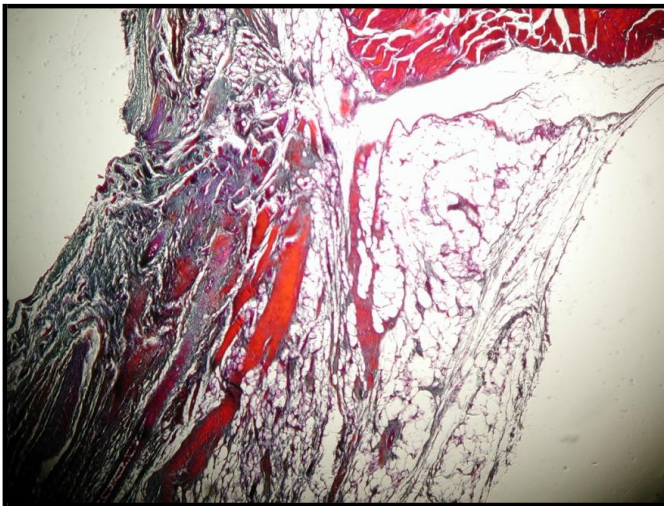


- **Risultati dello studio su animale**

Nessuno degli animali sottoposti a trattamento chirurgico è deceduto durante il trattamento. I ratti trattati hanno iniziato il movimento libero nelle loro gabbie mediamente 5 giorni prima dei controlli.

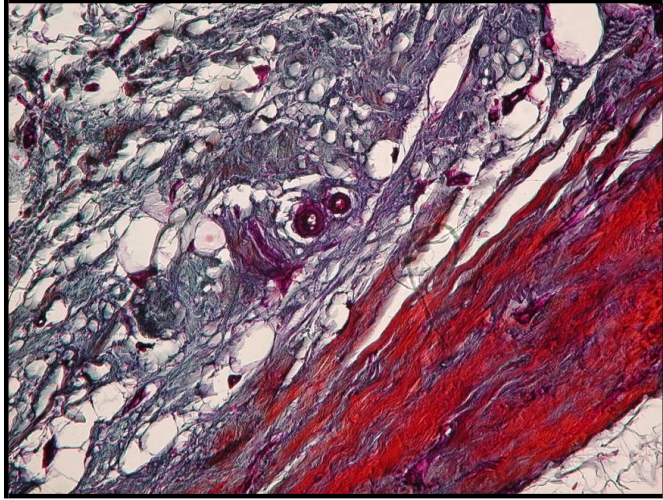
All'esame microscopico condotto a 40 ed a 60 giorni, sia negli animali trattati che nei non trattati, non sono state osservate aree di metaplasia, calcificazioni, ossificazioni o infiltrazione linfoplasmacellulare nel contesto del tendine, mentre contemporaneamente si è osservata una importante neoangiogenesi. Quest'ultima, maggiormente nei trattati rispetto ai controlli, è stata osservata costantemente in tutti i campioni a 40 ed a 60 giorni.

Dall'analisi microscopica ed istomorfometrica dei campioni si è osservata una maggiore proliferazione collagenica dei tenociti nei trattati a 40 giorni rispetto ai controlli. Inoltre si è cominciato ad osservare un orientamento delle fibre di collagene che ricorda la struttura tendinea (Figure VIII, IX, X, XI).

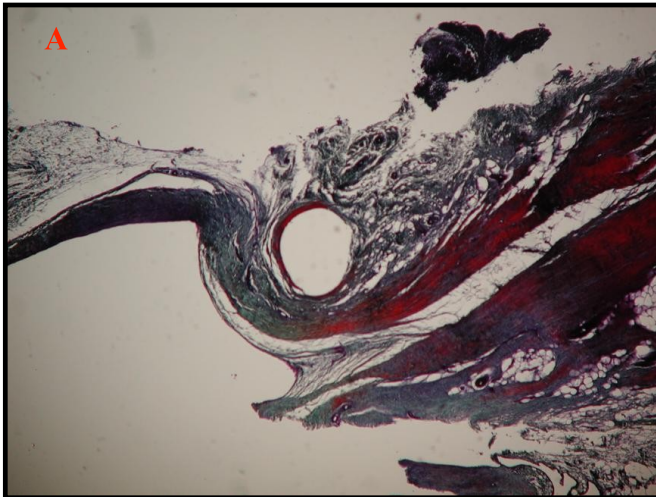


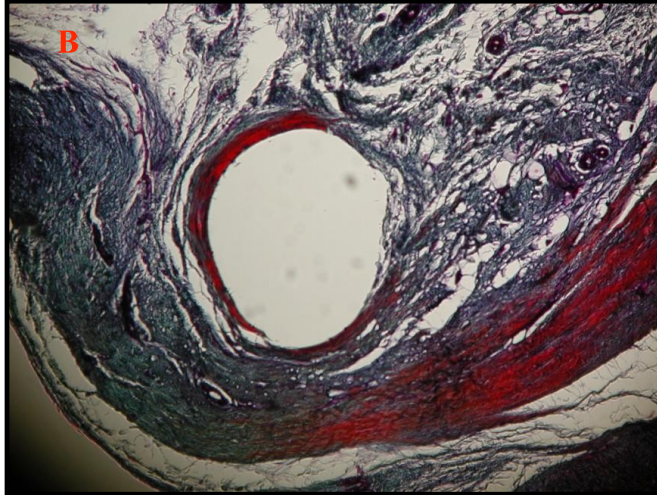
*Figura VIII: Tendine trattato con PRP a 40 giorni. Notare l'aumentata proliferazione dei tenociti.*



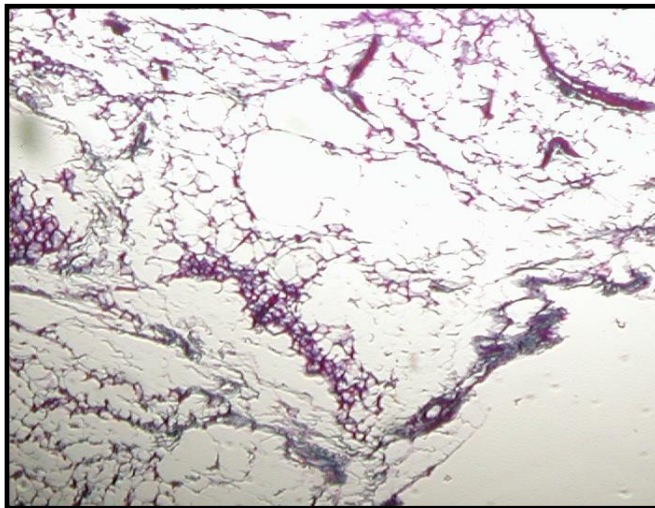


*Figura IX: Tendine trattato con PRP a 40 giorni. Notare l'orientamento delle fibre collagene che ricorda la struttura tendinea.*



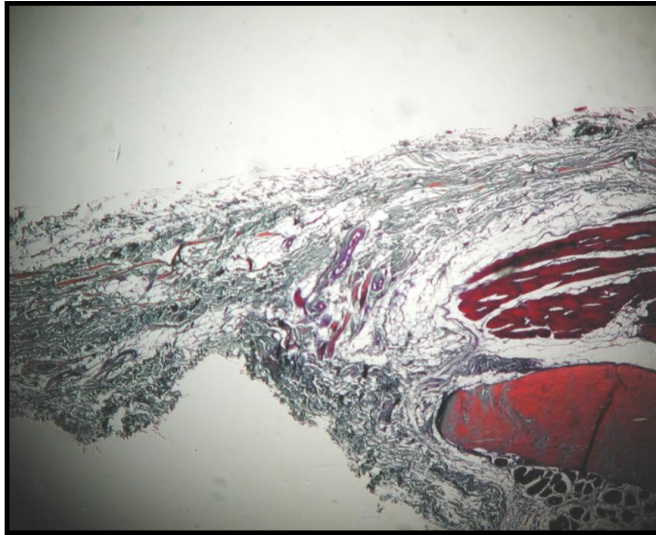


*Figura X: Tendine trattato con PRP a 40 giorni. Foro determinato dal filo di sutura (A) e suo ingrandimento (B) attorno al quale si può notare la neoformazione di tessuto tendineo.*

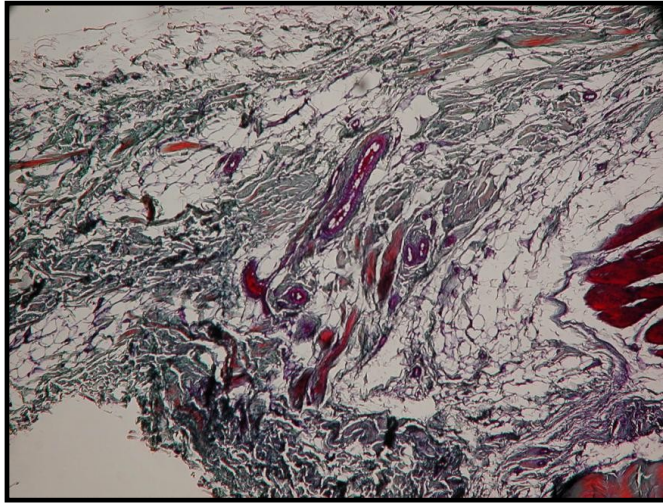


*Figura XI: Controllo a 40 giorni. Notare la disposizione meno organizzata del tessuto connettivo.*

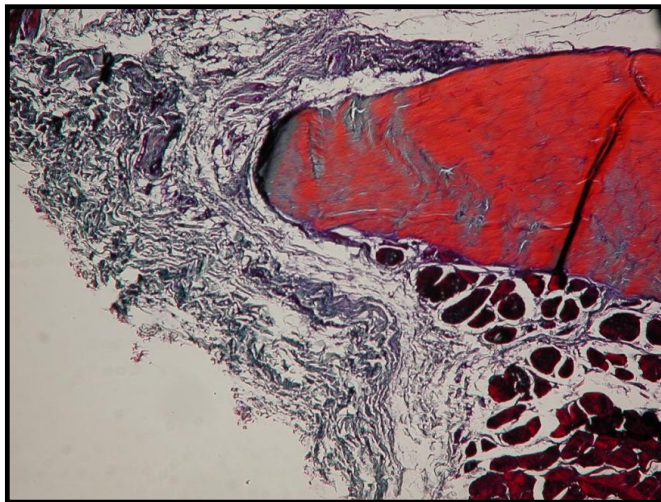
A 60 giorni è stato osservato un ulteriore incremento della densità delle fibre collagene come pure dell'orientamento delle stesse rispetto ai controlli, dove invece si osserva un pattern molto simile a quello osservato a 40 giorni (Figure XII, XIII, XIV, XV).



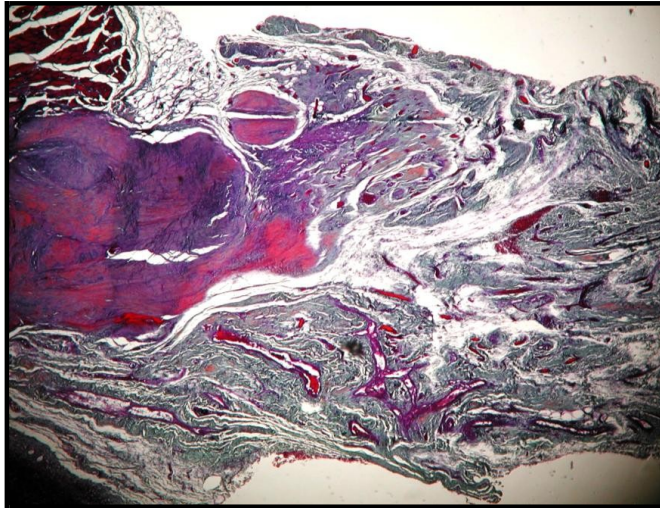
*Figura XII A: Tendine trattato con PRP a 60 giorni. Notare la formazione di tessuto di riparazione ed una discreta vascolarizzazione.*



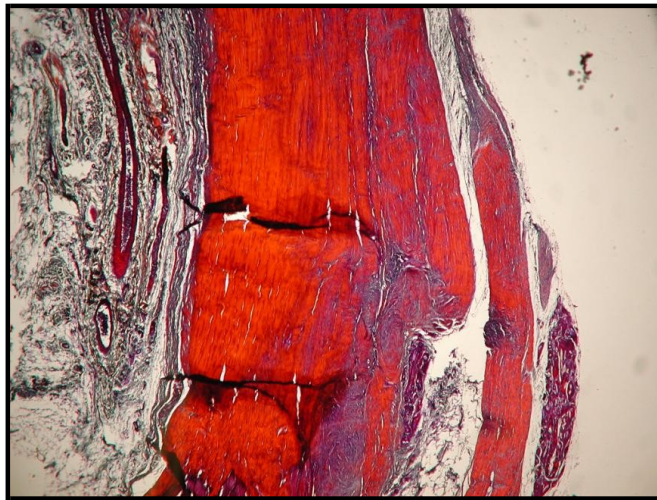
*Figura XII B: Tendine trattato con PRP a 60 giorni. Notare la discreta vascolarizzazione.*



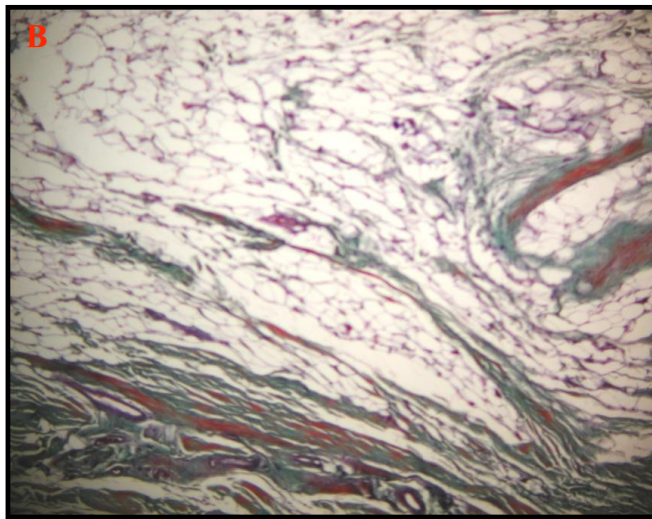
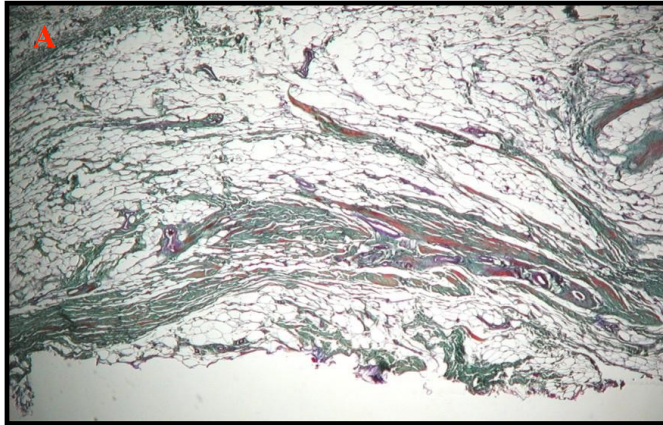
*Figura XII C: Tendine trattato con PRP a 60 giorni. Notare il connettivo fibroso denso sotto il moncone tagliato.*



*Figura XIII: Tendine trattato con PRP a 60 giorni.*



*Figura XIV: Tendine trattato con PRP dopo 60 giorni. Notare il tendine nativo (rosso mattone) affiancato al tessuto connettivo neoformato fortemente vascolarizzato (a sinistra).*



*Figura XV: Controllo a 60 giorni. Notare il connettivo fibroso denso contenente minore componente vascolare con una trama meno orientata (A), e dettaglio suo ingrandimento (B).*

## 5.10- DISCUSSIONE

Il Platelet Rich Plasma, è un concentrato di fattori di crescita ottenuto dalle piastrine. Esso può essere ricavato attraverso la centrifugazione di pochi millilitri di sangue. Il buffy coat, dopo una prima centrifugazione, viene centrifugato una seconda volta e viene così separato in plasma povero in piastrine (PPP) e plasma ricco in piastrine (PRP). Quest'ultimo viene attivato con trombina o CaCl e ciò permette il rilascio di diversi fattori di crescita dai granuli  $\alpha$ . Questo prodotto sta trovando ormai da alcuni anni un impiego nella pratica ambulatoriale ortopedica nel trattamento di lesioni dei tessuti molli. La letteratura in materia è però piuttosto controversa: dopo un iniziale periodo di entusiasmo fondato sulle aspettative degli studi preclinici, studi successivi in vivo hanno mostrato quanto in realtà siano poche le conoscenze biologiche e biochimiche.

La debolezza degli studi in materia è stato proprio la difficoltà di comprendere come il mix di fattori di crescita potessero determinare nel citotipo interessato fenomeni proliferativi e attivazione di quelle vie extracellulari di che sono alla base dei processi riparativi/ rigenerativi come la tenogenesi riparativa nel nostro caso. Dunque in abbinamento allo studio in vivo, per rilevare dal punto di vista istologico ed istomorfometrico la possibile rigenerazione tissutale, lo studio in vitro sulla quantificazione e il release dei fattori di crescita contenuti nel concentrato, preparato in forma di matrice solida ovvero il PRFM, ha consentito effettivamente di capire la composizione di fattori con quale dinamica questi avrebbero agito sul tendine.

Non tutti i fattori di crescita sono stati valutati, per indisponibilità di kit commerciali di anticorpi specifici per il nostro modello sperimentale.

Si è comunque identificata la gran liberazione di fattori come il TGF beta ed il TNF alfa come pure il VEGF, mentre altri erano meno

rappresentati. Ciò spiega i fenomeni di neoangiogenesi, fibrosi ed infiammazione iniziale.

Contestualmente si è potuto confermare che a 7 giorni tutti i fattori di crescita non sono più presenti né rilasciati dalla matrice fibrinica e che dunque il PRFM ha una funzione di attivatore o enhancer di un processo fisiologico di riparazione, ma non ha una funzione di costante stimolazione perché da un lato il rilascio nel breve termine e dall'altra la relativa emivita dei GFs non possono sostenere tutto il processo riparativo del tessuto.

Invece, lo scopo primario dello studio su animale è stato finalizzato a dimostrare la sicurezza e l'efficacia del PRFM nelle lesioni subtotali del tendine d'Achille rispetto al placebo, a 40 ed a 60 giorni dall'intervento. Rispetto al modello sperimentale di Aspemberg et al.<sup>155,156</sup> che prevedeva una lesione totale, abbiamo optato per una lesione subtotale per i seguenti motivi:

1. numerose lesioni tendinee nell'uomo sono subtotali;
2. la presenza di una parte di tendine sana consente un movimento maggiore all'animale e crea una guida per la neoapposizione di connettivo;
3. si ha la possibilità di osservare affiancati l'uno all'altro il tendine nativo ed il connettivo neoformato.

I risultati di questo studio sperimentale hanno consentito di confermare la **sicurezza del PRP** in quanto sono state escluse aree di infiammazione, necrosi, metaplasia, ossificazione e calcificazione. Per quanto attiene **all'efficacia del PRP** nel trattamento delle lesioni subtotali tendinee, possiamo ipotizzare la presenza di una **funzione analgesica** (ripresa precoce del movimento dei trattati rispetto ai controlli). Abbiamo inoltre osservato la capacità di indurre una **maggiore chemiotassi** e di guidare la **neoangiogenesi**.



L'effetto riscontrato a 40 giorni è verosimilmente dovuto all'emivita dei fattori di crescita, che esprimono la massima capacità proliferativa e di sintesi proteica nei primi 15 - 20 giorni dopo l'applicazione. E' stato inoltre osservato un **incremento della sintesi di collagene**, soprattutto a 60 giorni, con una tendenza ad un riorientamento lungo i vettori di trazione. Tuttavia non possiamo affermare che il PRP abbia una funzione rigenerativa di fronte alla perdita di un tratto di tendine. Studi sperimentali svolti da Virchenko Aspemberg riportano un incremento a 30 giorni della resistenza meccanica alla trazione del tendine trattato con PRP<sup>156</sup>. Tuttavia questa maggiore resistenza meccanica corrisponde verosimilmente, dal punto di vista istologico, alla formazione di un tessuto tendineo o di un semplice tessuto cicatriziale.

# CAPITOLO 6

## ELASTOSONOGRAFIA

### 6.1- La palpazione come base dell'elastosonografia.

**L**a stima della consistenza dei tessuti molli è forse uno dei più antichi e fondamentali strumenti diagnostici disponibili in Medicina. Fonti storiche accertate rimandano ai medici egiziani già nell'2000 a. C. le prime basi di semeiotica clinica, presso i quali la "palpazione" dei tessuti molli era ampiamente descritta. Lo stesso Ippocrate, nel 400 a. C. riferiva: *"...le tumefazioni che sono soffici alla palpazione, indolori e spostabili ...sono meno nocive di altre... mentre quelle dolorose, dure voluminose indicano un pericolo e portano a morte imminente; ...ma quelle che sono soffici, poco indolori e spostabili sono altresì indice di patologia cronica"*.

Il principio di base della palpazione è di facile intuizione: una parte anatomica, per essere "palpabile" e ben definita deve possedere una consistenza differente dalle parti circostanti.

La fisiologia della palpazione si esplica nel modo seguente<sup>166</sup>: il dito applica una pressione su una superficie di tessuto e di contrasto il tessuto esaminato esercita una forza sul dito esaminatore attivando i meccanicocettori intercalati nei tessuti di rivestimento cutaneo, inviando segnali al sistema nervoso centrale in grado di distinguere con grande precisione le caratteristiche tissutali, distinguendo non solo grossolanamente il duro dal morbido, ma anche identificando eventuali anomalie del tessuto.

In Ortopedia, la palpazione in ortopedia è uno strumento ancora fondamentale, ed in particolare nella patologia dei tessuti molli, dal momento che l'imaging convenzionale come l'ultrasonografia, la risonanza magnetica e la tomografia computerizzata evidenziano caratteristiche strutturali non sempre di univoca interpretazione. D'altra parte la palpazione è un metodo operatore-dipendente nonché è legato alla estemporaneità dell'esame condotto.

## 6.2 - Principi Generali

La palpazione è ancora oggi lo strumento più semplice apprezzare la qualità di un tessuto ed è probabilmente lo strumento più affidabile nonostante le numerose tecnologie siano di aiuto nel processo diagnostico.

Tuttavia è indiscutibile che la palpazione sia un metodo soggettivo e correlato al momento dell'esame clinico, dunque afflitto da una discreta variabilità intra ed inter-osservatore.

La ultrasonografia convenzionale (US) detta anche B-Mode, è ad oggi l'indagine di primo livello nel trauma tendineo e si caratterizza per convertire un segnale in una immagine bi-dimensionale, fornendo all'esaminatore una informazione di tipo morfologico e strutturale del tessuto esaminato. Il limite di questo strumento è la scarsità di informazioni dal punto di vista biomeccanico ed anatomo-patologico.

A tal proposito, per via del sempre maggior interesse verso la valutazione delle proprietà elastiche dei tessuti, analizzando gli impulsi di radiofrequenza provenienti da una struttura in risposta ad una compressione esterna, ha avvicinato sempre di più il mondo dell'Ortopedia e dell'Imaging Ortopedico verso l'elastosonografia o sono-elastografia (*RTSE: real time sonoelastography*). In continuo perfezionamento nel corso degli ultimi venti anni, l'elastosonografia, detta anche Realtime Sonoelastography (RTSE) ha riscosso interesse soprattutto nello studio, del tessuto miocardico

<sup>167</sup>, delle strutture vascolari<sup>168,169</sup>, della fibrosi epatica<sup>170</sup>, della tiroide<sup>171,172</sup> e della mammella<sup>173,174</sup>: il “comportamento elastosonografico” di questi tessuti molli varia in presenza di lesioni “benigne” o “maligne”. Brevemente, in presenza di lesioni benigne la massa ha una struttura elastosonografica “morbida”(Soft) mentre se la massa ha caratteristiche maligne, la struttura in elastosonografia risulterà tipicamente più “dura” (Hard). L’elastosonografia è attraente agli occhi del radiologo ma anche e soprattutto dell’ortopedico che si occupa di patologia dei tessuti molli e dei traumi sportivi per la sua non invasività e maggior quantità di informazioni fornite ma anche per la possibilità di un impiego ambulatoriale abbastanza rapido.

Andando in dettaglio, si riconoscono più correttamente oggi 3 diverse tipologie di imaging elasto-sonografico:

- 1) *l’elastografia che registra i movimenti durante delle compressioni dell’operatore per stimare lo “strain”*
- 2) *La sono-elastografia che utilizza il doppler per generare una immagine di tessuto in movimento sotto la pressione esterna*
- 3) *La registrazione di onde di taglio (senza pressione esterna) propagate nel tessuto per ricavare il modulo di elasticità<sup>175</sup>.*

Le prime due sono affette da limitazioni intrinseche come l’essere operatore-dipendente, laddove l’errore dipende dall’intensità di compressione prodotta dalla mano e dalla sonda nello svolgimento dell’esame. La terza modalità, relativamente più recente, sembra essere esente da questo bias in quanto vengono analizzate onde di taglio senza che l’operatore vada ad esercitare una particolare pressione di superficie.

Quando una regione di tessuto uniforme contiene una zona a differente consistenza, quest’ultima altera l’ampiezza dei picchi delle vibrazioni restituite alla sonda. La tecnica doppler è impiegata per stimare l’ampiezza della vibrazione e la fase all’interno di una “Region of Interest” (ROI), ovvero un’area che definisce la parte di tessuto da indagare.

Krouskop et al.<sup>176</sup> furono i primi ad impiegare le vibrazioni per indurre e rilevare modifiche (dunque l'elasticità) di un tessuto molle: scopo del loro studio era la determinazione non-invasiva del modulo di elasticità (Modulo di Young), sebbene il loro metodo non prevedesse in quel momento una applicazione nell'imaging.

Lerner et al.<sup>177</sup>, invece, attraverso l'uso di compressioni a bassa frequenza applicate dall'esterno intuì l'utilità di misurare l'ampiezza della vibrazione come un'informazione convertibile in immagine.

Le prime indicazioni ad un uso clinico della elastosonografia si riconducono invece ad Ophir<sup>178</sup> e Pesavento<sup>179</sup> i quali descrissero per primi gli "step" operativi come metodo di imaging.

L'indagine elastosonografica, nella procedura comune, effettua l'esame di tipo convenzionale (B-Mode) contestualmente alla analisi di elasticità delle strutture indagate. Si determina un'immagine ottenuta del segnale US nativo (radiofrequenze, RF). Il segnale RF è rappresentato dal segnale di ritorno "nativo" proveniente dai tessuti insonanti e viene denominato "nativo" poiché non risulta essere sottoposto a filtri realizzati a seguito dell'acquisizione del segnale.

La normale indagine ecografica in B-Mode sfrutta meno del 15% delle informazioni contenute nel RF nativo, mentre la elastosonografia sembra essere in grado di acquisire maggiori informazioni dal segnale.

Il segnale elastosonografico viene fornito da una leggera compressione-vibrazione data al trasduttore dall'operatore, attraverso un movimento omogeneo e con la sonda mantenuta perpendicolare rispetto alle strutture da esaminare. Questa metodica, presenta altri vantaggi rispetto alla B-Mode tradizionale, in particolare quello di poter visualizzare perfettamente, grazie alla scala cromatica, le strutture isoecogene che spesso sfuggono all'attenzione dell'operatore e quello di non subire ostacoli da coni d'ombra come calcificazioni, ossificazioni o corpi estranei (fili di sutura).

Le potenzialità di questa metodica nel discriminare il grado di “stiffness” (rigidità=elasticità) sono in funzione della legge di Hooke che sostiene che “...l’elasticità è data dalla proprietà di un materiale di deformarsi e di ritornare alla forma originale al venir meno della forza applicata...”.

L’immagine B-Mode viene implementata da una scala di colori che virano dal Blu=duro al Rosso=Morbido, passando per toni di Verde e di Giallo.

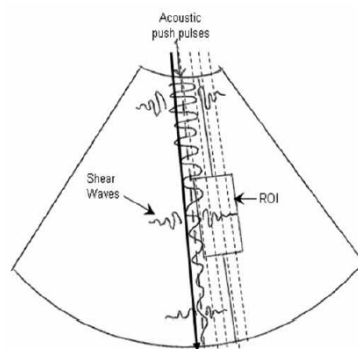
In una prima fase, ci si affidò molto al reperto cromatico, tanto che con alcuni elastosonografi di prima generazione, gli Autori elaborarono delle tipizzazioni tissutali sulla base delle scale di colore.

In elastosonografia si vanno a scegliere 2 *finestre o box* di stessa superficie per effettuare la comparazione tra 2 diversi tessuti, che rappresentano ciò che è altresì definito *Region of Interest (ROI)*. Da ciascuna finestra, il software digitale dell’elastosonografo riesce a calcolare punto-punto la restituzione degli ultrasuoni in base alla deformabilità/elasticità, ovvero lo “*Strain*”. Si ottiene infatti una curva, l’“*elastogramma*”, che ci identifica le caratteristiche della struttura esaminata. Il rapporto “*Strain Index*” A/B, dove A è il dato di “*Strain*” del tessuto di cui vogliamo avere informazioni, B è lo “*strain*” del tessuto di riferimento (tessuto normale o tessuto adiposo), non deve essere erroneamente interpretato come un indice di elasticità/allungamento ma piuttosto di elasticità/microdeformazioni in conseguenza dell’omogeneità strutturale del tessuto esaminato. Si noti che la scelta del tessuto adiposo come denominatore dell’index, ovvero come tessuto di riferimento è diretta conseguenza del suo comportamento elastosonografico, in quanto esso è generalmente costante e omogeneo, “duro” dal punto di vista dello strain.

L’ultima generazione di elastosonografia, fornisce un’imaging basato sulla forza d’impulso delle radiofrequenze (*Acoustic Radiation Force Impulse*, ARFI): una modalità di imaging innovativa dipendente dalla struttura costituzionale del tessuto che fornisce informazioni sulle sue

proprietà elastiche riducendo però il limite della dipendenza dall'operatore e dalla pressione da lui esercitata<sup>170,175,180-182</sup>.

La tecnica ARFI genera onde di taglio attraverso una regione "target" di interesse (Figura 1)<sup>183</sup>, aggiungendo informazioni quantitativamente e qualitativamente complementari all'ecografia tradizionale. La risposta è monitorata dall'ecografia, si basa sulla forza delle radiofrequenze, sulla generazione e propagazione delle "onde di taglio", ed è funzione dei moduli di elasticità di Young<sup>183</sup>. La risposta ci dà informazioni riguardo alle proprietà elastiche del tessuto ed è proporzionale alla rigidità del tessuto<sup>184</sup>. In un tessuto solido, più rigido è il tessuto, più veloce sarà l'onda di taglio.



**Fig.1:** La quantificazione delle caratteristiche tissutali consiste di 3 steps operativi. Il primo prevede la selezione su di un'immagine ecografica tradizionale di un'area di interesse (ROI – Region of interest) di dimensioni definite dall'operatore. Successivamente si trasmette un impulso a radiofrequenza attraverso il tessuto che induce onde di taglio attraverso la regione di interesse. Infine viene riportato un valore numerico proporzionale alla rigidità del tessuto e che esprime la velocità dell'onda sonora (in m/s)

L'imaging basato sull'ARFI, e la sua nuova implementazione definita quantificazione tissutale, permette anche la valutazione dei tessuti profondi

senza la necessità di una compressione esterna<sup>184</sup>. La quantificazione tissutale fornisce valori numerici (misurazioni della velocità dell'onda di taglio, m/s) della rigidità del tessuto in una precisa area anatomica. Tuttavia anche questa metodica, come l'elastasonografia tradizionale, fornisce risultati differenti a seconda dello stato di tensione intrinseca del tessuto esaminato: ciò è ad esempio verificabile nei tessuti molli come tendini e muscoli dove la stessa struttura analizzata in fase di relax ed in fase di contrazione mostrano valori cromatici e di strain differenti<sup>185</sup>.

*Con l'occasione di questa Tesi di Dottorato, a completamento di un percorso di ricerca clinico sperimentale che verrà successivamente riportato, si fornisce una aggiornata review sistematica della letteratura attuale in materia di elastasonografia e patologia tendinea al fine di raggiungere una comprensione più ampia intorno all'argomento. Si informa il lettore che il contenuto della seguente review sarà, con le opportune variazioni, oggetto di futura pubblicazione su riviste internazionali di settore.*

### **6.3 RTSE nella patologia tendinea: review sistematica della letteratura.**

La ricerca è stata condotta seguendo le Preferred Reporting Items for Systematic reviews and MetaAnalyses (PRISMA) guideline<sup>186</sup>. L'obiettivo di questa ricerca è stato quello di verificare le applicazioni della RTSE nei tendini normali ed affetti da patologia acuta o cronica.

#### **6.3.1- Sorgente dello studio e strategia di ricerca.**

Durante il mese di Settembre 2016 è stata effettuata una ricerca sistematica su PubMed, Ovid e la Cochrane Library di articoli di lingua inglese con trattazioni sull'associazione tra RTSE e patologia tendinea nell'uomo.



Le chiavi di ricerca sono state i termini in lingua inglese: *tendinopathy*, *tendinitis*, *tendon*, *Achilles tendon*, *patellar tendon*, *rotator cuff*, *plantar fascia*, *plantar fasciitis*, *epicondyle*, *epicondylitis*, *real time sonoelastography*, *elastography*, *real time elastography* and *sonoelstography*. La strategia di combinazione dei termini è stat la seguente: (((((((((tendinopathy) OR tendinitis) OR tendon) OR achilles tendon) OR patellar tendon) OR rotator cuff) OR plantar fascia) OR epicondyle) OR epicondylitis)) AND (((real time sonoelastography) OR real time elastography) OR sonoelastography) OR elastography).

Federico Fusini 15/1/17 18:38

**Comment [1]:** Ho lasciato la stringa usata pe la ricerca, vedete se è il caso di toglierlo

### 6.3.2.- Selezione degli studi e criteri di Elegibilità

Due ricercatori (A. B. e F.F) hanno svolto una ricerca ed una valutazione indipendente degli articoli. Un Terzo Autore, S.B. è stato chiamato in causa solo in casi di dubbio circa l'esclusione di specifici articoli. Ogni ricercatore ha valutato titolo ed abstract di tutti gli articoli selezionati come rilevanti in accordo ai criteri di inclusione. Anche la Bibliografia di ciascun articolo è stata accuratamente considerata per rintracciare altri articoli originali di interesse. Sono stati esclusi dalla ricerca articoli ripetuti, case report, editoriali, technical notes ed altri articoli di review. Sono stati altresì esclusi articoli non in lingua inglese e studi in vitro/preclinici. Per la valutazione del livello di Evidenza di ogni singolo articolo, è stato impiegato l'Oxford Level of Evidence<sup>187</sup> (LoE). L'Oxford Level of Evidence è uno strumento semplice ed efficace per classificare la forza degli studi valutati.

Federico Fusini 15/1/17 18:40

**Comment [2]:** Abbiamo dciso di usare il LoE come misura delle evidenze, per dare un valore aggiunto alla nostra review. 40 articoli mi sembravano troppi per fare il Coleman

### 6.3.3- Risultati

Trecento undici articoli sono stati identificati dalla ricerca eseguita nei database. Dopo la prima valutazione 189 articoli sono stati selezionati e di questi, in accordo con I criteri di inclusione ed esclusione solo 40 full-text sono stati considerati validi per il nostro proposito. I risultati sono stati

suddivisi in sezioni differenti in accordo ai distretti anatomici. Il diagramma di flusso che descrive la selezione degli articoli è nella fig. 1.

#### **6.3.4- Tendine di Achille Normale**

Ad oggi il Tendine di Achille è il tendine maggiormente studiato con RTSE. Gli Authori hanno inizialmente focalizzato l'attenzione sulla descrizione dei pattern di normalità per poi spostarsi verso le condizioni patologiche e nelle situazioni post-chirurgiche.

#### **6.3.5- Livello di Evidenza**

La ricerca sistematica della letteratura non ha consentito di fornire un livello di evidenza (LoE) elevato nei lavori sperimentali ritrovati.

Nella maggior parte dei casi gli articoli hanno raggiunto un LoE III, anche se qui sono stati riportati articoli con LoE IV. Articoli con LoE V sono stati appunto preliminarmente esclusi. Tabella1

#### **6.3.6- Studi Generali sulle Proprietà biomeccaniche del tendine**

De Zordo et al.<sup>188</sup> ha analizzato 40 volontari (per un totale di 80 tendini). Nella metodologia di indagine i tendini sono stati divisi in tre parti riportando un pattern "stiff" (rigido) in 208/240 parti (86.7%) mentre una parte di "mild softening" (più lassa) è stata osservata in 29/240 parti. Questi risultati sono stati forniti in assenza di valori numerici tipo lo Strain Index (SI), ma semplicemente desunti da una scala cromatica. Gli Autori da questo studio denominarono la RTSE "digital finger" per la capacità di misurare la elasticità tissutale e descrissero il tendine come una "struttura dura": nella scala di colore questa densità corrisponde ad una scala di colore che vira dal blu al verde è stata verificata nel 87% dei terzi di tendine di

Achille. Lo stesso autore, l'anno seguente<sup>189</sup>, confrontò 25 tendini d'achille tendinosici con 25 volontari sani dal punto di vista ecografico ed elastosonografico. L'elastosonografia ha mostrato caratteristiche di rigidità nell'ordine del 93% dei pazienti, con aree focalizzate di maggior elasticità nel 57% dei pazienti, compatibile con le aree di tendinopatia. Le aree più coinvolte risultavano identificabili nel 64% dei pazienti a livello del terzo distale, nell'80% a livello del terzo medio e nel 28% a livello del terzo prossimale. Questi dati, correlati all'esame clinico ed ecografico tradizionale, mostravano una sensibilità del 94%, specificità del 99% ed accuratezza del 97% nell'identificazione delle aree di tendinopatia. Dunque l'elastosonografia riusciva ad evidenziare in modo estremamente più chiaro aree di alterata struttura tendinea, che talvolta possono sfuggire ad una valutazione ecografica convenzionale. Sempre secondo l'Autore, il "softening" tendineo si spiega in conseguenza di modifiche molto precoci alla isto-struttura, sebbene ancora i dati dovessero essere considerati preliminari.

Arda invece per la prima volta ha riportato dati numerici di elasticità su 127 tendini di Achille di soggetti volontari sani (89 donne, 38 uomini, età media  $37.72 \pm 9.11$  anni; range di età 17-63 anni)<sup>190</sup>. reported the elasticity values of Achilles tendons of 127 healthy volunteers (89 women, 38 men; mean age,  $37.72 \pm 9.11$  years; range, 17-63 years. L'elasticità media è stata quantificata in  $51.5 \pm 25.1$  kPa nei tendini di Achille sani.

#### **6.3.7- Riproducibilità/ BMI / Fumo.**

Differenti studi hanno investigato la RTSE in termini di affidabilità e riproducibilità come procedura diagnostica. Dragonaki et al.<sup>191</sup> hanno riportato ulteriori pattern del tendine di Achille normale, fornendo dettagli di tecnica per ottenere maggior riproducibilità nella tecnica. 50 tendini di

Achille normali sono stati studiati prospetticamente con la RTSE usando il trasduttore applicato con compressioni intermittenti manuali. Dai risultati dello studio si è confermato con la maggior riproducibilità dello SI era migliore negli elastogrammi estratti da analisi di sezioni longitudinali di tessuto.

Yamamoto<sup>192</sup> e Capalbo<sup>193</sup> nei loro studi hanno definito la RTSE come una tecnica riproducibile nella misurazione dell'elasticità del tendine di Achille. In accordo con Capalbo, la rigidità tendinea appare correlata al body mass index (BMI), fumo e condizioni patologiche collaterali. In particolare la connessione tra il ridotto BMI e peggiori condizioni tendinee sembra dovuto ad una maggior responsabilità dell'overuse sportivo piuttosto che il sovraccarico ponderale.

#### **6.3.8- Atleti Pre/Post/ screening**

Ooi et al.<sup>194 195</sup> in due differenti studi ha focalizzato la ricerca sulla capacità della RTSE di rilevare le modifiche precoci in tendine di Achille.

Studiando giocatori di calcio asintomatici è stato osservato che un maggior spessore e la presenza di una delaminazione tendinea o un tendine più "soft" era associato ad un rischio incrementato di manifestazioni patologiche a carico del tendine. Analogamente, studiando dei maratoneti prima e dopo la prestazione sportiva, ha riscontrato che la corsa di lunga distanza induceva alterazioni significative della rigidità tendinea: lo softening pre-esistente ad una situazione di stress o potenzialmente traumatizzante può indurre variazioni significative rappresentando così un fattore di rischio per il danno tendineo non altrimenti valutabile con la convenzionale ultrasonografia.

### **6.3.9- Rigidità tendinea nell'anziano ?**

La correlazione tra l'invecchiamento e le modifiche strutturali del tendine è ancora oggetto di studi e discussione. Touran<sup>196</sup> ha studiato questa correlazione tra l'età e le modifiche strutturali al tendine di Achille, dimostrando nel 2015 che la rigidità del tendine incrementa con l'età.

La correlazione tra l'invecchiamento e le modifiche strutturali del tendine è ancora oggetto di studi e discussione. Al contrario lo studio di Aubry e Fu<sup>197</sup> non ha riscontrato una relazione così forte tra l'età ed l'incremento di rigidità del tendine.

### **6.3.10- Tendinopatia Achillea**

La tendinopatia del tendine di Achille è causa di morbilità e riduzione della performance nella popolazione generale e più in particolare negli atleti<sup>198</sup>. Dunque la diagnosi precoce consente di migliorare la qualità del risultato in quanto condiziona la strategia terapeutica.

De Zordo et al.<sup>199</sup> hanno confrontato 25 tendini di Achille affetti da patologia con 25 volontari sani con entrambe le metodiche B-Mode e RTSE, trovando delle differenze significative. La RTSE ha mostrato caratteristiche di rigidità nel 93% dei pazienti con aree focali di maggiore elasticità nel 57% dei casi, ascrivibile come tendinopatia. Le aree affette sono state identificate nel terzo distale nel 64% di quella zona, nell'80% delle zone centrali e nel 20% delle zone prossimali. Questi dati correlati ad un esame clinico e la tradizionale ecografia ha mostrato una sensibilità del 94%, specificità del 99% e una accuratezza del 97% nell'identificare le aree di tendinopatia. Secondo gli autori, il "softening" può essere spiegato da variazioni sul piano istologico della struttura tendinea e la RTSE riesce a mostrare queste alterazioni in anticipo rispetto all'ecografia.

Dirrichs et al.<sup>200</sup> ha valutato 41 pazienti con tendinopatia Achillea (7 bilaterali e 34 unilaterali) con RTSE ed US convenzionale e power doppler

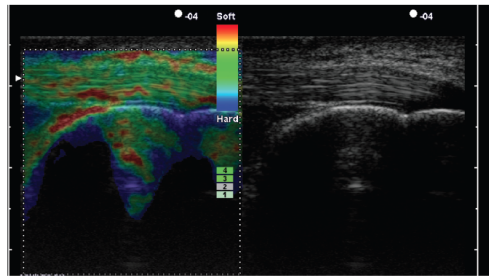
(PD) comparandolo con i risultati desunti con pazienti clinicamente asintomatici definiti sani. Gli Autori hanno correlato dati sonografici con il clinical outcome. Alla valutazione elastografica quantitativa, i pazienti sintomatici ha un valore significativamente più basso rispetto ai valori, con valori 154.2 +/- 28.3kPa per i pazienti sani rispetto ai 53.4 +/- 23.2 kPa di quelli con tendinopatia. I valori elastografici erano correlati con gli outcomes clinici ( $r = 0.81$ ). Ad una valutazione semiquantitativa i tendini sani hanno mostrato una prevalenza pattern “duro” mentre i tendini affetti da patologia mostrano valori ascrivibili al soft o valori intermedi.

Da ultimo, Galletti et al,<sup>201</sup> hanno confermato attraverso il loro studio che la RTSE rivela le anomalie tissutali tendinee con largo anticipo rispetto alla ecografia convenzionale in una alta percentuale di casi.

### **6.3.11- Pattern Elastosonografici**

L’etiologia della tendinopatia Achillea e l’esatto meccanismo che porta a questa condizione è ancora oggetto di discussione in quanto carente di evidenze. Secondo Klauser<sup>202</sup> le modifiche della archistuttura tendinea sono ben valutabili con la RTSE rispetto ad altre metodologie di imaging, andando a verificar un riscontro con campionamenti istologici di tendini flessori precedentemente indagati.

Per primo Sconfienza et al.<sup>203</sup> ha determinato una scala di pattern elastografici, prendendo in esame 12 atleti amatoriali affetti da tendinopatia achillea con 36 tendini sani. Utilizzò una scala numero-cromatica di elasticità basata su 5 colori corrispondenti a gradi di elasticità progressivamente crescenti: 1= blu= duro, 2=azzurro, 3= verde, 4=giallo, 5=rosso=elastico (figura).



**Fig.:** Elastosonografia di un tendine d'Achille Normale (da Sconfienza 2010)

La struttura ecofibrillare era comparabile nei 2 gruppi alla ecografia standard, ma i tendini sintomatici erano mostravano a livello del corpo tendineo toni di blu e verde in prevalenza. La perdita di elasticità è stata associata dagli autori a fenomeni di frammentazione inversamente correlati allo spessore tendineo. Da questo studio tuttavia le estremità della giunzione miotendinea ed osteotendinea non risultavano affetti da alterazioni, dunque analoghi tra pazienti e controlli. L'Autore, con la sua elastosonografia ha evidenziato l'assenza di differenze statisticamente significative tra i soggetti sintomatici ed i controlli, mostrando in entrambi i casi colorazioni prevalenti a livello di blu, azzurro e verde. L'entità dell'elasticità tendinea risultava dalla sommatoria dei colori valutati in scansione elastosonografica, pertanto non vi era modo di confrontare tali risultati con altri dati di letteratura. Tuttavia era interessante la correlazione da questi riportata secondo cui le patologie infiammatorie *croniche*, a causa della variazione di concentrazione di collagene I e collagene III, con netto aumento di quest'ultimo, correlino in modo direttamente proporzionale con aree di tendine giudicate "dure" oltre la norma, mentre stati *acuti* in cui si osserva versamento ed edema intra-tendineo e peri-tendineo mostrino colori indicanti una struttura *più elastica*, molle. Contemporaneamente Zhang et al.<sup>204</sup> ha comparato l'elasticità tendinea ed i controlli asintomatici. In

questo studio si dimostrava che i tendini sintomatici erano sensibilmente più duri di quelli asintomatici.

Al contrario Aubry et al.<sup>205</sup> asseriva che la tendinopatia fosse piuttosto correlata ad una variazione verso il “softening” del tendine in conseguenza di variazioni di viscoelasticità del tendine. La possibile spiegazione di queste incongruenze tra i vari studi va spiegata nelle differenti modalità di reclutamento del paziente che dunque va a condizionare il tipo di pattern elastografico identificato.

Petrescu et al.<sup>206</sup> ha valutato 80 volontari con o senza patologia tendine, correlando i dati anamnestici, clinici e la pratica sportiva. Una significativa correlazione si identifica tra l’insorgenza della tendinopatia e l’incrementare dell’età.

### **6.3.12- Rottura tendinea**

Tan et al.<sup>207</sup> ha studiato 19 tendini giocatori amatoriali di calcio sottoposti a riparazione chirurgica dopo rottura comparandola con i tendini controlaterali sani. Si è avvalso della RTSE confrontando i dati con la convenzionale US, e comparando il tutto con 40 tendini asintomatici di 20 calciatori amatoriali. Anche in questo studio l’analisi del tendine di Achille ha previsto una suddivisione in tre parti prossimo-distali per le considerazioni di imaging.

I tendini sono stati classificati dal punto di vista elastografico in 3 tipologie principali in accordo all’elasticità riscontrata: *type 1, blue (hardest tissue); type 2, blue/green (hard tissue); or type 3, green (intermediate tissue)*. Allo stesso tempo sono stati elaborati 3 pattern US: *homogeneous, relatively homogeneous, and heterogeneous*. La maggior parte dei tendini di Achille riparati chirurgicamente hanno mostrato un pattern RTSE di tipo 2 (64.9%), e i rimanenti mostravano il tipo 1 (35.1%). D’altra parte però anche i tendini mostravano il tipo 2 (64.2%), mentre il resto riportava il tipo



3 (20.8%) o il tipo 1 (15%). L'aspetto ecografico convenzionale mostrava una struttura eterogenea nei tendini riparati chirurgicamente ed omogenea nei controlli: questo portava gli autori a concludere che la valutazione elastosonografica può avere un ruolo nel monitoraggio della evoluzione della riparazione tendinea verso strutture più "normali" evidenziando però che l'outcome clinico in termini di durezza o meno del tendine riparato fosse relativamente associabile al dato dell'outcome clinico.

Chen et al.<sup>208</sup> ha studiato piuttosto l'aspetto elastografico del tendine di Achille sano in comparazione a quello rotto. L'elasticità media per il tendine di Achille normale è stata  $291.91 \pm 4.38$ , mentre quelli rotti hanno mostrato una elasticità quantificabile in  $56.48 \pm 68.59$  kPa (P=0.006).

Zhang et al.<sup>209</sup> ha valutato nel suo studio prospettico l'evoluzione riparativa di tendini di Achille sottoposti a chirurgia in un follow up di 12, 24 e 48 settimane postoperatorie. I suoi risultati confrontati col dato clinico raccolto nella valutazione AOFAS mostrava risultati di correlazione positiva tra il miglioramento clinico e l'evoluzione cicatriziale del

#### ***6.3.13- Altre condizioni patologiche del tendine di Achille***

Masala et al.<sup>210</sup> ha valutato la RTSE nell'analisi delle caratteristiche del tendine di Achille affetto dal piede piatto congenito. Ha osservato una ridotta elasticità quando comparata ai tendini sani.

Turan et al.<sup>211</sup> ha valutato gli effetti del tendine di Achille in pazienti affetti da spondilite anchilosante. La Achillodinia è stata valutata in scala VAS ed il tendine con US, Doppler US e RTSE. Il terzo distale del tendine è stato quello più comunemente affetto nella spondilite anchilosante ed è stato verificato che la Achillodinia risultava più spiccata in pazienti con un riscontro anche in elastosonografia e in ecografia: il "softening" rivelato dalla RTSE aveva una diretta correlazione con le anomalie tendinee, nei punti sintomatici.

Evranos<sup>212</sup> et al ha intrapreso uno studio che ha comparato 78 pazienti con diabete in presenza o assenza di ulcere a livello del piede (35 patients, group I) vs (43 patients, group II). In questo studio si è potuto dimostrare che i pazienti diabetici in presenza di ulcere hanno un tendine mediaemente più spesso e “soft” dei paziente diabetici non aventi ulcere identificando nelle forme più avanzate di diabete condizioni collaterali di rilievo come appunto anche le patologie tendinee.

Onal et al<sup>213</sup> nel suo studio caso-controllo ha descritto il pattern del tendine di Achille in 42 soggetti acromegalici e altrettanti controlli sani, investigando l’associazione tra la variazioni degli ormoni caratterizzanti la patologia ed i cambiamenti di elasticità tendinea [growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF-1)]. Da una parte i risultati hanno evidenziato la presenza di alterazioni strutturali e di elasticità in pazienti acromegalici, ma dall’altra i risultati dell’imaging non sono stati correlati con le alterazioni sieriche degli ormoni GH/IGF-1.

#### **6.3.14- Tendine Rotuleo**

Porta et al.<sup>214</sup> ha studiato tendini rotulei sani con la RTSE. 11 soggetti reclutati in base a specifici criteri sono stati studiati in entrambi i tendini mediante la US convenzionale e la RTSE nelle tre parti (prossimale, centrale, distale), utilizzando due sonografi separati e due valutatori (con diverso livello di esperienza). Nell’analisi cromatica si è osservata una prevalenza di elasticità nei toni di verde, con un accordo intra-interosservatore alto. Analoga concordanza è stata rilevata per anche per i valori di Strain Index rilevati nella porzione prossimale, intermedia e distale. I valori rilevati del SI delle porzioni tendinee esaminate ha fornito questi valori : (mean ± SD):  $1.47 \pm 0.64$ ,  $4.38 \pm 1.36$ ,  $3.32 \pm 1.20$  rispettivamente per la porzione prossimale, intermedia e distale rispettivamente. E’ stata valutata una sorta di curva di apprendimento

nell'esecuzione dell'esame RTSE da parte degli esaminatori, evidenziando come progressivamente l'esaminatore meno esperto sia progressivamente passato da svolgere l'esame in 5 minuti a soli 2 minuti mentre l'esaminatore esperto ha mediamente impiegato 2 minuti per lo svolgimento dell'esame.

Ooi et al.<sup>215</sup> nel suo studio ha correlato i rapporti tra il dato clinico del Victorian Institute of Sport Assessment-Patella (VISA-P) score e quello Elastografico in RTSE in pallavolisti con o senza sintomi di tendinopatia. In questo studio non è stato, diversamente da altri riguardanti altri distretti tendinei determinare una associazione significativa tra il dato clinico e quello elastografico.

Dirrics et al.<sup>200</sup> ha studiato 51 ginocchia con RTSE affette da dolore ed edema locale. I pazienti sintomatici ad una analisi quantitativa mostravano valori significativamente inferiori rispetto ai pazienti sani, con un valore medio di 176.8 +/- 18.2kPa per i sani versus 56.3 +/- 18.3 kPa dei patologici. Anche in questo studio veniva riportata una correlazione tra score clinico e dato elastografico ( $r = 0.81$ ). Sempre da questo studio si desume che dalla combinazione di US, power doppler PD e RTSE si riesce a raggiungere una accuratezza diagnostica del 100%.

Botanlioglu et al.<sup>216</sup> ha comparato invece in modo interessante 17 tendini rotulei di ginocchia sottoposti a osteotomia tibiale closed wedge (CWHTO) comparati con tendini non trattati. Al follow up i tendini rotulei coinvolti nella procedura chirurgica risultavano contratti e sofferenti con parametri elastografici di tendinopatia.

#### ***6.3.15- Tendine Quadricipitale***

Il tendine quadricipitale è stato indagato da un solo Autore nei recenti anni. Essendo un tendine che rispetto ad altri ha una minore incidenza di lesione e patologia, è stato studiato in una popolazione di pazienti che ha

avuto una rottura atraumatica in associazione a patologie croniche renali ed altre condizioni patologiche particolari come iperparatiroidismo e acidosi metabolica.

Teber et al.<sup>217</sup> ha in tal senso comparato dati sonoelastografici con del tendine quadricipitale di pazienti in dialisi comparato ad un gruppo controllo di pazienti sani. Nell'insufficienza renale cronica, in particolare, si evidenzia una sostanziale softening del del tessuto intratendineo.

### **6.3.16- Spalla**

Arda et al.<sup>190</sup> hanno rièportato i valori di elasticità nel tendine sovraspinato in 127 volontari sani (89 F, 38 M; età media,  $37.72 \pm 9.11$ ; range, 17-63 anni). L'elasticità media è stata determinata in  $31.2 \pm 13$  kPa per il tendine sovraspinato, con una maggiore elasticità in nei maschi rispetto che nelle femmine senza una particolare correlazione con l'età.

Tudisco et al.<sup>218</sup> ha riportato la affidabilità della RTSE in piccole lesioni del tendine sovraspinato in 50 pazienti reclutati. In questo studio è stata riscontrata una correlazione negativa tra strain index SI e dolore espresso in VAS, e una correlazione positiva tra SI e Constant–Murley score ed ASES. Dati equiparabili sono stati verificati tra maschi e femmine, ma nei maschi una correlazione positiva molto forte è stata verificata anche per il Simple Shoulder Test e l'UCLA score. Gli Autori concludevano attribuendo alla RTSE un ruolo centrale come metodo di conferma della qualità del tendine.

Anche la tendinopatia bicipitale è comunemente associata con patologie della cuffia dei rotatori ecco perchè Seo et al.<sup>219</sup> ha svolto delle valutazioni elasto sonografiche stimando un potenziale diagnostico più completo dell'attuale gold standard ovvero l'ecografia convenzionale.

Lee et al.<sup>220</sup> in uno studio osservazionale ha effettuato un confronto tra il dato elastografico e quanto derivabile dalla risonanza magnetica nelle patologie di cuffia. Il grado di tendinopatia stimato dalla analisi in risonanza magnetica è risultato positivamente associato al dato

elastosonografico. [Fat/T strain ratios ( $P < .001$ ) e il Pad/T strain ratios ( $P < .001$ )]. Non solo per il danno acuto o lacerativo, anche in caso di tendinopatia la RTSE è stata utilizzata. Come dimostrato da Kocyigit<sup>221</sup>, la metodica è stata utilizzata anche in condizioni di impingement subacromiale trovando una correlazione significativa tra lo Strain Index e gli score di valutazione funzionale.

Anche Galletti<sup>201</sup> si è confrontato con la patologia tendinea inerente la spalla, sottolineando come il pattern elastosonografico potesse anticipare delle condizioni patologiche non altrimenti identificabili nella ecografia convenzionale. Danno tendineo è stato osservato nell'80% dei pazienti reclutati. Nel 88.4% di riscontro positivo, i tendini della cuffia sono risultati "rigidi" e rappresentati in colore blu, mentre le zone di infiammazione ed edema "red areas" sono state osservate prevalentemente nello strato bursale del tendine. La patologia infiammatoria del capo lungo bicipitale, molto sovente riportata in US convenzionale, veniva qui identificata in elastosonografia solo nell'11.5% dei pazienti.

#### **6.3.17- Epicodilite**

De Zordo et al.<sup>222</sup> si è occupato anche del problema epicondilite of 32 valutando 32 pazienti con sintomi di epicondilite 44 gomiti di volontari sia con ultrasuoni che con RTSE, completata da opportuno esame clinico e caratterizzazione del dolore in scala VAS . Nei volontari sani l'esame RTSE è risultato con caratteristiche "dure" nel 96% dei terzi di tendine, minime alterazioni nel 4% residuo. Nei casi affetti da epicondilite, nel 33% dei tratti tendinei esaminati a struttura risultava dura, mentre il "softening" si osservava nel 67% restante. Attraverso la RTSE è stato confermato il coinvolgimento del legamento collaterale laterale. La sensibilità della RTSE era del 100%, la specificità del 89%, l'accuratezza del 94% rispetto

all'esame clinico giudicato come gold standard. Attraverso lo studio è anche stata osservata una buona correlazione col dato US ( $r \geq 0.900$ ).

Ahn et al.<sup>223</sup> ha valutato prospetticamente 97 estensori comuni vs 89 asintomatici di un gruppo di pazienti consecutivi affetti da epicondilite e 14 soggetti sani. Il pazienti con epicondilite hanno mostrato uno SI significativamente inferiore evidenziando come negli stati acuti il processo patologico evidenziasse tendini con un pattern "soft" rispetto agli asintomatici.

Kocigiyt<sup>224</sup> et al ha investigato il ruolo della SE in pazienti con epicondilite laterale comparando alla US B-Mode e il color doppler. La elastosonografia ha dimostrato la sua superiorità alle altre procedure diagnostiche.

Dirric et al<sup>200</sup> ha evidenziato il pattern elastografico nella tendinopatia con prevalenza di quello "intermediate and soft" con valori quantitativi più bassi rispetto ai tendini sani (176.2 +/- 18.2kPa dei sani versus 64.1 +/- 29.3 kPa dei patologici). Il dato elastografico correlava sì con il dato clinico ( $r = 0.62$ ), ma con valori inferiori rispetto al tendine di Achille e Rotuleo.

Galletti et al.<sup>201</sup> con l'elastosonografia ha evidenziato i segni precoci della peri-tendinopatia (edema ed infiammazione lungo il peritenonio) nell'83,8% dei casi mentre nei restanti evidenziava i caratteri di entesite (aree blu all'inserzione tendinea, edema nella borsa e i tessuti circostanti)

### **6.3.18- Fascite Plantare**

Sconfienza et al.<sup>225</sup> ha valutato prospetticamente 80 piedi in 80 pazienti considerando il grado di dolore in scala VAS e sottoponendo ad esame US ed RTSE la fascia plantare da due radiologi in cieco rispetto ai sintomi.

I gruppi reclutati non differivano per sesso ed età.

Lo studio in cieco mostra comunque un ispessimento con ipoecogenicità strutturale in US mentre in RTSE all'ispessimento corrispondeva una minor elasticità. Il dato elastografico correlava positivamente con l'entità del dolore e con la crescente età ma non vi era una correlazione positiva tra il sesso del paziente o la struttura ipoecogena. L'accuratezza raggiunta mediante l'ecografia convenzionale (90,0%) è stato superato dalla RTSE (95,4%)

Wu in due studi differenti, nel 2011<sup>226</sup> e nel 2015<sup>227</sup>, ha studiato il ruolo della RTSE nella fascite plantare. Nel 2011 riportava che la fascia plantare tende ad essere più "soft" con l'età.

Nel 2015 ha valutato il ruolo della RTSE in pazienti con una clinica positiva per fascite plantare ma con US negativa: in questi casi la RTSE si è dimostrata in grado di anticipare il quadro radioogico più convenzionale.

Galletti et al.<sup>201</sup> analogamente ha studiato il ruolo anticipatorio dell'RTSE rispetto alla US nella fascite plantare. In 13/18 casi (72,2 %) i pazienti mostravano un quadro fascitico con strutture dure nella fascia e aree rosse "soft" perifasciali dovute all'edema tissutale. Da segnalare però che nel 27,7% dei casi analizzati la valutazione della fascia è risultata inconcludente o ha dato esito negativo non rivelando alterazioni strutturali della fascia.

### ***6.3.19- Conclusioni e considerazioni personali.***

RTSE risulta essere uno strumento prezioso nel processo diagnostico di diverse condizioni patologiche dei tendini e degli altri tessuti molli. Questa tecnologia attualmente è nelle mani di pochi centri e di pochi radiologi che sanno maneggiare con consapevolezza lo strumento. In queste realtà "di nicchia" si sta cercando attraverso studi clinici, purtroppo ancora su pochi pazienti e con diversi limiti operativi, di dare una risposta più approfondita e dettagliata per un uso più consapevole ed efficace. Ma, visto che la RTSE

è un sistema di diagnosi dinamica e consente di ottenere una valutazione immediata della elasticità tissutale, si può anticipare un ruolo nella pratica quotidiana dello specialista ortopedico e del medico sportivo (sia come strumento diagnostico che nel follow up di trattamento). Può avere anche un impiego intra operatorio per confermare il conseguimento di una appropriata tensione del tendine ricostruito chirurgicamente: in effetti conosciamo ancora poco delle implicazioni in vivo legate all'adeguato tensionamento del tendine durante l'atto chirurgico. In questa ottica, nuovi studi clinici possono svelare uno dei "black box" della patologia muscolo scheletrica.



## STUDIO SPERIMENTALE

### “ELASTOSONOGRAFIA COME NUOVO STRUMENTO DI FOLLOW-UP NELLA RIPARAZIONE CHIRURGICA DEL TENDINE DI ACHILLE”

#### 6.4.1- OBIETTIVO E DISEGNO DELLO STUDIO

**S**copo di questo studio prospettico “pilota” è stato quello di valutare la capacità del tendine di Achille trattato chirurgicamente di procedere verso una *restitutio ad integrum*, utilizzando nuova metodica diagnostica non invasiva quale l’elastosonografia. Obiettivo principale è stato quello di definire l’indice di elasticità a livello di tre punti nel tendine trattato (giunzione osteotendinea, sito di lesione, giunzione miotendinea) da confrontarsi con i medesimi punti del tendine controlaterale dei pazienti reclutati ai tempi di 40 giorni, 6 mesi ed 1 anno dall’intervento di tenorrafia. Suddetti dati verranno correlati anche score clinico.

I dati elastosonografici ad un anno sono stati infine comparati con valori estratti da una popolazione di soggetti volontari sani ed asintomatici reclutati per definire un “*range of normal*”.

## 6.4.2 - MATERIALI E METODI

Presso la Clinica Ortopedica dell'Università Politecnica delle Marche tutti i pazienti, giunti alla nostra osservazione per lesione completa del Tendine di Achille negli anni 2011 e 2013, sono stati invitati a partecipare allo studio. La tecnica chirurgica praticata nei pazienti trattati è stata una tecnica di tenorrafia percutanea mediante impianto BIO-Tex Para-Pé®. L'intervento è stato effettuato in regime di Day-Hospital previa esecuzione degli accertamenti di routine.

### • **Criteri di reclutamento.**

Sono stati considerati arruolabili i pazienti con lesione traumatica del tendine d'Achille, giunti presso la nostra Struttura Ospedaliera nel quadriennio 2011-2013.

Sono stati esclusi pazienti con le seguenti caratteristiche:

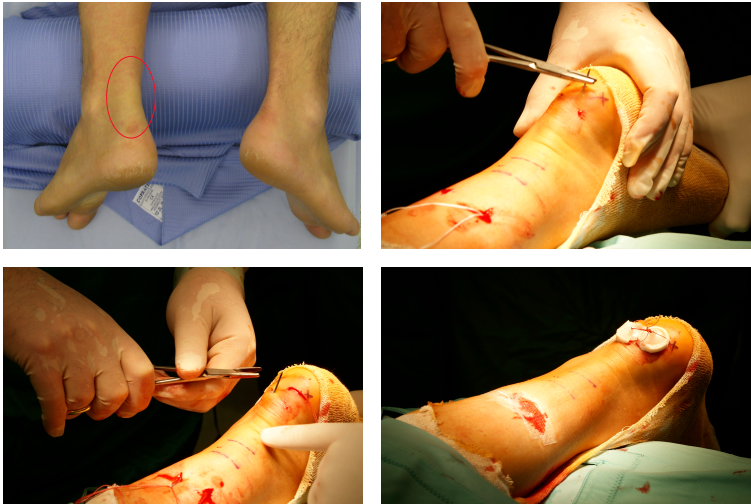
- età superiore ai 65 anni
- diabete;
- ipercolesterolemia familiare
- terapie antibiotiche fluorochinoloni negli ultimi 12 mesi;
- terapie con cortisone negli ultimi 12 mesi;
- collagenopatie;
- entesopatie sieronegative o sieropositive;
- trattamento chemioterapico per neoplasia.

### • **Tecnica Chirurgica: Tenorrafia Percutanea.**

Il paziente viene posizionato prono con piede sollevato dal letto mediante un cuscino o in alternativa ciondoloni dal letto in posizione equina gravitaria. Anestesia locale puntiforme mediale e laterale circa 5 cm prossimamente alla lesione e medialmente e lateralmente

all'inserzione distale del tendine d'Achille. Vengono disegnati con matita dermatografica i due monconi del tendine. Si praticano 2 accessi chirurgici (mediale e laterale) di 5mm a distanza di circa 5 cm dal sito di lesione (Fig. 1). L'impianto BIO-Tex Para-Pé® si compone di due aghi lunghi fissati distalmente ad un filo di poli-etilen tereftalato. Al centro del filo c'è un'espansione del filamento che a mò di amaca atto a spingere il polo mio-tendineo distalmente verso la lesione. Gli aghi vengono modellati con pinze da meccanico per facilitarne lo scorrimento lungo i margini para-achilleo mediale e laterale. L'ago viene introdotto da uno dei due accessi prossimali indifferentemente. Dopo aver palpato il tendine con le dita della mano sinistra, si fa penetrare l'ago attraverso i due monconi fino alla sua fuoriuscita distale lateralmente all'inserzione calcaneare del tendine stesso. La medesima operazione è stata eseguita nel versante opposto. Distalmente gli aghi usciti per via percutanea consentono l'inserimento di 2 bottoni di Allevyn® e successivamente di due bottoni in materiale plastico e metallico. Si effettua la riduzione della lesione tensionando i due fili distali mediante i due aghi e ponendo il piede in equino forzato; vengono quindi applicati i due dischi di plastica ponendo il lato convesso di essi a contatto con la cute. Controllando l'equino, il contatto del bottone della tenuta dell'impianto prossimalmente, vengono stretti i due piombini al filo con pinza. Si confeziona una valva gessata di posizione a livello dorsale, con piede atteggiato in equinismo al fine di non creare forze di tensione sulla cicatrice tendinea.

*Fig.1 : Sequenza operativa della tecnica percutanea del Bio-TEX Para-pé*



*Fig.2 : tecnica chirurgica percutanea del Bio-TEX Para-pé in vivo.*

- **Follow-up.**

La dimissione avveniva poche ore dopo l'intervento, seguiva un controllo ecografico post-operatorio a conferma dell'allineamento dei monconi tendinei.

A 20 giorni il primo controllo clinico nel quale si rimuoveva la valva in equinismo cui si sostituiva un bendaggio elastico in tensoplast con piede atteggiato in posizione neutra, con indicazione al carico sfiorante con bastoni canadesi e a compiere esercizi di flessione-estensione attiva della tibio-tarsica.

A 40 giorni veniva effettuato un nuovo controllo ecografico per valutare l'eventuale rimozione dell'impianto, ripresa graduale del carico con bastoni, inizio del trattamento riabilitativo dell'articolazione e ripresa del tonotrofismo del tricipite della sura mediante l'aiuto di un fisioterapista.

A 55 giorni, veniva effettuato nuovo controllo clinico, abbandono graduale dei bastoni e prosecuzione del trattamento riabilitativo.

A 70 giorni, il trattamento si considerava concluso.

Alla valutazione ecografica convenzionale ed elastosonografica, a 6 mesi e ad 1 anno, è stato somministrato al paziente il questionario di specifico per la funzionalità del tendine d'Achille dopo ricostruzione chirurgica denominata ATRS (Achilles Tendon Repair Score)<sup>228</sup>, tradotto in italiano.

- **ATRS Score**

Tale scheda tradotta in Italiano per questo studio, recentemente validata<sup>229</sup>, risulta da una recente letteratura il miglior score per l'outcome chirurgico dopo tenorrafia del tendine d'achille, se comparato con schede antecedenti e meno specifiche come la AOFAS e la VISA-A<sup>230,231</sup>. Il questionario ATRS consiste di 10 domande (costruite su una scala Likert da 1 a 10) in grado di valutare i sintomi e la funzionalità. Lo score massimo equivale a 100, ovvero un completo ritorno alle proprie funzioni. Per ogni domanda, al valore 0 corrisponde una massima limitazione/sintomatologia, mentre al valore 10 corrisponde benessere in completa assenza di limitazioni. In Figura 3a viene riportato il questionario nella versione tradotta in italiano per questo studio, mentre nella 3b la versione validata in lingua italiana nel recente lavoro del 2016. Si noti che la leggibilità e la comprensibilità dei contenuti le rende di fatto sovrapponibili.

**ATRS**  
**(Achilles Tendon Total Rupture Score)**

Tutte le seguenti domande riferiscono alle Sue limitazioni/difficoltà relative al Suo tendine d'Achille infortunato. Segni con una X il numero che corrisponde in proporzione al Suo livello di limitazione

1. Si sente limitato da una riduzione della forza del polpaccio/tendine di Achille?	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
2. Si sente limitato/affaticato a livello del polpaccio/tendine di Achille?	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
3. Si sente limitato a causa di una rigidità a livello del polpaccio/tendine di Achille?	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
4. Si sente limitato a cause di un dolore al polpaccio/tendine di Achille/piede?	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
5. Si sente limitato a causa nello svolgimento delle attività quotidiane?	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
6. Avverte limitazioni nel camminare su superfici irregolari?	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
7. Si sente limitato quando sale velocemente le scale o cammina in pendenza?	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
8. Si sente limitato in attività quotidiane che prevedono la corsa?	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
9. Si sente limitato nell'eseguire dei salti/balzi?	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
10. Si sente limitato nell'eseguire dei lavori pesanti?	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Total Score: \_\_\_\_\_

**Fig.3a:** *Questionario ATRS tradotto in Italiano per questo studio, tradotta ed adattata dall'autore A. B. 'per lo studio. La elaborazione è di poco antecedente alla traduzione validata da Vascellari et a.*

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Data di nascita \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Nome e Cognome: \_\_\_\_\_

ISTRUZIONI: Questo questionario intende valutare le limitazioni/difficoltà che Lei prova a causa della lesione del Suo tendine di Achille.

Risponda a ciascuna domanda, quantificando le Sue limitazioni/difficoltà da 0 a 10 (solo una risposta per ciascuna domanda). Ricordi: 0=grave limitazione, 10=nessuna limitazione. Marchi il numero che meglio rispecchia il Suo livello di impedimento.

1. Ha delle limitazioni dovute alla diminuzione della forza del polpaccio/tendine di achille/piede?  
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 (nessuna limitazione)

2. Ha delle limitazioni dovute alla stanchezza al polpaccio/tendine di achille/piede?  
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 (nessuna limitazione)

3. Ha delle limitazioni dovute alla rigidità del polpaccio/tendine di achille/piede?  
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 (nessuna limitazione)

4. Ha delle limitazioni dovute al dolore al polpaccio/tendine di achille/piede?  
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 (nessuna limitazione)

5. Ha difficoltà nello svolgimento delle Sue attività quotidiane abituali?  
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 (nessuna limitazione)

6. Ha difficoltà quando cammina su una superficie irregolare?  
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 (nessuna limitazione)

7. Ha difficoltà quando sale rapidamente le scale o cammina in salita?  
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 (nessuna limitazione)

8. Ha difficoltà durante le attività che includono la corsa?  
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 (nessuna limitazione)

9. Ha difficoltà durante le attività che includono i salti?  
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 (nessuna limitazione)

10. E' limitato quando esegue lavori pesanti?  
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 (nessuna limitazione)

Grazie per aver completato il questionario

**Fig 3b.** ATRS in Italiano recentementa validata da Vascellari et al KSSTA 2016

- **Metodologia di Valutazione Elastasonografica.**

Per la valutazione elastasonografica, sono stati esaminati i pazienti rispettivamente a 40 giorni dall'intervento, a 6 mesi e/o ad 1 anno dall'intervento.

Prima di effettuare la valutazione sui pazienti trattati, sono stati identificati 30 soggetti sani, volontari per un totale di 60 tendini di Achille, di età compresa tra i 20 ed i 40 anni al fine di ottenere dei valori elastasonografici da considerarsi come "*range of normal*".

Dapprima i volontari, e successivamente i pazienti, sono stati ecografati con una sonda a 5-12 MHz e sottoposti a elastasonografia (Philips iU 22, Eindhoven, The Netherlands)(Figura 4).

I pazienti sono stati posizionati in decubito prono sul lettino, con entrambi i piedi e debordanti dal medesimo. I tendini di Achille sono stati esaminati sia in assiale sia in longitudinale da un radiologo, esperto in radiologia muscolo-scheletrica, e i pazienti sono stati posizionati in posizione prona con i piedi al di fuori del bordo del lettino. Le modalità di rilevamento delle caratteristiche dei tendini analizzati hanno fatto riferimento ad uno dei primi lavori in letteratura disponibili sull'argomento<sup>232</sup>, a cui sono state apportate opportune modifiche e note tecniche, anche considerando che la sonda e l'elastasonografo sono differenti.

Per standardizzare e rendere più riproducibile il metodo, l'operatore ha potuto effettuare un'auto-calibrazione della pressione esercitata sul tendine mediante un rilevatore di pressione presente nell'ecografo: la barra verde a lato destro dello schermo (Figura 5) doveva essere raggiunta a metà del picco massimo di pressione rilevabile e mantenuta possibilmente a quel valore per tutto lo studio del tratto tendineo.

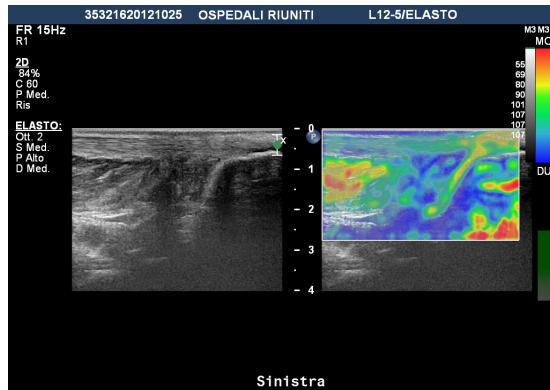
Le misurazioni dello spessore tendineo sono state effettuate, a livello malleolare in proiezione assiale, mentre tutte le altre misurazioni e la



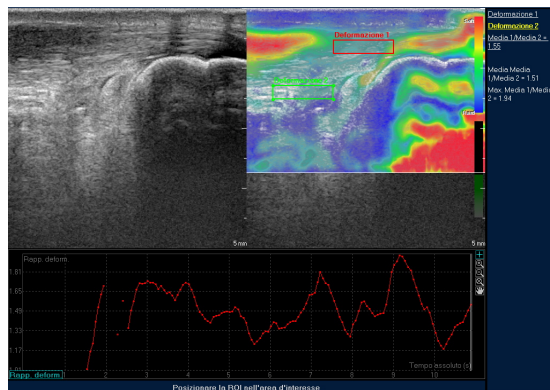
elastosonografia in longitudinale. La sonda è stata posta perpendicolarmente al tendine per evitare ogni anisotropia (Figura 5). Nell'effettuare la elastosonografia, il fuoco è stato posizionato alla stessa altezza del tendine e la pressione esercitata sul tendine è stata regolata in base all'indicatore presente sullo schermo dell'ecografo, a garanzia della riproducibilità dell'esame. Almeno quattro compressioni della stessa entità sono state ripetute sulla porzione del tendine esaminato. I colori campionati sono stati il blu, indicatore di massima rigidità, il verde e il giallo, media rigidità e il rosso, elasticità.

La ROI (*region of interest*) utilizzata per il calcolo dello *Strain Index* (SI= indice di elasticità tendinea), è stata identificata una finestra rettangolare di tendine (dimensioni 4x1 mm) posizionato a livello prossimale (giunzione miotendinea); medio (2-5 cm dall'inserzione calcaneare) e distale (inserzione calcaneare). Questa finestra è stata messa in rapporto ad una finestra di analoghe dimensioni del tessuto adiposo. Una volta individuate le ROI si elabora un "elastogramma" ovvero la curva che mostra le variazioni di elasticità nell'area delineata in vari punti (figura 6). In tutti i pazienti è stato valutato lo S.I. a livello dell'area lesionale trattata chirurgicamente, la giunzione miotendinea e la giunzione osteotendinea o entesi. Il tendine controlaterale è stato analizzato anch'esso a livello degli stessi reperi anatomici.

Lo *Strain Index* così ottenuto è dunque il rapporto matematico tra lo Strain della ROI in ognuna delle tre porzioni del tendine e la ROI del tessuto adiposo identificato nel triangolo di Kager. Il tendine trattato ed il tendine controlaterale "non trattato" sono stati valutati agli stessi endpoint in condizioni di *rilassamento* del tricipite surale. Le immagini e i valori così ottenuti sono stati salvati nell'hard disk e utilizzati per le indagini statistiche.



**Fig. 5:** Valutazione cromatica di un tendine d’Achille con elastosonografia. In blu il tessuto rigido mentre le zone gialle-rosse sono quelle con “softening”, che viene interpretato come edema e degenerazione. Si noti la barra verde al lato destro per calibrare la pressione esercitata.



**Fig. 6:** Elaborazione dell’elastogramma dopo aver identificato ROI standard nel contesto tendineo (area rossa) e nel tessuto adiposo del Kager (area verde). La zona rossa contornata da alone giallo e verde è muscolo, dunque di consistenza molto più elastica rispetto al tendine.

- **Metodo Statistico.**

Data la ridotta numerosità delle osservazioni, il confronto fra gruppi è stato eseguito utilizzando un approccio non parametrico. Le variabili quantitative sono state sintetizzate utilizzando la mediana come misura di centralità e il 1° e 3° quartile come misura di variabilità.

Il confronto fra i pazienti operati e i controlli sani è stato valutato mediante il test della somma dei ranghi di Wilcoxon (campioni indipendenti); le variazioni fra le misure valutate a 40 giorni dall'intervento e dopo 1 anno nei pazienti operati sono state valutate mediante il test del segno dei ranghi di Wilcoxon (dati appaiati). La correlazione fra la "lesione s.i." e il punteggio ATRS ad un anno dall'intervento è stata stimata attraverso il coefficiente di correlazione lineare di Spearman e i relativi intervalli di confidenza al 95%.

### 6.4.3- RISULTATI

- **Pazienti Reclutati**

Nel periodo di indagine sono giunti 29 casi di lesione del tendine di Achille sottoposti ad intervento di tenorrafia. In accordo ai criteri di inclusione ed esclusione abbiamo giudicato idonei per lo studio 25 pazienti. Infatti, 2 pazienti sono stati esclusi perché diabetici, 1 in quanto paziente oncologico in trattamento con chemioterapici ed 1 paziente per età superiore ai limite proposto. Nessuno dei pazienti reclutati è stato perso in corso di follow-up, aspetto che ci consente di confermare che in nessun caso è stata riportata nuova rottura dello stesso tendine mentre 1 pazienti hanno subito la rottura del tendine controlaterale a distanza di un anno. Dei 25 tendini lesi, 20 (80%) riguardavano il lato sinistro e 5 (20%) il lato destro. I soggetti di sesso maschile erano 22 e 3 le femmine, con un'età media di  $42.1 \pm 9.0$  anni.

- **Misurazione degli spessori tendinei.**

Relativamente ai soggetti normali lo spessore tendineo sagittale rilevato con ecografia B-Mode convenzionale è risultato a livello dell'entesi di  $3.9 \pm 0.4$  mm, a livello del ventre tendineo di  $4.6 \pm 0.5$  mm mentre a livello della giunzione miotendinea era di  $2.1 \pm 0.4$  mm.

A 40 giorni, 6 mesi ed 1 anno di trattamento, per tutte le zone del tendine esaminato, ed in particolare per il sito di lesione, i diametri sono gradualmente incrementati fino a 6 mesi, per poi ridursi ad 1 anno. Ad un anno tuttavia, gli spessori nel tendine trattato risultavano ancora superiori rispetto al range fisiologico dei soggetti sani volontari studiati. Il lato controlaterale al trattato, ha mostrato in corso di follow-up delle variazioni minime di spessore in tutte le tre zone, in genere inferiori agli 0.5mm. I dati sono rappresentati in *Tabella 1*, in *Tabella 3*.

I pazienti operati valutati ad 1 anno dall'intervento erano caratterizzati da spessore del tendine (Entesi, Lesione e Giunzione Miotendinea) significativamente maggiori dei soggetti sani, sia per la gamba operata che per il controlaterale sano (in questo ultimo confronto, fa naturalmente eccezione la variabile "lesione").

Tendon thickness (mm) Median (1st-3rd quartile)	Patients	Healthy volunteers n = 30 (60 tendons)	p value
	Treated tendons n = 25		
OTJ	6.2 (5.8-6.4)	3.9 (3.6-4.2)	<0.001
Lesion site/tendon body*	9.9 (9.3-10.5)	4.6 (4.1-5)*	<0.001
MTJ	3.7 (3.6-4.1)	2.2 (1.9-2.5)	<0.001
	Contralateral tendons n = 25		
OTJ	5.3 (5.2-5.6)	3.9 (3.6-4.2)	<0.001
Lesion site/tendon body*	4.7 (4.6-4.9)	4.6 (4.1-5)*	n.s.
MTJ	2.9 (2.6-3.1)	2.2 (1.9-2.5)	<0.001

*Wilcoxon Mann-Whitney Rank Sum Test*

**Tab. 1:** Confronto dello spessore del tendine della gamba operata e del controlaterale tra pazienti operati e sani ad 1 anno di follow-up (da Busilacchi et al., *KSSTA* – 2016)

- **ATRS Score**

L'ATRS score ha mostrato nel campione considerato un miglioramento significativo tra il follow-up di 6 mesi, e quello di 1 anno, come esplicitato in Tabella 2.

	6 mesi n=25	12 mesi n=25	p
<b>ATRS</b>	90 (85 - 94)	95 (93 - 100)	<0.001

*Wilcoxon signed rank test per dati appaiati*

- **Valutazione Elastosonografica: Strain Index**

Nel confronto tra i valori rilevati a 40 giorni e ad 1 anno dall'intervento nei pazienti operati, le variabili risultavano significativamente maggiori a 40 giorni, fatta eccezione per la variabile "Lesione" e "Giunzione s.i." del controlaterale.

Median (1st-3rd quartile)	40 days n = 25	6 months n = 25	1 year n = 25	P <sub>a</sub>	P <sub>b</sub>
<i>Treated tendon thickness (mm)</i>					
OTJ	6.4 (5.9-6.8)	7 (6.7-7.2)	6.2 (5.8-6.4)	0.045	<0.001
Lesion site	8.8 (8.4-9.2)	13.5 (13.1-13.8)	9.9 (9.3-10.5)	<0.001	<0.001
MTJ	3.4 (3.1-3.6)	4.3 (4.1-4.7)	3.7 (3.6-4.1)	0.003	<0.001
<i>SI of treated tendon</i>					
OTJ	2.4 (2.1-2.5)	1.9 (1.8-2.1)	1.5 (1.4-1.7)	<0.001	<0.001
Lesion site	1.1 (0.8-1.3)	1.1 (0.8-1.2)	0.7 (0.5-1)	0.001	<0.001
MTJ	1.4 (1.3-1.6)	1.3 (1.2-1.4)	0.8 (0.7-1)	<0.001	<0.001
<i>Contralateral tendon thickness (mm)</i>					
OTJ	3.8 (3.7-4.1)	5 (4.7-5.4)	5.3 (5.2-5.6)	<0.001	0.005
Tendon body	4.7 (4.5-4.9)	4.9 (4.5-5.3)	4.7 (4.6-4.9)	n.s.	n.s.
MTJ	2.4 (2.1-2.5)	2.6 (2.4-3.1)	2.9 (2.6-3.1)	<0.001	n.s.
<i>SI of contralateral tendon</i>					
OTJ	1.1 (0.9-1.3)	1.5 (1.3-1.8)	1.6 (1.3-1.9)	<0.001	n.s.
Tendon body	2.3 (2.1-2.4)	1.8 (1.6-1.9)	1.9 (1.7-2)	<0.001	0.013
MTJ	1.2 (1-1.4)	1.2 (1-1.3)	1.1 (0.9-1.2)	n.s.	n.s.

**Tab 3.** Misurazione degli spessori tendinei dello S.I. nel corso di studio (da Busilacchi et al., KSSTA – 2016)

• **Correlazione tra S.I. lesionale e punteggio ATRS ad un anno di follow-up**

Il punteggio ATRS e valori dello Strain Index a livello della zona di lesione sono risultati negativamente correlati in maniera modesta. L'ampiezza dell'intervallo di confidenza indica un basso livello di precisione della stima, dovuta all'esigua numerosità delle osservazioni (Tabella 4).

Lesione S.I vs ATRS	Coefficiente [IC 95%]	p
	-0.42 [-0.70; -0.03]	0.03

Coefficiente di correlazione di Spearman

**Tab. 4:** Correlazione tra Lesione S.I. e punteggio ATRS ad 1 anno di follow-up

#### 6.4.4 - DISCUSSIONE

La lesione completa del tendine d'Achille costituisce una delle più frequenti rotture tendinee con un'incidenza in progressivo aumento<sup>233</sup>: si sta assistendo infatti all'aumento della popolazione attiva/sportiva (dove la rottura è conseguenza di traumi diretti o indiretti), ma anche all'aumento della speranza di vita che espone a maggior rischio il soggetto anziano. Peraltro l'aumentata incidenza di patologie croniche ed autoimmunitarie, il diabete, ma anche del ricorso a trattamenti antibiotici e chemioterapici<sup>234</sup> sembra condizionare il rischio relativo di rotture tendinee.

Esistono molti approcci al trattamento della lesione tendinea, dalla semplice immobilizzazione in apparecchio gessato alla chirurgia a cielo aperto<sup>235</sup>. Oggi però gli approcci chirurgici mini-invasivi, o percutanei, sembrano offrire il miglior compromesso i vantaggi della chirurgia a cielo aperto e la conservatività del gambaletto gessato<sup>236</sup>: è ormai acclarato che queste tecniche ripristinano con successo la continuità tendinea al costo di un accesso chirurgico ridotto e esente da rischi di lesione vascolo-nervosa o deiscenza.

Nonostante l'abbondante letteratura sull'argomento, è ancora poco chiaro quel che accade al tendine nel lungo termine dopo sutura, in termini di biologia della riparazione e circa la reale possibilità di *restitutio ad integrum*<sup>236-238</sup>. Dal punto di vista anatomo-patologico il tendine di Achille è composto di fasci paralleli di collagene I, i quali sono più resistenti e flessibili del collagene di tipo III.

Tuttavia il collagene di tipo III è quello che per primo si osserva durante il processo cicatriziale rispetto al collagene di tipo I<sup>239</sup>, sovvertendone le proprietà meccaniche: nei tendini infortunati infatti persiste una più alta percentuale di collagene III rispetto ai tendini normali: questa anomala composizione sarebbe la causa della debolezza tissutale<sup>240</sup>. Nelle lesioni

complete la struttura a fasci paralleli è alterata, con numerose fibre di collagene sottili, fragili e separate tra loro.

La stima della durezza o elasticità dei tessuti a fini diagnostici, è nota sin dalle origini della medicina. La sua più semplice ed immediata forma, la *palpazione*, è uno “strumento diagnostico” già utilizzato dagli Egizi nel 2600 a.C. come testimoniato da fonti Ippocratiche. La relazione fra l’elasticità tissutale e le caratteristiche palpatorie segue un semplice principio per cui, per essere palpabile in modo distinto, una parte anatomica deve differire per consistenza dai tessuti circostanti.

Nel 400 a.C., lo stesso Ippocrate già affermava “...*queste tumefazioni sono soffici, non dolenti ed elastiche alla palpazione...sono meno nocive di altre...quindi, quelle molto dolorose, dure e di ampio volume indicano pericolo; ma quelle che sono soffici alla pressione del dito e non dolorose sono associate più a forme croniche...*”<sup>241</sup>.

La palpazione del tendine di Achille è ancora oggi un valido strumento di diagnostica e di follow-up anche se le informazioni circa la consistenza del tessuto sono soggettive e non quantificabili; sono appunto legate all’estemporaneità dell’esame condotto dal medico.

Ad oggi l’ecografia B-Mode trasforma un segnale di radiofrequenza in un’immagine bi-dimensionale che ci fornisce solo informazioni morfologiche, senza poter qualificare e quantificare esattamente condizioni anatomo-patologiche e bio-meccaniche del tessuto esplorato.

L’elastosonografia viene come una metodica diagnostica non invasiva in grado di identificare l’elasticità di un tessuto in risposta ad una pressione esercitata<sup>185,242,243185,242,243184,241,242177,234,235177,233,234175,231,232158,214,215139,195,19616,172,173112,171,172,111,155,170,154,169,113</sup>, e dunque di chiarire quesiti biomeccanici irrisolti. A tal proposito il nostro studio pilota si è rivolto ad individuare le potenzialità dell’elastosonografia nel follow-up della riparazione del tendine di Achille. Tale argomento è relativamente nuovo, con un interesse



crescente, ma con pochi i lavori in letteratura indicativi delle finalità e delle reali potenzialità di questa nuova metodica<sup>110; 111; 113</sup>.

L'elastosonografia, sfruttando molte più informazioni ricavabili dagli ultrasuoni in B-Mode, in base alla risposta del tessuto alla radiofrequenza può confermarci la consistenza, l'omogeneità e l'elasticità di un tessuto. Il tendine, dotato di una sua compattezza ed elasticità, possa essere un tessuto in cui l'elastosonografia trova una sua utilità: in particolare il tendine d'Achille, per le sue dimensioni e per la sua superficialità risulta facilmente esplorabile.

Nell'unico studio comparabile col nostro per disegno e obiettivi, Tan<sup>244</sup> valutava 19 tendini d'Achille di calciatori agonisti dopo ricostruzione chirurgica vs soggetti sani volontari, trovando diversi pattern di consistenza più rigida rispetto al normale. La ragione più probabile è che ciò sia conseguenza di un tessuto cicatriziale disorganizzato e in fase di rimodellamento. L'Autore, che utilizzava ampie finestre con ROI molto estese, analogamente al nostro studio suddivideva l'indagine elastosonografica in zone anatomiche ed effettuava l'analisi con sonda posizionata longitudinalmente. Ne concludeva che la porzione prossimale (giunzione miotendinea) del tendine di Achille trattato mostrava una consistenza omogenea, mentre la parte distale e centrale erano costantemente disomogenee. La porzione prossimale appariva inoltre più rigida rispetto al corpo tendineo ed all'inserzione calcaneare in modo altamente significativo. Infine, tra corpo ed inserzione calcaneare non sussisteva particolare differenza di elasticità.

Nello studio qui presentato al nostro studio, i diametri tendinei del lato trattato durante il follow-up risultano in linea con quanto riportato da uno studio di Gigante et al.<sup>236</sup> che già osservava una graduale tendenza a rientrare in range fisiologici dopo 1 anno. Qui si rileva in aggiunta il raggiungimento di un picco di spessore ai 6 mesi dall'intervento.

Si osserva inoltre, che mentre nel tendine trattato lo spessore è chiaramente condizionato dal processo cicatriziale in atto, anche nel tendine controlaterale lo spessore varia leggermente rispetto ai volontari sani: ciò è attribuibile verosimilmente sovraccarico funzionale nella fase di convalescenza. Tra i vari valori in particolare spicca un aumento di spessore dell'entesi del lato controlaterale, mentre il corpo tendineo e la giunzione miotendinea rimangono tendenzialmente invariati e comparabili col tendine sano.

Dal punto di vista elastosonografico, considerando la scala di colori, non ci siamo concentrati a tipizzare i pattern dei tendini, anche perché la letteratura, fornisce già classificazioni e tipizzazioni cromatiche non di univoca interpretazione (in quanto dipendenti dall'ecografo in dotazione).

Ciò che però va segnalato è che anche nei tendini sani, frequentemente si è riscontrato un pattern disomogeneo, con striature giallo/verdi o giallo/rosse nella massa di tessuto blu: ciò porta a farci ritenere che il colore non sia così identificativo di patologia, ma piuttosto di disomogeneità strutturale.

Lo Strain Index del lato trattato, mostra una tendenza a diminuire nel tempo, in particolar modo per la zona di lesione dove il processo cicatriziale crea una struttura "anelastica", ovvero compatta e meno deformabile rispetto al tessuto di controllo (grasso dello spazio di Kager). Questa informazione va ad implementare il dato "grezzo" fornitoci dall'ecostruttura "disomogenea" con la tradizionale ecografia in B-Mode, ma ancora non siamo in grado di associare a queste informazioni un dato anatomo-patologico univoco.

La valutazione clinica tramite l'ATRS score ha dato modo di confermare quanto già pubblicato<sup>236</sup>, in merito ai vantaggi della tecnica di tenorrafia percutanea per la sua mini-invasività ed il minor tasso di complicanze vascolari, neurologiche e cutanee rispetto alla tecnica open.

L'outcome clinico, inaspettatamente, si correla in modo inversamente proporzionale al dato elastosonografico: mentre all'elastosonografia il tendine riparato appare più anelastico nel tempo, il benessere del paziente incrementa progressivamente, al punto che i pazienti considerano il lato operato del tutto uguale al periodo antecedente la lesione nonostante le quantificabili differenze di aspetto e struttura. Una spiegazione possibile si può trovar in meccanismi muscolari ed articolari in grado di compensare la rigidità tendinea e garantire comunque un'adeguata funzionalità dell'unità morfo-funzionale dei flessori della caviglia/piede.

Dato certo che emerge con questo studio, è che nonostante dal punto di vista anatomopatologico e clinico si ritenga un tendine ben rimodellato già ad un anno dal trattamento<sup>31</sup>, dal punto di vista elastosonografico e dunque biomeccanico, ciò non è altrettanto affermabile. Un più lungo follow-up di questi pazienti e l'inclusione di nuovi casi per ottenere un campione più consistente potrebbe dirci *se e quando* si verifichi realmente questa "*restitutio ad integrum tendinea*".

E' da notare, concludendo, come la ricerca scientifica sul tema si sia evoluta in questi decenni: partita da uno studio morfologico-macroscopico nella prima metà del '900, è passata ad uno studio anatomo-patologico degli anni Settanta-Ottanta, seguita da uno studio biomeccanico degli anni Novanta-Duemila. Oggi, come ormai riferito in vari ambiti dell'Ortopedica, si è entrati nella ricerca "Meccano-Biologica"<sup>245</sup>, in cui si cerca di spiegare il dato anatomo-patologico in funzione di quello meccanico, e studi come il presente sono da considerarsi come l'inizio di un percorso in questa direzione, con i suoi numerosi limiti da superare e lati oscuri da svelare.

#### 6.4.5- LIMITI DELLO STUDIO.

- Trattandosi di uno dei primi studi clinici in materia che affronti il follow up su paziente, il campione di studio è molto esiguo, ma superiore alle *case series* riportate in letteratura;
- Non è stato possibile, far corrispondere il dato cromatico elastografico e lo strain index ad uno preciso pattern anatomico-patologico.;
- Non è stato possibile considerare le caratteristiche del muscolo nel tempo, dal punto di vista elastosonografico, così da poter riscontrare atteggiamenti di compenso all'irrigidimento della cicatrice tendinea e spiegare una possibile relazione con il miglioramento dell'ATRS.
- Lo Strain Index *non* può essere interpretato come *assoluto* ed è affetto da una potenziale variabilità intra- ed inter-osservatore legata alla pressione esercitata dall'operatore. Tuttavia con un più ampio numero di soggetti sani si potrebbe creare un range of normal più consolidato e creare così uno strain index "normalizzato".
- Lo studio è carente di una valutazione dinamometrica da comparare il dato elastosonografico; va considerato che la dinamometria studia tutta l'unità morfo funzionale del tricipite surale-Achille-piede, senza discriminare il solo tendine.

## 6.5 RILEVANZA CLINICA E PROSPETTIVE DI STUDIO FUTURE.

L'elastosonografia nel tendine d'Achille si è dimostrata un valido e nuovo strumento diagnostico per quelle alterazioni strutturali/biomeccaniche del tessuto tendineo.

Nel tendine trattato chirurgicamente ci conferma che ad un anno dall'intervento, dal punto di vista bio-meccanico, non si può sostenere che vi sia *restitutio ad integrum*. Questo dato non si correla al dato clinico estratto dal questionario ATRS, che mostra un recupero totale e un outcome medio "eccellente". Un più lungo follow up dei pazienti reclutati potrebbe pertanto portarci a definire quanto tempo realmente occorra al tendine trattato per tornare ad una fisiologica tensione ed "elasto-struttura".

Come già emerge dalla crescente e recentissima letteratura a riguardo questo ambito di diagnostica sarà sempre più introdotto nella pratica clinica per lo studio della fisiopatologia dei disturbi tendinei, ma anche per la diagnosi precoce e la individuazione di situazioni a rischio di evolutività, come pure nel follow up di trattamenti conservativi o o chirurgici.

## Bibliografia

1. Kivi P. [Occupational tenosynovitis and peritendinitis of the arm and hand]. *Duodecim; laaketieteellinen aikakauskirja*. 1981;97(11):729-736.
2. Andarawis-Puri N, Flatow EL, Soslowky LJ. Tendon Basic Science: Development, Repair, Regeneration, and Healing. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2015;33(6):780-784.
3. Woo SL. Mechanical properties of tendons and ligaments. I. Quasi-static and nonlinear viscoelastic properties. *Biorheology*. 1982;19(3):385-396.
4. Woo SL, Fisher MB, Feola AJ. Contribution of biomechanics to management of ligament and tendon injuries. *Molecular & cellular biomechanics : MCB*. 2008;5(1):49-68.
5. Woo SL, Orlando CA, Camp JF, Akeson WH. Effects of postmortem storage by freezing on ligament tensile behavior. *Journal of biomechanics*. 1986;19(5):399-404.
6. Jarvinen M. Epidemiology of tendon injuries in sports. *Clinics in sports medicine*. 1992;11(3):493-504.
7. van Mechelen W. Running injuries. A review of the epidemiological literature. *Sports medicine*. 1992;14(5):320-335.
8. Noonan TJ, Garrett WE, Jr. Injuries at the myotendinous junction. *Clinics in sports medicine*. 1992;11(4):783-806.
9. Woo SL, Lee TQ, Gomez MA, Sato S, Field FP. Temperature dependent behavior of the canine medial collateral ligament. *J Biomech Eng*. 1987;109(1):68-71.
10. Butler DL, Grood ES, Noyes FR, Zernicke RF. Biomechanics of ligaments and tendons. *Exercise and sport sciences reviews*. 1978;6:125-181.
11. Nathan H, Goldgefter L, Kobylansky E, Goldschmidt-Nathan M, Morein G. Energy absorbing capacity of rat tail tendon at various ages. *Journal of anatomy*. 1978;127(Pt 3):589-593.
12. Akeson WH, Amiel D, Woo SL. Immobility effects on synovial joints the pathomechanics of joint contracture. *Biorheology*. 1980;17(1-2):95-110.
13. Tipton CM, Matthes RD, Maynard JA, Carey RA. The influence of physical activity on ligaments and tendons. *Med Sci Sports*. 1975;7(3):165-175.
14. Tipton CM, James SL, Mergner W, Tchong TK. Influence of exercise on strength of medial collateral knee ligaments of dogs. *The American journal of physiology*. 1970;218(3):894-902.

15. Noyes FR, DeLucas JL, Torvik PJ. Biomechanics of anterior cruciate ligament failure: an analysis of strain-rate sensitivity and mechanisms of failure in primates. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 1974;56(2):236-253.
16. Tipton CM, Matthes RD, Sandage DS. In situ measurement of junction strength and ligament elongation in rats. *J Appl Physiol (1985)*. 1974;37(5):758-761.
17. Woo SL, Gomez MA, Amiel D, Ritter MA, Gelberman RH, Akeson WH. The effects of exercise on the biomechanical and biochemical properties of swine digital flexor tendons. *Journal of biomechanical engineering*. 1981;103(1):51-56.
18. Cabaud HE, Chatty A, Gildengorin V, Feltman RJ. Exercise effects on the strength of the rat anterior cruciate ligament. *The American journal of sports medicine*. 1980;8(2):79-86.
19. Tipton CM, Matthes RD, Martin RK. Influence of age and sex on the strength of bone-ligament junctions in knee joints of rats. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 1978;60(2):230-234.
20. Murphy P, Frank C, Hart D. The cell biology of ligaments and ligament healing. In: Ed. J, ed. *he anterior cruciate ligament: current and future concepts*. New York: Raven Press,; 1993.
21. Eskeland G, Eskeland T, Hovig T, Teigland J. The ultrastructure of normal digital flexor tendon sheath and of the tissue formed around silicone and polyethylene implants in man. *The Journal of bone and joint surgery British volume*. 1977;59(2):206-212.
22. Sharma P, Maffulli N. Biology of tendon injury: healing, modeling and remodeling. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions*. 2006;6(2):181-190.
23. Kannus P, Jozsa L. Histopathological changes preceding spontaneous rupture of a tendon. A controlled study of 891 patients. *J Bone Joint Surg Am*. 1991;73(10):1507-1525.
24. Williams JG. Achilles tendon lesions in sport. *Sports medicine*. 1993;16(3):216-220.
25. Arndt AN, Komi PV, Bruggemann GP, Lukkariniemi J. Individual muscle contributions to the in vivo achilles tendon force. *Clin Biomech (Bristol, Avon)*. 1998;13(7):532-541.
26. Riley GP, Curry V, DeGroot J, et al. Matrix metalloproteinase activities and their relationship with collagen remodelling in tendon pathology. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 2002;21(2):185-195.
27. Maffulli N, Barrass V, Ewen SW. Light microscopic histology of achilles tendon ruptures. A comparison with unruptured tendons. *The American journal of sports medicine*. 2000;28(6):857-863.

28. Khan KM, Cook JL, Bonar F, Harcourt P, Astrom M. Histopathology of common tendinopathies. Update and implications for clinical management. *Sports Med.* 1999;27(6):393-408.
29. Amiel D, Billings J, Akeson WH. Ligament structure, chemistry, and physiology. In: al. DDe, ed. *Knee ligament: Structure, fuction, injury and repair.* 1990.
30. Wrenn DS, Griffin GL, Senior RM, Mecham RP. Characterization of biologically active domains on elastin: identification of a monoclonal antibody to a cell recognition site. *Biochemistry.* 1986;25(18):5172-5176.
31. de Palma L, Gigante A, Rapali S. I processi riparativi delle lesioni tendinee. "Progressi in Medicina e Chirurgia del piede" -Il piede nello sport-. Vol 7. Bologna: Aulo Gaggi Ed.; 1998:13-23.
32. Oakes B. Tissue healing and repair: tendons and ligaments. In: WR F, ed. *Rehabilitation of Sports Injuries: Scientific Basis.* Oxford: Blackwell Science; 2003:56-98.
33. Tillman L, Chasan NP. roperties of dense connective tissue and wound healing. In: Hertling D KRM, ed. *Management of Common Musculoskeletal Disorders.* Philadelphia: Lippincott; 1996.
34. Abrahamsson SO. Matrix metabolism and healing in the flexor tendon. Experimental studies on rabbit tendon. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg Suppl.* 1991;23:1-51.
35. Gigante A, Specchia N, Rapali S, Ventura A, de Palma L. Fibrillogenesis in tendon healing: an experimental study. *Boll Soc Ital Biol Sper.* 1996;72(7-8):203-210.
36. Murrell GA, Lilly EG, 3rd, Goldner RD, Seaber AV, Best TM. Effects of immobilization on Achilles tendon healing in a rat model. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society.* 1994;12(4):582-591.
37. Best TM, Collins A, Lilly EG, Seaber AV, Goldner R, Murrell GA. Achilles tendon healing: a correlation between functional and mechanical performance in the rat. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society.* 1993;11(6):897-906.
38. Uthoff HK, Sarkar K. Surgical repair of rotator cuff ruptures. The importance of the subacromial bursa. *The Journal of bone and joint surgery British volume.* 1991;73(3):399-401.
39. Murrell GA, Szabo C, Hannafin JA, et al. Modulation of tendon healing by nitric oxide. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al].* 1997;46(1):19-27.
40. Bruns J, Kampen J, Kahrs J, Plitz W. Achilles tendon rupture: experimental results on spontaneous repair in a sheep-model. *Knee*



- surgery, sports traumatology, arthroscopy : official journal of the ESSKA*. 2000;8(6):364-369.
41. Serini G, Gabbiani G. Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation. *Experimental cell research*. 1999;250(2):273-283.
  42. Weiler A, Unterhauser FN, Bail HJ, Huning M, Haas NP. Alpha-smooth muscle actin is expressed by fibroblastic cells of the ovine anterior cruciate ligament and its free tendon graft during remodeling. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2002;20(2):310-317.
  43. Tuncay I, Ozbek H, Atik B, Ozen S, Akpınar F. Effects of hyaluronic acid on postoperative adhesion of tendo calcaneus surgery: an experimental study in rats. *The Journal of foot and ankle surgery : official publication of the American College of Foot and Ankle Surgeons*. 2002;41(2):104-108.
  44. Khan U, Occleston NL, Khaw PT, McGrouther DA. Single exposures to 5-fluorouracil: a possible mode of targeted therapy to reduce contractile scarring in the injured tendon. *Plastic and reconstructive surgery*. 1997;99(2):465-471.
  45. Khan U, Kakar S, Akali A, Bentley G, McGrouther DA. Modulation of the formation of adhesions during the healing of injured tendons. *The Journal of bone and joint surgery British volume*. 2000;82(7):1054-1058.
  46. Forde MS, Punnett L, Wegman DH. Prevalence of musculoskeletal disorders in union ironworkers. *Journal of occupational and environmental hygiene*. 2005;2(4):203-212.
  47. Riley G. Tendinopathy--from basic science to treatment. *Nature clinical practice Rheumatology*. 2008;4(2):82-89.
  48. Kalra EK. Nutraceutical--definition and introduction. *AAPS pharmSci*. 2003;5(3):E25.
  49. Legerlotz K, Riley GP, Screen HR. GAG depletion increases the stress-relaxation response of tendon fascicles, but does not influence recovery. *Acta biomaterialia*. 2013;9(6):6860-6866.
  50. Lippiello L. Collagen Synthesis in tenocytes, ligament cells and chondrocytes exposed to a combination of Glucosamine HCl and chondroitin sulfate. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*. 2007;4(2):219-224.
  51. Moraes JR, Facco GG, Moraes FR, Engracia Filho JR, Miyazato LG, Beretta DC. Effects of glycosaminoglycan polysulphate on the organisation of collagen fibres in experimentally induced tendonitis in horses. *The Veterinary record*. 2009;165(7):203-205.
  52. Oryan A, Goodship AE, Silver IA. Response of a collagenase-induced tendon injury to treatment with a polysulphated

- glycosaminoglycan (Adequan). *Connective tissue research*. 2008;49(5):351-360.
53. Oryan A, Moshiri A, Meimandiparizi AH. Effects of sodium-hyaluronate and glucosamine-chondroitin sulfate on remodeling stage of tenotomized superficial digital flexor tendon in rabbits: a clinical, histopathological, ultrastructural, and biomechanical study. *Connective tissue research*. 2011;52(4):329-339.
  54. Ozer H, Taskesen A, Kul O, Selek HY, Turanlı S, Kose K. [Effect of glucosamine chondroitine sulphate on repaired tenotomized rat Achilles tendons]. *Eklem hastalıkları ve cerrahisi = Joint diseases & related surgery*. 2011;22(2):100-106.
  55. Perea S. Nutritional management of osteoarthritis. *Compendium (Yardley, PA)*. 2012;34(5):E4.
  56. Sundqvist H, Forsskahl B, Kvist M. A promising novel therapy for Achilles peritendinitis: double-blind comparison of glycosaminoglycan polysulfate and high-dose indomethacin. *International journal of sports medicine*. 1987;8(4):298-303.
  57. Anttinen H, Puistola U, Pihlajaniemi T, Kivirikko KI. Differences between proline and lysine hydroxylations in their inhibition by zinc or by ascorbate deficiency during collagen synthesis in various cell types. *Biochimica et biophysica acta*. 1981;674(3):336-344.
  58. Hung LK, Fu SC, Lee YW, Mok TY, Chan KM. Local vitamin-C injection reduced tendon adhesion in a chicken model of flexor digitorum profundus tendon injury. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2013;95(7):e41.
  59. Kao WW, Berg RA, Prockop DJ. Ascorbate increases the synthesis of procollagen hydroxyproline by cultured fibroblasts from chick embryo tendons without activation of prolyl hydroxylase. *Biochimica et biophysica acta*. 1975;411(2):202-215.
  60. Kao WW, Flaks JG, Prockop DJ. Primary and secondary effects of ascorbate on procollagen synthesis and protein synthesis by primary cultures of tendon fibroblasts. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1976;173(2):638-648.
  61. Kipp DE, Schwarz RI. Effectiveness of isoascorbate versus ascorbate as an inducer of collagen synthesis in primary avian tendon cells. *The Journal of nutrition*. 1990;120(2):185-189.
  62. Lyons BL, Schwarz RI. Ascorbate stimulation of PAT cells causes an increase in transcription rates and a decrease in degradation rates of procollagen mRNA. *Nucleic acids research*. 1984;12(5):2569-2579.
  63. Omeroglu S, Peker T, Turkozkan N, Omeroglu H. High-dose vitamin C supplementation accelerates the Achilles tendon healing in healthy rats. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*. 2009;129(2):281-286.

64. Quinones SR, Neblock DS, Berg RA. Regulation of collagen production and collagen mRNA amounts in fibroblasts in response to culture conditions. *The Biochemical journal*. 1986;239(1):179-183.
65. Rigby BJ, Mitchell TW. In vitro studies of the interaction between ascorbic acid and rat tail tendon. *Biochimica et biophysica acta*. 1978;544(1):62-68.
66. Russell JE, Manske PR. Ascorbic acid requirement for optimal flexor tendon repair in vitro. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 1991;9(5):714-719.
67. Schwarz RI. Procollagen secretion meets the minimum requirements for the rate-controlling step in the ascorbate induction of procollagen synthesis. *The Journal of biological chemistry*. 1985;260(5):3045-3049.
68. Schwarz RI, Bissell MJ. Dependence of the differentiated state on the cellular environment: modulation of collagen synthesis in tendon cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1977;74(10):4453-4457.
69. Schwarz RI, Kleinman P, Owens N. Ascorbate can act as an inducer of the collagen pathway because most steps are tightly coupled. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1987;498:172-185.
70. Schwarz RI, Mandell RB, Bissell MJ. Ascorbate induction of collagen synthesis as a means for elucidating a mechanism of quantitative control of tissue-specific function. *Molecular and cellular biology*. 1981;1(9):843-853.
71. Wei W, Liu Y, Yang X, et al. Fractionation of 50kGy electron beam irradiation: effects on biomechanics of human flexor digitorum superficialis tendons treated with ascorbate. *Journal of biomechanics*. 2013;46(4):658-661.
72. Bello AE, Oesser S. Collagen hydrolysate for the treatment of osteoarthritis and other joint disorders: a review of the literature. *Current medical research and opinion*. 2006;22(11):2221-2232.
73. Minaguchi J, Koyama Y, Meguri N, et al. Effects of ingestion of collagen peptide on collagen fibrils and glycosaminoglycans in Achilles tendon. *Journal of nutritional science and vitaminology*. 2005;51(3):169-174.
74. Ragle RL, Sawitzke AD. Nutraceuticals in the management of osteoarthritis : a critical review. *Drugs & aging*. 2012;29(9):717-731.
75. Bode-Boger SM, Boger RH, Galland A, Tsikas D, Frolich JC. L-arginine-induced vasodilation in healthy humans: pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship. *British journal of clinical pharmacology*. 1998;46(5):489-497.

76. Bokhari AR, Murrell GA. The role of nitric oxide in tendon healing. *Journal of shoulder and elbow surgery / American Shoulder and Elbow Surgeons [et al]*. 2012;21(2):238-244.
77. Darmani H, Crossan J, McLellan SD, Meek D, Adam C. Expression of nitric oxide synthase and transforming growth factor-beta in crush-injured tendon and synovium. *Mediators of inflammation*. 2004;13(5-6):299-305.
78. Darmani H, Crossan JC, Curtis A. Single dose of inducible nitric oxide synthase inhibitor induces prolonged inflammatory cell accumulation and fibrosis around injured tendon and synovium. *Mediators of inflammation*. 2004;13(3):157-164.
79. Gornik HL, Creager MA. Arginine and endothelial and vascular health. *The Journal of nutrition*. 2004;134(10 Suppl):2880S-2887S; discussion 2895S.
80. Gumina S, Passaretti D, Gurzi MD, Candela V. Arginine L-alpha-ketoglutarate, methylsulfonylmethane, hydrolyzed type I collagen and bromelain in rotator cuff tear repair: a prospective randomized study. *Current medical research and opinion*. 2012;28(11):1767-1774.
81. Kashida Y, Kato M. Possible involvement of nitric oxide in the quinolone-induced tendon lesions in rats. *Drugs under experimental and clinical research*. 1997;23(3-4):139-143.
82. Kharitonov SA, Lubec G, Lubec B, Hjelm M, Barnes PJ. L-arginine increases exhaled nitric oxide in normal human subjects. *Clinical science (London, England : 1979)*. 1995;88(2):135-139.
83. Lin JH, Wang MX, Wei A, Zhu W, Diwan AD, Murrell GA. Temporal expression of nitric oxide synthase isoforms in healing Achilles tendon. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2001;19(1):136-142.
84. Moraes SA, Oliveira KR, Crespo-Lopez ME, Picanco-Diniz DL, Herculano AM. Local NO synthase inhibition produces histological and functional recovery in Achilles tendon of rats after tenotomy: tendon repair and local NOS inhibition. *Cell and tissue research*. 2013;353(3):457-463.
85. Murrell GA. Oxygen free radicals and tendon healing. *Journal of shoulder and elbow surgery / American Shoulder and Elbow Surgeons [et al]*. 2007;16(5 Suppl):S208-214.
86. Murrell GA. Using nitric oxide to treat tendinopathy. *British journal of sports medicine*. 2007;41(4):227-231.
87. Murrell GA, Szabo C, Hannafin JA, et al. Modulation of tendon healing by nitric oxide. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]*. 1997;46(1):19-27.

88. Notarnicola A, Pesce V, Vicenti G, Tafuri S, Forcignano M, Moretti B. SWAAT study: extracorporeal shock wave therapy and arginine supplementation and other nutraceuticals for insertional Achilles tendinopathy. *Advances in therapy*. 2012;29(9):799-814.
89. Reihnsner R, Menzel EJ. The influence of L-arginine on biomechanical parameters of native and nonenzymatically glycosylated rat tail tendons. *Connective tissue research*. 1994;31(1):55-65.
90. Tomiosso TC, Nakagaki WR, Gomes L, Hyslop S, Pimentel ER. Organization of collagen bundles during tendon healing in rats treated with L-NAME. *Cell and tissue research*. 2009;337(2):235-242.
91. Xia W, Szomor Z, Wang Y, Murrell GA. Nitric oxide enhances collagen synthesis in cultured human tendon cells. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2006;24(2):159-172.
92. Arbiser JL, Klauber N, Rohan R, et al. Curcumin is an in vivo inhibitor of angiogenesis. *Molecular medicine (Cambridge, Mass)*. 1998;4(6):376-383.
93. Buhrmann C, Mobasher A, Busch F, et al. Curcumin modulates nuclear factor kappaB (NF-kappaB)-mediated inflammation in human tenocytes in vitro: role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(32):28556-28566.
94. Pari L, Murugan P. Influence of tetrahydrocurcumin on tail tendon collagen contents and its properties in rats with streptozotocin-nicotinamide-induced type 2 diabetes. *Fundamental & clinical pharmacology*. 2007;21(6):665-671.
95. Sajithlal GB, Chithra P, Chandrakasan G. Effect of curcumin on the advanced glycation and cross-linking of collagen in diabetic rats. *Biochemical pharmacology*. 1998;56(12):1607-1614.
96. Abdel-Tawab M, Werz O, Schubert-Zsilavecz M. Boswellia serrata: an overall assessment of in vitro, preclinical, pharmacokinetic and clinical data. *Clinical pharmacokinetics*. 2011;50(6):349-369.
97. Ammon HP. [Boswellic acids (components of frankincense) as the active principle in treatment of chronic inflammatory diseases]. *Wiener medizinische Wochenschrift (1946)*. 2002;152(15-16):373-378.
98. Ammon HP. Modulation of the immune system by Boswellia serrata extracts and boswellic acids. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*. 2010;17(11):862-867.
99. Notarnicola A, Tafuri S, Fusaro L, Moretti L, Pesce V, Moretti B. The "MESACA" study: methylsulfonylmethane and boswellic acids in the treatment of gonarthrosis. *Advances in therapy*. 2011;28(10):894-906.

100. Roy S, Khanna S, Krishnaraju AV, et al. Regulation of vascular responses to inflammation: inducible matrix metalloproteinase-3 expression in human microvascular endothelial cells is sensitive to antiinflammatory Boswellia. *Antioxidants & redox signaling*. 2006;8(3-4):653-660.
101. Sengupta K, Kolla JN, Krishnaraju AV, et al. Cellular and molecular mechanisms of anti-inflammatory effect of Aflapin: a novel Boswellia serrata extract. *Molecular and cellular biochemistry*. 2011;354(1-2):189-197.
102. Sengupta K, Krishnaraju AV, Vishal AA, et al. Comparative efficacy and tolerability of 5-Loxin and Aflapin Against osteoarthritis of the knee: a double blind, randomized, placebo controlled clinical study. *International journal of medical sciences*. 2010;7(6):366-377.
103. Nakhostin-Roohi B, Niknam Z, Vaezi N, Mohammadi S, Bohlooli S. Effect of single dose administration of methylsulfonylmethane on oxidative stress following acute exhaustive exercise. *Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR*. 2013;12(4):845-853.
104. Ebisuzaki K. Aspirin and methylsulfonylmethane (MSM): a search for common mechanisms, with implications for cancer prevention. *Anticancer research*. 2003;23(1A):453-458.
105. Horvath K, Noker PE, Somfai-Relle S, Glavits R, Financsek I, Schauss AG. Toxicity of methylsulfonylmethane in rats. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2002;40(10):1459-1462.
106. Kim YH, Kim DH, Lim H, Baek DY, Shin HK, Kim JK. The anti-inflammatory effects of methylsulfonylmethane on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in murine macrophages. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2009;32(4):651-656.
107. Magnuson BA, Appleton J, Ames GB. Pharmacokinetics and distribution of [35S]methylsulfonylmethane following oral administration to rats. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2007;55(3):1033-1038.
108. Usha PR, Naidu MU. Randomised, Double-Blind, Parallel, Placebo-Controlled Study of Oral Glucosamine, Methylsulfonylmethane and their Combination in Osteoarthritis. *Clinical drug investigation*. 2004;24(6):353-363.
109. Aiyegbusi AI, Duru FI, Anunobi CC, Noronha CC, Okanlawon AO. Bromelain in the early phase of healing in acute crush Achilles tendon injury. *Phytotherapy research : PTR*. 2011;25(1):49-52.
110. Aiyegbusi AI, Duru FI, Awelimobor D, Noronha CC, Okanlawon AO. The role of aqueous extract of pineapple fruit parts on the

- healing of acute crush tendon injury. *Nigerian quarterly journal of hospital medicine*. 2010;20(4):223-227.
111. Aiyegbusi AI, Olabiyi OO, Duru FI, Noronha CC, Okanlawon AO. A comparative study of the effects of bromelain and fresh pineapple juice on the early phase of healing in acute crush achilles tendon injury. *Journal of medicinal food*. 2011;14(4):348-352.
  112. Fitzhugh DJ, Shan S, Dewhirst MW, Hale LP. Bromelain treatment decreases neutrophil migration to sites of inflammation. *Clinical immunology (Orlando, Fla)*. 2008;128(1):66-74.
  113. Seltzer AP. A DOUBLE-BLIND STUDY OF BROMELAINS IN THE TREATMENT OF EDEMA AND ECCHYMOSES FOLLOWING SURGICAL AND NONSURGICAL TRAUMA TO THE FACE. *Eye, ear, nose & throat monthly*. 1964;43:54-57.
  114. Seltzer AP. [REDUCTION OF POSTOPERATIVE EDEMA AND ECCHYMOSES BY MEANS OF AN ORAL ENZYME (BROMELIN). CONTROLLED STUDY ON 53 CASES OF RHINOPLASTY]. *Minerva medica*. 1965;56:SUPPL:34-36.
  115. Gelse K, Poschl E, Aigner T. Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Advanced drug delivery reviews*. 2003;55(12):1531-1546.
  116. Nelson JM, Diegelmann RF, Cohen IK. Effect of beta-aminopropionitrile and ascorbate on fibroblast migration. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY)*. 1988;188(3):346-352.
  117. Shakibaei M, Buhrmann C, Mobasheri A. Anti-inflammatory and anti-catabolic effects of TENDOACTIVE(R) on human tenocytes in vitro. *Histology and histopathology*. 2011;26(9):1173-1185.
  118. Szczurko O, Cooley K, Mills EJ, Zhou Q, Perri D, Seely D. Naturopathic treatment of rotator cuff tendinitis among Canadian postal workers: a randomized controlled trial. *Arthritis and rheumatism*. 2009;61(8):1037-1045.
  119. Busilacchi A, Olivieri M, Ulisse S, et al. Real-time sonoelastography as novel follow-up method in Achilles tendon surgery. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy : official journal of the ESSKA*. 2016;24(7):2124-2132.
  120. Edwards DR, Murphy G, Reynolds JJ, et al. Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. *EMBO J*. 1987;6(7):1899-1904.
  121. Leask A, Holmes A, Abraham DJ. Connective tissue growth factor: a new and important player in the pathogenesis of fibrosis. *Curr Rheumatol Rep*. 2002;4(2):136-142.

122. Blom IE, Goldschmeding R, Leask A. Gene regulation of connective tissue growth factor: new targets for antifibrotic therapy? *Matrix Biol.* 2002;21(6):473-482.
123. Tsubone T, Moran SL, Amadio PC, Zhao C, An KN. Expression of growth factors in canine flexor tendon after laceration in vivo. *Ann Plast Surg.* 2004;53(4):393-397.
124. Gabra N, Khayat A, Calabresi P, Khiat A. Detection of elevated basic fibroblast growth factor during early hours of in vitro angiogenesis using a fast ELISA immunoassay. *Biochemical and biophysical research communications.* 1994;205(2):1423-1430.
125. Kobayashi D, Kurosaka M, Yoshiya S, Mizuno K. Effect of basic fibroblast growth factor on the healing of defects in the canine anterior cruciate ligament. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 1997;5(3):189-194.
126. Chan BP, Chan KM, Maffulli N, Webb S, Lee KK. Effect of basic fibroblast growth factor. An in vitro study of tendon healing. *Clin Orthop Relat Res.* 1997(342):239-247.
127. Skutek M, van Griensven M, Zeichen J, Brauer N, Bosch U. Cyclic mechanical stretching modulates secretion pattern of growth factors in human tendon fibroblasts. *Eur J Appl Physiol.* 2001;86(1):48-52.
128. Tsuzaki M, Bynum D, Almekinders L, Yang X, Faber J, Banes AJ. ATP modulates load-inducible IL-1beta, COX 2, and MMP-3 gene expression in human tendon cells. *J Cell Biochem.* 2003;89(3):556-562.
129. Unemori EN, Ehsani N, Wang M, Lee S, McGuire J, Amento EP. Interleukin-1 and transforming growth factor-alpha: synergistic stimulation of metalloproteinases, PGE2, and proliferation in human fibroblasts. *Exp Cell Res.* 1994;210(2):166-171.
130. Bennett NT, Schultz GS. Growth factors and wound healing: Part II. Role in normal and chronic wound healing. *Am J Surg.* 1993;166(1):74-81.
131. Bennett NT, Schultz GS. Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors. *Am J Surg.* 1993;165(6):728-737.
132. Pierce GF, Mustoe TA. Pharmacologic enhancement of wound healing. *Annu Rev Med.* 1995;46:467-481.
133. Wozney JM, Rosen V. Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. *Clin Orthop Relat Res.* 1998(346):26-37.
134. Tsumaki N, Tanaka K, Arikawa-Hirasawa E, et al. Role of CDMP-1 in skeletal morphogenesis: promotion of mesenchymal cell recruitment and chondrocyte differentiation. *J Cell Biol.* 1999;144(1):161-173.



135. Towler DA, Gelberman RH. The alchemy of tendon repair: a primer for the (S)mad scientist. *J Clin Invest.* 2006;116(4):863-866.
136. Abrahamsson SO. Similar effects of recombinant human insulin-like growth factor-I and II on cellular activities in flexor tendons of young rabbits: experimental studies in vitro. *J Orthop Res.* 1997;15(2):256-262.
137. Dahlgren LA, van der Meulen MC, Bertram JE, Starrak GS, Nixon AJ. Insulin-like growth factor-I improves cellular and molecular aspects of healing in a collagenase-induced model of flexor tendinitis. *J Orthop Res.* 2002;20(5):910-919.
138. Dahlgren LA, Mohammed HO, Nixon AJ. Expression of insulin-like growth factor binding proteins in healing tendon lesions. *J Orthop Res.* 2006;24(2):183-192.
139. Woo SL, Debski RE, Zeminski J, Abramowitch SD, Saw SS, Fenwick JA. Injury and repair of ligaments and tendons. *Annu Rev Biomed Eng.* 2000;2:83-118.
140. Forslund C, Rueger D, Aspenberg P. A comparative dose-response study of cartilage-derived morphogenetic protein (CDMP)-1, -2 and -3 for tendon healing in rats. *J Orthop Res.* 2003;21(4):617-621.
141. Slater M, Patava J, Kingham K, Mason RS. Involvement of platelets in stimulating osteogenic activity. *J Orthop Res.* 1995;13(5):655-663.
142. Everts PA, Devilee RJ, Oosterbos CJ, et al. Autologous platelet gel and fibrin sealant enhance the efficacy of total knee arthroplasty: improved range of motion, decreased length of stay and a reduced incidence of arthrofibrosis. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2007;15(7):888-894.
143. Everts PA, Brown Mahoney C, Hoffmann JJ, et al. Platelet-rich plasma preparation using three devices: implications for platelet activation and platelet growth factor release. *Growth Factors.* 2006;24(3):165-171.
144. Everts PA, Hoffmann J, Weibrich G, et al. Differences in platelet growth factor release and leucocyte kinetics during autologous platelet gel formation. *Transfus Med.* 2006;16(5):363-368.
145. Pietrzak WS, Eppley BL. Platelet rich plasma: biology and new technology. *J Craniofac Surg.* 2005;16(6):1043-1054.
146. Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant dentistry.* 2001;10(4):225-228.
147. Manunta AF, Manconi A. The treatment of chondral lesions of the knee with the microfracture technique and platelet-rich plasma. *Joints.* 2013;1(4):167-170.
148. Anitua E, Andia I, Sanchez M, et al. Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF

- production by human tendon cells in culture. *J Orthop Res.* 2005;23(2):281-286.
149. Lucarelli E, Beccheroni A, Donati D, et al. Platelet-derived growth factors enhance proliferation of human stromal stem cells. *Biomaterials.* 2003;24(18):3095-3100.
  150. Woodall J, Jr., Tucci M, Mishra A, Benghuzzi H. Cellular effects of platelet rich plasma: a study on HL-60 macrophage-like cells. *Biomed Sci Instrum.* 2007;43:266-271.
  151. Kawamura S, Ying L, Kim HJ, Dynybil C, Rodeo SA. Macrophages accumulate in the early phase of tendon-bone healing. *J Orthop Res.* 2005;23(6):1425-1432.
  152. Schnabel LV, Mohammed HO, Miller BJ, et al. Platelet rich plasma (PRP) enhances anabolic gene expression patterns in flexor digitorum superficialis tendons. *J Orthop Res.* 2007;25(2):230-240.
  153. McCarrel T, Fortier L. Temporal growth factor release from platelet-rich plasma, trehalose lyophilized platelets, and bone marrow aspirate and their effect on tendon and ligament gene expression. *J Orthop Res.* 2009;27(8):1033-1042.
  154. de Mos M, van der Windt AE, Jahr H, et al. Can platelet-rich plasma enhance tendon repair? A cell culture study. *Am J Sports Med.* 2008;36(6):1171-1178.
  155. Aspenberg P, Virchenko O. Platelet concentrate injection improves Achilles tendon repair in rats. *Acta Orthop Scand.* 2004;75(1):93-99.
  156. Virchenko O, Aspenberg P. How can one platelet injection after tendon injury lead to a stronger tendon after 4 weeks? Interplay between early regeneration and mechanical stimulation. *Acta Orthop.* 2006;77(5):806-812.
  157. Kajikawa Y, Morihara T, Sakamoto H, et al. Platelet-rich plasma enhances the initial mobilization of circulation-derived cells for tendon healing. *J Cell Physiol.* 2008;215(3):837-845.
  158. Mishra A, Pavelko T. Treatment of chronic elbow tendinosis with buffered platelet-rich plasma. *Am J Sports Med.* 2006;34(11):1774-1778.
  159. Mishra AK, Skrepnik NV, Edwards SG, et al. Efficacy of platelet-rich plasma for chronic tennis elbow: a double-blind, prospective, multicenter, randomized controlled trial of 230 patients. *Am J Sports Med.* 2014;42(2):463-471.
  160. Mishra A, Harmon K, Woodall J, Vieira A. Sports medicine applications of platelet rich plasma. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012;13(7):1185-1195.
  161. Mishra A, Woodall J, Jr., Vieira A. Treatment of tendon and muscle using platelet-rich plasma. *Clin Sports Med.* 2009;28(1):113-125.

162. Sanchez M, Anitua E, Azofra J, Andia I, Padilla S, Mujika I. Comparison of surgically repaired Achilles tendon tears using platelet-rich fibrin matrices. *Am J Sports Med.* 2007;35(2):245-251.
163. Randelli P, Arrigoni P, Ragone V, Aliprandi A, Cabitza P. Platelet rich plasma in arthroscopic rotator cuff repair: a prospective RCT study, 2-year follow-up. *J Shoulder Elbow Surg.* 2011;20(4):518-528.
164. de Vos RJ, Weir A, Tol JL, Verhaar JA, Weinans H, van Schie HT. No effects of PRP on ultrasonographic tendon structure and neovascularisation in chronic midportion Achilles tendinopathy. *Br J Sports Med.* 2011;45(5):387-392.
165. Schepull T, Kvist J, Norrman H, Trinks M, Berlin G, Aspenberg P. Autologous platelets have no effect on the healing of human achilles tendon ruptures: a randomized single-blind study. *Am J Sports Med.* 2011;39(1):38-47.
166. Hall TJ, Zhu Y, Spalding CS. In vivo real-time freehand palpation imaging. *Ultrasound Med Biol.* 2003;29(3):427-435.
167. Hsu SJ, Bouchard RR, Dumont DM, Wolf PD, Trahey GE. In vivo assessment of myocardial stiffness with acoustic radiation force impulse imaging. *Ultrasound in medicine & biology.* 2007;33(11):1706-1719.
168. Behler RH, Nichols TC, Zhu H, Merricks EP, Gallippi CM. ARFI imaging for noninvasive material characterization of atherosclerosis. Part II: toward in vivo characterization. *Ultrasound in medicine & biology.* 2009;35(2):278-295.
169. Dumont D, Behler RH, Nichols TC, Merricks EP, Gallippi CM. ARFI imaging for noninvasive material characterization of atherosclerosis. *Ultrasound in medicine & biology.* 2006;32(11):1703-1711.
170. Talwalkar JA, Kurtz DM, Schoenleber SJ, West CP, Montori VM. Ultrasound-based transient elastography for the detection of hepatic fibrosis: systematic review and meta-analysis. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association.* 2007;5(10):1214-1220.
171. Dighe M, Luo S, Cuevas C, Kim Y. Efficacy of thyroid ultrasound elastography in differential diagnosis of small thyroid nodules. *European journal of radiology.* 2013.
172. Carneiro-Pla D. Ultrasound elastography in the evaluation of thyroid nodules for thyroid cancer. *Current opinion in oncology.* 2013;25(1):1-5.
173. Celi S, Di Puccio F, Forte P. Advances in finite element simulations of elastosonography for breast lesion detection. *Journal of biomechanical engineering.* 2011;133(8):081006.

174. Giuseppetti GM, Martegani A, Di Cioccio B, Baldassarre S. Elastosonography in the diagnosis of the nodular breast lesions: preliminary report. *La Radiologia medica*. 2005;110(1-2):69-76.
175. Garra BS. Imaging and estimation of tissue elasticity by ultrasound. *Ultrasound quarterly*. 2007;23(4):255-268.
176. Krouskop TA, Dougherty DR, Vinson FS. A pulsed Doppler ultrasonic system for making noninvasive measurements of the mechanical properties of soft tissue. *J Rehabil Res Dev*. 1987;24(2):1-8.
177. Lerner RM, Waag RC. Wave space interpretation of scattered ultrasound. *Ultrasound Med Biol*. 1988;14(2):97-102.
178. Ophir J, Alam SK, Garra B, et al. Elastography: ultrasonic estimation and imaging of the elastic properties of tissues. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers Part H, Journal of engineering in medicine*. 1999;213(3):203-233.
179. Pesavento A, Perrey C, Krueger M, Ermert H. A time-efficient and accurate strain estimation concept for ultrasonic elastography using iterative phase zero estimation. *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control*. 1999;46(5):1057-1067.
180. Nightingale K, Soo MS, Nightingale R, Trahey G. Acoustic radiation force impulse imaging: in vivo demonstration of clinical feasibility. *Ultrasound in medicine & biology*. 2002;28(2):227-235.
181. Melodelima D, Bamber JC, Duck FA, Shipley JA. Transient elastography using impulsive ultrasound radiation force: a preliminary comparison with surface palpation elastography. *Ultrasound in medicine & biology*. 2007;33(6):959-969.
182. Liebgott H, Wilhelm JE, Jensen JA, Vray D, Delachartre P. PSF dedicated to estimation of displacement vectors for tissue elasticity imaging with ultrasound. *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control*. 2007;54(4):746-756.
183. McAleavey SA, Menon M, Orszulak J. Shear-modulus estimation by application of spatially-modulated impulsive acoustic radiation force. *Ultrasonic imaging*. 2007;29(2):87-104.
184. Nightingale K, Bentley R, Trahey G. Observations of tissue response to acoustic radiation force: opportunities for imaging. *Ultrasonic imaging*. 2002;24(3):129-138.
185. Drakonaki EE, Allen GM, Wilson DJ. Real-time ultrasound elastography of the normal Achilles tendon: reproducibility and pattern description. *Clinical radiology*. 2009;64(12):1196-1202.
186. Liberati A, Altman DG, Tetzlaff J, et al. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate health care interventions: explanation and elaboration. *Journal of clinical epidemiology*. 2009;62(10):e1-34.

187. Group OLoEW. The Oxford 2011 levels of evidence. Oxford centre for evidence-based medicine Oxford, UK; 2011.
188. De Zordo T, Fink C, Feuchtner GM, Smekal V, Reindl M, Klauser AS. Real-time sonoelastography findings in healthy Achilles tendons. *AJR American journal of roentgenology*. 2009;193(2):W134-138.
189. De Zordo T, Chhem R, Smekal V, et al. Real-time sonoelastography: findings in patients with symptomatic achilles tendons and comparison to healthy volunteers. *Ultraschall in der Medizin*. 2010;31(4):394-400.
190. Arda K, Ciledag N, Aktas E, Aribas BK, Kose K. Quantitative assessment of normal soft-tissue elasticity using shear-wave ultrasound elastography. *AJR American journal of roentgenology*. 2011;197(3):532-536.
191. Drakonaki EE, Allen GM, Wilson DJ. Real-time ultrasound elastography of the normal Achilles tendon: reproducibility and pattern description. *Clinical radiology*. 2009;64(12):1196-1202.
192. Yamamoto Y, Yamaguchi S, Sasho T, et al. Quantitative Ultrasound Elastography With an Acoustic Coupler for Achilles Tendon Elasticity: Measurement Repeatability and Normative Values. *Journal of ultrasound in medicine : official journal of the American Institute of Ultrasound in Medicine*. 2016;35(1):159-166.
193. Capalbo E, Peli M, Stradiotti P. Sonoelastography of the distal third of the Achilles tendon in asymptomatic volunteers: correlation with anthropometric data, ultrasound findings and reproducibility of the method. *La Radiologia medica*. 2016;121(8):667-674.
194. Ooi CC, Schneider ME, Malliaras P, Counsel P, Connell DA. Prevalence of morphological and mechanical stiffness alterations of mid Achilles tendons in asymptomatic marathon runners before and after a competition. *Skeletal radiology*. 2015;44(8):1119-1127.
195. Ooi CC, Schneider ME, Malliaras P, et al. Sonoelastography of the Achilles Tendon: Prevalence and Prognostic Value Among Asymptomatic Elite Australian Rules Football Players. *Clinical journal of sport medicine : official journal of the Canadian Academy of Sport Medicine*. 2016;26(4):299-306.
196. Turan A, Teber MA, Yakut ZI, Unlu HA, Hekimoglu B. Sonoelastographic assessment of the age-related changes of the Achilles tendon. *Medical ultrasonography*. 2015;17(1):58-61.
197. Fu S, Cui L, He X, Sun Y. Elastic Characteristics of the Normal Achilles Tendon Assessed by Virtual Touch Imaging Quantification Shear Wave Elastography. *Journal of ultrasound in medicine : official journal of the American Institute of Ultrasound in Medicine*. 2016;35(9):1881-1887.

198. Maffulli N, Wong J, Almekinders LC. Types and epidemiology of tendinopathy. *Clin Sports Med.* 2003;22(4):675-692.
199. De Zordo T, Chhem R, Smekal V, et al. Real-time sonoelastography: findings in patients with symptomatic achilles tendons and comparison to healthy volunteers. *Ultraschall in der Medizin.* 2010;31(4):394-400.
200. Dirrichs T, Quack V, Gatz M, Tingart M, Kuhl CK, Schradling S. Shear Wave Elastography (SWE) for the Evaluation of Patients with Tendinopathies. *Academic radiology.* 2016;23(10):1204-1213.
201. Galletti S, Oliva F, Masiero S, et al. Sonoelastography in the diagnosis of tendinopathies: an added value. *Muscles, ligaments and tendons journal.* 2015;5(4):325-330.
202. Klauser AS, Pamminger MJ, Halpern EJ, et al. Sonoelastography of the Common Flexor Tendon of the Elbow with Histologic Agreement: A Cadaveric Study. *Radiology.* 2016:160139.
203. Sconfienza LM, Silvestri E, Cimmino MA. Sonoelastography in the evaluation of painful Achilles tendon in amateur athletes. *Clinical and experimental rheumatology.* 2010;28(3):373-378.
204. Zhang Q, Cai Y, Hua Y. Sonoelastography shows that Achilles tendons with insertional tendinopathy are harder than asymptomatic tendons. 2016.
205. Aubry S, Nueffer JP, Tanter M, Becce F, Vidal C, Michel F. Viscoelasticity in Achilles tendonopathy: quantitative assessment by using real-time shear-wave elastography. *Radiology.* 2015;274(3):821-829.
206. Petrescu PH, Izvernariu DA, Iancu C, et al. Evaluation of normal and pathological Achilles tendon by real-time shear wave elastography. *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie.* 2016;57(2 Suppl):785-790.
207. Tan S, Kudas S, Ozcan AS, et al. Real-time sonoelastography of the Achilles tendon: pattern description in healthy subjects and patients with surgically repaired complete ruptures. *Skeletal radiology.* 2012;41(9):1067-1072.
208. Chen XM, Cui LG, He P, Shen WW, Qian YJ, Wang JR. Shear wave elastographic characterization of normal and torn achilles tendons: a pilot study. *Journal of ultrasound in medicine : official journal of the American Institute of Ultrasound in Medicine.* 2013;32(3):449-455.
209. Zhang LN, Wan WB, Wang YX, et al. Evaluation of Elastic Stiffness in Healing Achilles Tendon After Surgical Repair of a Tendon Rupture Using In Vivo Ultrasound Shear Wave Elastography. *Med Sci Monit.* 2016;22:1186-1191.

210. Masala S, Manenti G, Antonicoli M, et al. Real time evaluation of monolateral clubfoot with sonoelastography. *La Radiologia medica*. 2014;119(8):601-606.
211. Turan A, Tufan A, Mercan R, et al. Real-time sonoelastography of Achilles tendon in patients with ankylosing spondylitis. *Skeletal radiology*. 2013;42(8):1113-1118.
212. Evranos B, Idilman I, Ipek A, Polat SB, Cakir B, Ersoy R. Real-time sonoelastography and ultrasound evaluation of the Achilles tendon in patients with diabetes with or without foot ulcers: a cross sectional study. *Journal of diabetes and its complications*. 2015;29(8):1124-1129.
213. Onal ED, Ipek A, Evranos B, Idilman IS, Cakir B, Ersoy R. Structural tendon changes in patients with acromegaly: assessment of Achilles tendon with sonoelastography. *Medical ultrasonography*. 2016;18(1):30-35.
214. Porta F, Damjanov N, Galluccio F, Iagnocco A, Matucci-Cerinic M. Ultrasound elastography is a reproducible and feasible tool for the evaluation of the patellar tendon in healthy subjects. *International journal of rheumatic diseases*. 2014;17(7):762-766.
215. Ooi CC, Richards PJ, Maffulli N, et al. A soft patellar tendon on ultrasound elastography is associated with pain and functional deficit in volleyball players. *Journal of science and medicine in sport*. 2016;19(5):373-378.
216. Botanlioglu H, Kaynak G, Kantarci F, Guven MF, Zengin G, Aydingoz O. Length, thickness, and elasticity of the patellar tendon after closed wedge high tibial osteotomy: a shear wave elastographic study. *Journal of orthopaedic surgery (Hong Kong)*. 2016;24(2):194-197.
217. Teber MA, Ogur T, Bozkurt A, et al. Real-time sonoelastography of the quadriceps tendon in patients undergoing chronic hemodialysis. *Journal of ultrasound in medicine : official journal of the American Institute of Ultrasound in Medicine*. 2015;34(4):671-677.
218. Tudisco C, Bisicchia S, Stefanini M, Antonicoli M, Masala S, Simonetti G. Tendon quality in small unilateral supraspinatus tendon tears. Real-time sonoelastography correlates with clinical findings. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy : official journal of the ESSKA*. 2015;23(2):393-398.
219. Seo JB, Yoo JS, Ryu JW. Sonoelastography findings of biceps tendinitis and tendinosis. *Journal of ultrasound*. 2014;17(4):271-277.
220. Lee SU, Joo SY, Kim SK, Lee SH, Park SR, Jeong C. Real-time sonoelastography in the diagnosis of rotator cuff tendinopathy. *Journal of shoulder and elbow surgery / American Shoulder and Elbow Surgeons [et al]*. 2016;25(5):723-729.

221. Kocyigit F, Kuyucu E, Kocyigit A, Herek DT, Savkin R, Aslan UB. Investigation of Biomechanical Characteristics of Intact Supraspinatus Tendons in Subacromial Impingement Syndrome: A Cross-sectional Study with Real-time Sonoelastography. *American journal of physical medicine & rehabilitation / Association of Academic Physiatrists*. 2016;95(8):588-596.
222. De Zordo T, Lill SR, Fink C, et al. Real-time sonoelastography of lateral epicondylitis: comparison of findings between patients and healthy volunteers. *AJR American journal of roentgenology*. 2009;193(1):180-185.
223. Ahn KS, Kang CH, Hong SJ, Jeong WK. Ultrasound elastography of lateral epicondylitis: clinical feasibility of quantitative elastographic measurements. *AJR American journal of roentgenology*. 2014;202(5):1094-1099.
224. Kocyigit F, Kuyucu E, Kocyigit A, et al. Association of real-time sonoelastography findings with clinical parameters in lateral epicondylitis. *Rheumatology international*. 2016;36(1):91-100.
225. Sconfienza LM, Silvestri E, Orlandi D, et al. Real-time sonoelastography of the plantar fascia: comparison between patients with plantar fasciitis and healthy control subjects. *Radiology*. 2013;267(1):195-200.
226. Wu CH, Chang KV, Mio S, Chen WS, Wang TG. Sonoelastography of the plantar fascia. *Radiology*. 2011;259(2):502-507.
227. Wu CH, Chen WS, Wang TG. Plantar fascia softening in plantar fasciitis with normal B-mode sonography. 2015;44(11):1603-1607.
228. Nilsson-Helander K, Thomee R, Silbernagel KG, et al. The Achilles tendon Total Rupture Score (ATRS): development and validation. *The American journal of sports medicine*. 2007;35(3):421-426.
229. Vascellari A, Spennacchio P, Combi A, et al. Cross-cultural adaptation and multi-centric validation of the Italian version of the Achilles tendon Total Rupture Score (ATRS). *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2016.
230. Carmont MR, Silbernagel KG, Nilsson-Helander K, Mei-Dan O, Karlsson J, Maffulli N. Cross cultural adaptation of the Achilles tendon Total Rupture Score with reliability, validity and responsiveness evaluation. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy : official journal of the ESSKA*. 2012.
231. Kearney RS, Achten J, Lamb SE, Parsons N, Costa ML. The Achilles tendon total rupture score: a study of responsiveness, internal consistency and convergent validity on patients with acute Achilles tendon ruptures. *Health and quality of life outcomes*. 2012;10:24.



232. Palle L, Reddy MB, Reddy KJ, Kumari MV. Technical note: Real-time sonoelastography evaluation of Achilles tendon. *The Indian journal of radiology & imaging*. 2011;21(4):267-269.
233. Lynch RM. Achilles tendon rupture: surgical versus non-surgical treatment. *Accid Emerg Nurs*. 2004;12(3):149-158.
234. Mazzone MF, McCue T. Common conditions of the achilles tendon. *American family physician*. 2002;65(9):1805-1810.
235. Majewski M, Rickert M, Steinbruck K. [Achilles tendon rupture. A prospective study assessing various treatment possibilities]. *Der Orthopade*. 2000;29(7):670-676.
236. Gigante A, Moschini A, Verdenelli A, Del Torto M, Ulisse S, de Palma L. Open versus percutaneous repair in the treatment of acute Achilles tendon rupture: a randomized prospective study. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2008;16(2):204-209.
237. Lim J, Dalal R, Waseem M. Percutaneous vs. open repair of the ruptured Achilles tendon--a prospective randomized controlled study. *Foot & ankle international / American Orthopaedic Foot and Ankle Society [and] Swiss Foot and Ankle Society*. 2001;22(7):559-568.
238. Cretnik A, Kosanovic M, Smrkolj V. Percutaneous versus open repair of the ruptured Achilles tendon: a comparative study. *The American journal of sports medicine*. 2005;33(9):1369-1379.
239. Doral MN, Alam M, Bozkurt M, et al. Functional anatomy of the Achilles tendon. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy : official journal of the ESSKA*. 2010;18(5):638-643.
240. Leadbetter WB. Cell-matrix response in tendon injury. *Clinics in sports medicine*. 1992;11(3):533-578.
241. HIPPOCRATES:, #7. TbFAP. The books of prognostics. eBooks@Adelaide, The University of Adelaide Library, University of Adelaide, SouthAustralia 5005.400 B.C.
242. De Zordo T, Fink C, Feuchtner GM, Smekal V, Reindl M, Klauser AS. Real-time sonoelastography findings in healthy Achilles tendons. *AJR American journal of roentgenology*. 2009;193(2):W134-138.
243. Sconfienza LM, Silvestri E, Cimmino MA. Sonoelastography in the evaluation of painful Achilles tendon in amateur athletes. *Clinical and experimental rheumatology*. 2010;28(3):373-378.
244. Tan S, Kudas S, Ozcan AS, et al. Real-time sonoelastography of the Achilles tendon: pattern description in healthy subjects and patients with surgically repaired complete ruptures. *Skeletal radiology*. 2012;41(9):1067-1072.
245. Killian ML, Cavinatto L, Galatz LM, Thomopoulos S. The role of mechanobiology in tendon healing. *JSES*. 2012;21(2):228-237.