



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE CIRURGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIRURGIA**

**HENRIQUE CÉSAR TEMÓTEO RIBEIRO**

**MODELO DE INDUÇÃO DE TENDINOSE DE AQUILES EM RATOS: ESTUDO  
HISTOMORFOMÉTRICO**

**FORTALEZA**

**2013**

HENRIQUE CÉSAR TEMÓTEO RIBEIRO

MODELO DE INDUÇÃO DE TENDINOSE DE AQUILES EM RATOS:  
ESTUDO HISTOMORFOMÉTRICO

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Cirurgia pelo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará. Área de concentração: Ortopedia e Traumatologia

Orientador: Prof. José Alberto Dias Leite

FORTALEZA

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências da Saúde

---

R369m      Ribeiro, Henrique César Temóteo.  
Modelo de indução de tendinose de Aquiles em ratos: estudo histomorfométrico/ Henrique César Temóteo. – 2013.  
44 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, Fortaleza, 2013.  
Área de Concentração: Ortopedia e Traumatologia.  
Orientação: Prof. José Alberto Dias Leite.

1. Tendinopatia. 2. Tendão do Calcâneo. 3. Modelos Animais. I. Título.

---

CDD 617.47

HENRIQUE CÉSAR TEMÓTEO RIBEIRO

MODELO DE INDUÇÃO DE TENDINOSE DE AQUILES EM RATOS:  
ESTUDO HISTOMORFOMÉTRICO

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Cirurgia pelo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. José Alberto Dias Leite (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Prof. Dr. Osny Salomão  
Universidade de São Paulo

---

Prof. Dr. Antônio Egydio Carvalho Júnior  
Universidade de São Paulo

Aos meus avós José Maria (*in memoriam*) e  
Terezinha.

Às minhas filhas Júlia e Luíza.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor José Alberto Dias Leite, pelos ensinamentos, revisões, oportunidades e paciência.

Ao Professor Doutor Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos, coordenador do Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia, pelo exemplo de dedicação e correção na formação de novos pesquisadores.

Ao Professor Nicola Maffulli, pela obstinação no estudo das tendinopatias, motivo do nosso estudo, e pelo incentivo e ensinamentos constantes, apesar da pouca convivência.

Aos Professores Doutores Osny Salomão e Antônio Egydio Carvalho Júnior, pelas horas dedicadas à minha formação.

Aos amigos, Drs. Daniel Gomes e André Silveira, pela inestimável contribuição e apoio na elaboração deste projeto.

Aos alunos de Medicina da UFC vinculados ao PRAIME (Projeto de Ação Integrada em Medicina do Esporte), pelo imenso trabalho e imersão na nossa pesquisa.

Aos funcionários da Faculdade, Sras. Luciene Vieira de Oliveira, Magda Gomes Fontenele e o Sr. Bento por toda ajuda e apoio logístico durante este período.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro, primordial neste trabalho.

Às minhas filhas Júlia e Luíza Férrer Temóteo Ribeiro e minha esposa Natália Férrer, por serem meu alicerce e razão de toda caminhada na minha vida, além de entenderem a minha ausência em alguns momentos nesse período.

Ao Professor Doutor José Ribeiro da Silva, meu pai, exemplo de dedicação ao trabalho, a ciência e principalmente de que nunca é tarde para trilhar um caminho que se acredita.

À minha mãe, Sra. Perpétua Socorro Temóteo Ribeiro, por ser esse paradigma de retidão e dedicação na sua função laboral, e de amor incondicional e devoção a sua família.

Aos meus sócios, Drs. Eduardo Guedes, Guilherme Colares, Carlos Renato Gondim, Marcelo Bruno, Diogo Farias e Tiago Lima, irmãos de profissão e trabalho que compreenderam minha dedicação a este projeto contribuindo de maneira ímpar em sua execução.

“A vida sem ciência é uma espécie de morte”  
(Sócrates)

## RESUMO

As doenças do tendão são importantes causas de lesão em indivíduos submetidos a treinamento excessivo. A tendinose é uma dessas lesões e caracteriza-se histologicamente pela hiper celularidade e aumento do colágeno tipo III. Diversos são os modelos possíveis de indução de tendinose em animais, sendo o mecânico o mais eficaz na reprodução dos eventos envolvidos nesse processo. Devido a característica propulsora das patas traseiras, é necessário um aclive de 10° na esteira utilizada na indução. A velocidade de corrida a qual foram submetidas as cobaias em modelos anteriores é um fator de difícil reprodução. Há, portanto, a necessidade da padronização de um método mais reprodutível. A pesquisa tem como objetivo definir e validar um modelo de indução de tendinose de Aquiles em ratos. Foram utilizados doze ratos machos Wistar divididos aleatoriamente em Grupo experimental e Grupo controle. O grupo experimental correu em uma esteira para ratos com aclive de 10°, cinco vezes por semana, durante 70 minutos diários, com velocidade de 18 m/min, por um período de 12 semanas. Após o protocolo, os animais foram submetidos à eutanásia e os tendões de Aquiles direito e esquerdo foram removidos, fixados e processados, tendo o grupo experimental 12 tendões (n=12) e o grupo controle 12 tendões (n=12). Após a preparação de lâminas utilizando as colorações de Hematoxilina-Eosina, Picosirius Red, foi realizada a análise histomorfométrica das mesmas. A densidade celular aumentou no grupo experimental em relação ao controle,  $626,08 \pm 18,37$  versus  $445,08 \pm 16,48$ , no campo 1 e  $615,67 \pm 13,51$  versus  $460,00 \pm 27,49$ , no campo 2, com  $p < 0,05$ . Houve maior deposição de colágeno tipo III nos grupos experimentais ( $50,55 \pm 4,002$  versus  $9,59 \pm 0,435$  com  $p < 0,001$ ). Pode-se observar que o modelo proposto é eficaz para desenvolver uma lesão degenerativa tipo tendinose no tendão de Aquiles.

**Palavras-chave:** Tendinopatia. Tendão do Calcâneo. Modelos Animais.

## ABSTRACT

The tendon diseases are major causes of injury in athletes undergoing excessive training. The tendinosis is one of these lesions and is characterized histologically for a hyper cellularity and increased deposition of type III collagen. There are several possible models of tendinosis induction in animals, being most effective in the mechanical reproduction of the events involved in this process. Because the driving characteristic of the hind legs, one incline of the treadmill used in the 10 degrees (acclivity) induction is necessary. The running speed, which the animals were submitted in previous models, is a factor difficult to reproduce. There is need for standardization of model induction Achilles tendinosis, reproducible. The purpose is to define and validate a model for the induction of Achilles tendinosis in rats. We used twelve male Wistar rats randomly divided into experimental group and control group. The experimental group ran on a treadmill for rats with acclivity of 10 degrees, five times per week, daily during 70 minutes at a speed of 18 m / min for a period of 12 weeks. After the protocol, the animals were sacrificad and Achilles tendons were removed left and right, fixed and processed. We have twelve tendons in each group (n=12). After preparing slides using stains of Hematoxylin-Eosin and Picrosirius Red, histomorphometric analysis was performed of the same. The cell density increased in the experimental group compared to control,  $626.08 \pm 18.37$  versus  $445.08 \pm 16.48$ ,  $615.67$  in field 1 and  $\pm 13.51$  versus  $460.00 \pm 27.49$ , field 2, with  $p < 0.05$  . There was a greater deposition of type III collagen in the experimental groups ( $50, 55 \pm 4.002$  versus  $9.59 \pm 0.435$  with  $p < 0.001$ ). It can be observed that the proposed model is effective to develop a degenerative tendinosis type Achilles tendon injury.

**Keywords:** Tendinopathy. Achilles Tendon. Models Animal.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esteira motorizada utilizada em modelo _____	20
Figura 2 - Esteira motorizada para ratos <i>EP 131 Insight</i> _____	21
Figura 3 - Tendão de Aquiles de Rato dissecado _____	22
Figura 4 - Preparação manual de lâminas _____	23
Figura 5 - Microfotografia coloração HE _____	23
Figura 6 - Microfotografia Coloração Picrosirius Red _____	24

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Contagem de células por campo _____	25
Gráfico 2 -	Percentual de colágeno tipo III (verde) _____	26
Gráfico 3 -	Percentual de colágeno tipo I (vermelho) _____	27
Gráfico 4 -	Percentual de colágeno tipo I (vermelho e amarelo) _____	28

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Contagem de células por campo _____	25
Tabela 2 -	Percentual de colágeno tipo III (verde) _____	26
Tabela 3 -	Percentual de colágeno tipo I (vermelho) _____	27
Tabela 4 -	Percentual de colágeno tipo I (vermelho e amarelo) _____	28

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

m/min- Metro por minuto.

cm/s- Centímetro por segundo.

mA- Miliamperes.

µm- Micrometro.

nm- Nanômetro.

Da- Daltons.

Gly- Glicina.

Pro- Prolina.

Hyp- 4-hidroxiprolina.

IGF-1- Fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1.

PGE<sub>2</sub>- Prostaglandina E<sub>2</sub>.

FLAP- Proteína ativadora 5-lipoxigenase.

COX-2- Ciclo-oxigenase-2.

HE- Hematoxilina-Eosilina.

MMP-3- Metaloprotease-3.

EDTA- Ácido etilenediaminetetracético.

SAMM- Sistema de Avaliação Morfométrico.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	_____	<b>14</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	_____	<b>19</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	_____	<b>20</b>
<b>4 RESULTADOS</b>	_____	<b>25</b>
<b>5 DISCUSSÃO</b>	_____	<b>29</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b>	_____	<b>33</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	_____	<b>34</b>
<b>APÊNDICES</b>	_____	<b>42</b>
<b>ANEXOS</b>	_____	<b>43</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A constante busca por excelência na prática esportiva associada ao modismo de determinadas práticas atléticas, por vezes realizadas sem os devidos cuidados e avaliações, levam a um crescente avanço no número de lesões em praticantes de desporto.

Yang *et al.* (2012) relataram que 29,3% das lesões em atletas colegiais americanos são por carga excessiva de treinamentos, 50,1% destes indivíduos, com mais de uma lesão em três anos. Portanto, a constante busca de limites é um importante fator desencadeador de injúrias nesse perfil populacional.

Kannus e Natri (1997), já atribuíam às tendinopatias um importante papel nas doenças relacionadas ao excessivo treinamento. O mesmo autor ainda refere que apesar do caráter multifatorial dessas, a sobrecarga se sobressai como causa da doença tendinosa. Por sua função importante na mecânica da marcha e corrida, o tendão calcâneo ou tendão de Aquiles (assim chamado em referencia ao herói da mitologia grega que tinha como seu ponto fraco a região anatômica onde se encontra essa estrutura) é um dos mais frequentemente acometidos, principalmente em corredores (Kader *et al.*, 2002).

As lesões dos tendões foram motivos de mais de dois milhões de consultas nos Estados Unidos em 2001 (Lake, Ansorge e Soslowsky, 2008). Nakama *et al.* (2005) relatam que mais da metade das ausências ao trabalho nesse país estão relacionadas a mesma causa.

As estruturas tendinosas são conjuntos compactos de fibras colágenas responsáveis pela conexão da musculatura ao esqueleto, o que propicia a resposta deste às contrações musculares. Gross (1992) afirma que sua constituição é em 70% de água com associação aos glicosaminos de sua matriz extracelular, mas 95% do seu peso seco é de colágeno. O tendão normal tem sua maior parte do colágeno representado pelo tipo I, que forma fibras colágenas mais robustas, e menos de 10% desse total o colágeno tipo III, responsável por fibras reticulares, mais finas (Rufai, Ralphs e Benjamin, 1995) e em menor quantidade ainda o colágeno tipo IV (Ahtikoski *et al.*, 2004) e elastina (Eyden e Tzaphlidou, 2001).

O colágeno, que tem 25% de responsabilidade na composição do tendão, tem sua macromolécula como um filamento semiflexível de 300nm de comprimento e 1,5nm de diâmetro, sua estrutura fundamental é feita de uma unidade monomérica denominada tropocolágeno, com massa molecular média de 280000 Da (ANEXO A). Este, por sua vez, é constituído de três cadeias polipeptídicas, denominadas  $\alpha$ , que se apresentam de forma helicoidal e enrolam-se entre si formando uma estrutura de tripla hélice, tendo entre elas ligações de hidrogênio (Karube e Suzuki, 1972).

Segundo Egawa *et al.* (2011), o colágeno tipo I é formado por duas cadeias idênticas denominadas  $\alpha_1$  e uma distinta  $\alpha_2$ , a sequência de aminoácidos é bastante regular, a glicina aparecendo de três em três destes e a prolina também se mostrando bastante regular, o aminoácido 4-hidroxiprolina, que é incomum em outras proteínas, está bem representada no colágeno. A sequência Gly-Pro-Hyp é que permite a estruturação em hélice tríplice, permitindo que o colágeno tipo I tenha maior resistência às tensões com ligações mais estáveis e não redutíveis. Por outro lado o colágeno tipo III possui ligações que permitem uma organização mais dinâmica, portanto, menos resistentes a tensão.

As moléculas de colágeno se agrupam formando os feixes primários, microfibrilas e fibrilas, que por sua vez se organizam em fascículos, ou feixes secundários, a menor unidade funcional do tendão (Khan *et al.*, 1999). Os fascículos são reunidos em uma camada de tecido conectivo denominada endotendão, que já detém estruturas nervosas, vasculares e linfáticas. A junção dos endotendões é feita pelo epitendão e mais externamente pelo paratendão (este bem vascularizado).

A estrutura em paralelo dos fascículos é a responsável pela resistência tendinosa (Jozsa *et al.*, 1991) e a baixa quantidade de elastina pela incapacidade de aumentar seu comprimento, cerca de 8% a 10% (Butler *et al.*, 1978).

Segundo Lui *et al.* (2011), define-se como tendinopatia o termo usado para descrição genérica da apresentação clínica da doença dos tendões com dor e edema localizados e diferentes graus de incapacidade e eventuais roturas.

Em clássico trabalho escrito para revista *Arthorscopy* sob o título *Overuse Tendon Conditions: Time to Change a Confusing Terminology* os autores Maffulli, Khan e Puddu (1998) advogam que os termos tendinite, paratenonite e tendinose tem sua aplicação para definição de achados especificamente histopatológicos das tendinopatias.

Na tendinite, o sítio primário de envolvimento, o tendão, deve mostrar características celulares de inflamação aguda. Erradamente, o termo é utilizado para conceituar síndrome clínicas e não específicos achados histopatológicos.

As paratenonites incluem as paratendinites (processos inflamatórios no entorno da bainha tendinosa), tenossinovite (na camada única de tecido areolar que cobre o tendão) e tenovaginite (na bainha do tendão de camada dupla).

Puddu, Ippolito e Postacchini (1976) foram os primeiros a utilizar o termo tendinose para caracterizar a degeneração tendinosa sem os achados histológicos de inflamação intratendínea. A tendinose afeta todos os componentes do tendão: colágeno, tenócitos e matriz extracelular. Não é necessariamente sintomática, mas tem como característica a

desorganização das fibras de colágeno. Khan, Cook, *et al.* (1998), citam as características macroscópicas como sendo o aspecto friável e desorganizado do tecido, sua degeneração mucóide e a coloração acastanhada. Alguns autores, como Jarvinen *et al.* (1997), salientam que pelo menos seis tipos de degeneração do colágeno podem ocorrer na tendinose (hipóxica, hialina, fibrocartilaginosa, metaplasia óssea, lipóide e mixóide), sendo a lipóide e mixóide, as mais comuns no tendão calcâneo. Microscopicamente encontraremos roturas das fibras de colágeno (Khan *et al.*, 1999), a hiperplasia dos tenócitos (Maffulli *et al.*, 2000), bem como arredondamento dos seus núcleos, o que evidencia o incremento da produção de proteoglicanos e proteínas, sugerindo que eles tem revertido seu estágio tenoblástico, alterando a razão do seu metabolismo (Soslowky *et al.*, 2000), aumento significativo da quantidade de colágeno tipo III em relação a quantidade de colágeno tipo I (Fyfe e Stanish, 1992), além do aumento da quantidade de glicosaminoglicanos (Fu, Chan e Rolf, 2007), neovascularização (Szomor, Appleyard e Murrell, 2006) e apoptose celular (Yuan *et al.*, 2002).

O aumento dos níveis de glutamato, neurotransmissor excitatório e modulador de dor a nível do sistema nervoso central, descrito por Alfredson *et al.* (2001), maior expressão de IGF-1 (considerada estimuladora da síntese de colágeno) e do óxido nítrico (Szomor, Appleyard e Murrell, 2006) são algumas das alterações imunohistoquímicas encontradas nas tendinoses. Os mesmos autores ainda salientam que não há incremento nos níveis de PGE<sub>2</sub> quando comparados aos tendões normais.

Portanto, não há na tendinose a presença de células inflamatórias tanto em humanos (Khan, Maffulli, *et al.*, 1998) quanto em modelos experimentais com animais (Cho *et al.*, 2011). Alguns estudos mostram incremento da expressão de genes pró-inflamatórios, como FLAP e COX-2 no início das induções dos modelos em animais (Perry *et al.*, 2005), voltando a níveis normais no decorrer do processo.

Chega-se, portanto, a definição expressada por Maffulli, Khan e Puddu (1998) que a tendinose é um quadro predominantemente degenerativo e não inflamatório. Podendo ter seu início absolutamente assintomático (Lake, Ansorge e Soslowky, 2008) ou com dor leve à palpação e na movimentação ativa até dor mais intensa e uma eventual rotura parcial ou total (Kannus, 1997).

Collins e Raleigh (2009) revelam que características individuais podem predispor a lesões tendíneas, sobretudo tendinoses. Essas podem estar relacionadas a idade, peso, força muscular, flexibilidade (Allen, Tauro e Ostlere, 1999), características anatômicas (trajetos,

tendões supranumerários, atritos), como descrito por Miller e Vogel (1989) e também genéticas, como aumento da expressão das MMP-3 em tendinopatias (Raleigh *et al.*, 2009).

Porém, fatores extrínsecos são os mais comumente relacionados às tendinoses, além do tabagismo, doenças sistêmicas (como a hiperuricemia), desequilíbrios hormonais (por exemplo, o hipotireoidismo), e da utilização de antibióticos (ciprofloxacina) terem relevância como etiologia comum, as atividades por esforço repetitivo, o *overuse*, tem papel principal nesta (Kannus e Natri, 1997). Archambault, Wiley e Bray (1995) descrevem o processo de surgimento da lesão como a incapacidade de das células tendinosas de regenerar o tecido, gerando um desequilíbrio na taxa de renovação (*turnover*) do colágeno, levando a degeneração da matriz tecidual.

Os modelos de indução de tendinose em animais se justificam pela dificuldade de obter análises histopatológicas nos estágios iniciais das mesmas em humanos, onde normalmente são assintomáticas ou não necessitam de tratamento invasivo. Esses são capazes de reproduzir a injúria, o que permite monitorá-la em todas as fases do processo. Além disso, esses modelos possibilitam o desenvolvimento de possíveis tratamentos físicos e farmacológicos, bem como opções de profilaxia dessa doença tão comum.

Podemos dividir em dois, os tipos de modelo para indução de tendinose em animais. O primeiro os que o fazem através de agentes químicos. O segundo utiliza sobrecarga mecânica através de contração ativa repetitiva da musculatura por períodos maiores.

Algumas substâncias químicas são descritas em modelos como indutoras de tendinose. As citocinas, carregininas, colagenases e prostraglandinas (Sullo *et al.*, 2001) são as mais utilizadas. Porém esse método se mostrou pouco eficaz na reprodução das alterações histológicas, principalmente em seus estágios iniciais, sendo mais eficaz na demonstração de tendinopatias puramente inflamatórias, como as tendinites.

Entretanto, os modelos de indução mecânica por contração muscular e consequente sobrecarga repetitiva na estrutura tendinosa, apresentam alterações mais características da tendinose (Backman *et al.*, 1990). Esses modelos podem ter a participação passiva da cobaia através de eletroestimuladores que propiciam a contração e consequente estresse sobre o tendão (Messner *et al.*, 1999), como os que utilizam contração muscular ativa por estimulação ao esforço repetitivo (Sommer, 1987).

Silva *et al.* (2011) afirmam que apesar da possibilidade de padronizar o número e a magnitude de contrações através do modelo que as realiza passivamente, quando a realizamos de maneira ativa obtemos maior similaridade com o que acontece em humanos. Isso acontece pelo fato dos animais não serem submetidos às forças de reação com o solo (que tem

contribuição na etiologia biomecânica do processo de indução) e os mesmos estarem sedados durante o processo de estimulação, o que altera seu metabolismo. Portanto, a indução utilizando a sobrecarga mecânica por contração ativa através do esforço repetitivo consegue reproduzir em seus vários estágios o processo de tendinose em humanos (Lui *et al.*, 2011).

Soslowsky *et al.* (2000), através de pesquisa vencedora do Prêmio Neer da *American Shoulder and Elbow Surgeons*, propuseram modelo para indução de tendinose em supra-espinhoso (patas dianteiras) de ratos do tipo Sprague-Dawley que consistia em corrida dos mesmos em esteira adaptada com declínio de  $10^{\circ}$ , a 17 m/min (28,34 cm/s), por 16 semanas, 5 vezes por semana, 60 minutos por vez. Foram analisados dados histopatológicos de grupos na quarta, oitava e última semana. Os autores observaram achados compatíveis com tendinose (mesmo que incipiente) a partir da quarta semana, sendo progressivamente mais exuberantes com o decorrer do experimento.

Um modelo semelhante foi proposto para tendinose de Aquiles (patas traseiras) em ratos por Huang, Perry e Soslowsky (2004). Foi utilizada a mesma metodologia, exceção da aferição do primeiro grupo experimental na segunda semana e não na quarta. Porém, não foram obtidos resultados significativos estatisticamente no surgimento dos achados histológicos da patologia. Silva *et al.* (2007) afirmam que a limitação do modelo se dá pela utilização de um declínio de  $10^{\circ}$  acontece pelo fato da marcha nos quadrúpedes ser predominantemente propulsora nos membros posteriores e desaceleradora nos membros anteriores, como foi afirmado por Courtine *et al.* (2005). O efeito gravitacional, então, favoreceria a propulsão, não levando à desejada indução da contração excêntrica e da consequente tendinose por sobrecarga. Os autores, então, desenvolveram um modelo com aclive de  $10^{\circ}$ , o que potencializaria a contração dos músculos posteriores. Na quarta semana já se obteve achados histomorfométricos de tendinose.

Entretanto, a velocidade utilizada de 26,8 m/min (44,67 cm/s, cerca de 1,61 hm/h) no protocolo, não foi reproduzida de maneira homogênea nas cobaias de nosso laboratório, demandando grande tempo de treinamento, além de eventuais acidentes com os animais.

Observamos, então, a necessidade do desenvolvimento de um modelo mais reprodutível, de menor custo, quer financeiro, bem como no tempo de treinamento das cobaias e no menor sofrimento destas e também eficaz na indução da tendinose em Aquiles nos ratos. Optamos, então, pelo uso de velocidade semelhante a dos experimentos de Soslowsky *et al.* (2000), porém com o aclive da esteira de  $10^{\circ}$ .

## **2 OBJETIVOS**

O objetivo deste trabalho é definir e formatar um modelo de indução de tendinose de Aquiles em ratos por *overuse* com menor custo e maior facilidade de reprodução do que os existentes, bem como validá-lo para utilização do mesmo na pesquisa das alterações histopatológicas e das possíveis profilaxias e tratamentos desse tipo de lesão.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados para viabilização desta pesquisa doze ratos machos Wistar com 12 semanas de idade com peso entre 223 (peso mínimo) e 254 (peso máximo) gramas, média de 243,83 gramas. Sendo divididos em grupo controle e experimental, cada um contendo 6 animais.

O grupo experimental foi submetido ao modelo proposto para indução de tendinite de tendão calcâneo, adaptado do preconizado por Soslowsky *et al.* (2000) para patas anteriores. Os animais foram, portanto, submetidos a corrida em esteira própria para ratos (Fig. 1) com aclive de 10 graus para que existisse sobrecarga no tendão de Aquiles, por um período prévio de 4 semanas com aceleração gradual e por um período de tempo não superior a 30 minutos até que estivessem adaptados a atividade, uma vez adaptados (houve necessidade de troca de animais no período) o evento foi repetido diariamente, cinco dias por semana por doze semanas em uma velocidade de 30 cm/s por 70 minutos, sendo os 5 minutos iniciais de aceleração gradual até que se chegasse a velocidade desejada (aquecimento) e os 5 minutos finais de desaceleração (diminuição gradual do metabolismo).

Figura 1 – Esteira motorizada utilizada em modelo



O equipamento utilizado foi uma esteira motorizada própria para ratos *EP 131 Insight®* (Fig. 2) com 6 baias isoladas cada uma com 170mm de altura, largura 97mm e comprimento 385 mm, grade no fundo que produz choque para estímulo das cobaias de até

4mA (que foi a graduação utilizada no experimento). O aparelho detém ainda um relógio digital que afere tempo, velocidade e amperagem do choque. É fabricado pela Insight – Equipamentos de Ensino localizada em Ribeirão Preto, estado de São Paulo.

Figura 2 – Esteira motorizada para ratos *EP 131 Insight®*

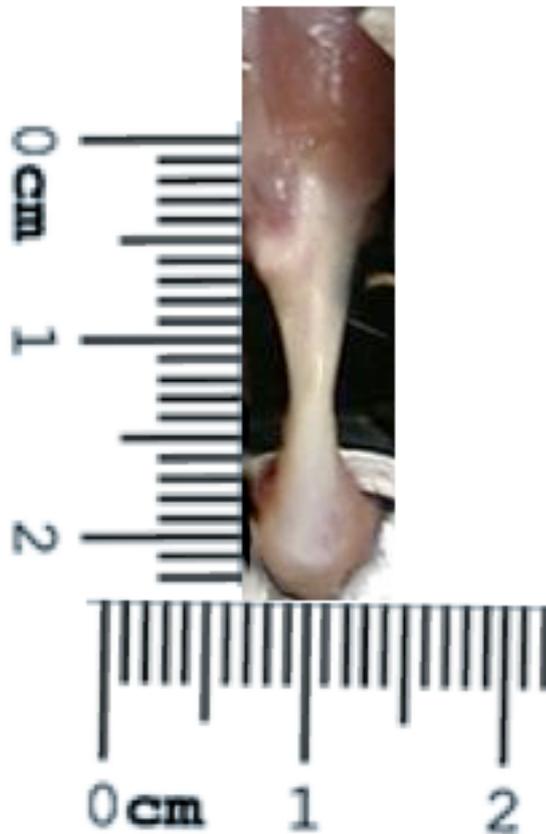


O grupo controle realizou atividades corriqueiras como andar em ambiente confinado em suas gaiolas. Água e ração foram oferecidos livremente aos dois grupos.

Os animais foram submetidos a eutanásia através da inalação por CO<sub>2</sub> complementado por método mecânico com deslocamento cervical observando os princípios do bem-estar animal relevantes para eutanásia: elevado grau de respeito aos animais, ausência ou redução máxima de desconforto e estímulos nociceptivos, inconsciência imediata seguida de morte; ausência ou redução máxima do medo e da ansiedade, segurança e irreversibilidade. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará tendo sido registrado sob o número 42/2011 (APÊNDICE A)

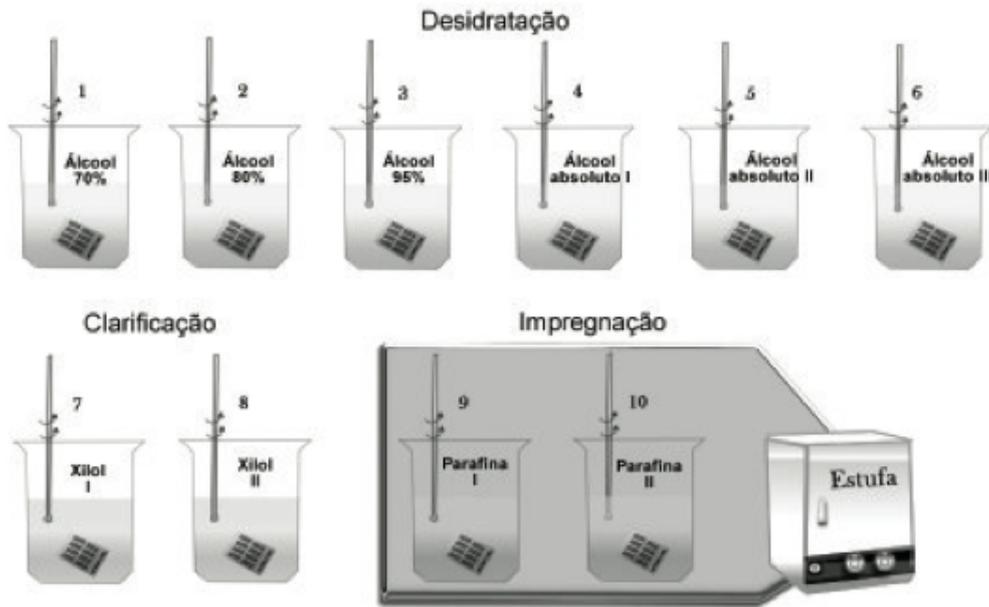
Após confirmação da eutanásia, foi realizado a dissecação do tríceps sural das patas direita e esquerda desde a junção miotendínea até a inserção do tendão (Fig.3) com fragmento do calcâneo, obtendo-se, portanto, 12 tendões em cada grupo.

Figura 3 – Tendão de Aquiles de Rato dissecado



Os tendões foram fixados em formol tamponado neutro a 10% e manualmente processados (Fig. 4). Primeiramente, foi realizada a descalcificação utilizando o agente quelante EDTA (ácido etilenediaminetetracético). Posteriormente, a desidratação por banhos de 1 hora cada com álcool etílico 70%, 80%, 95% e absoluto. A clarificação que é realizada para remover o álcool antes da inclusão em parafina, foi feita embebendo os tecidos em Xilol por 30 minutos. Por ultimo, é feito a impregnação e inclusão em parafina.

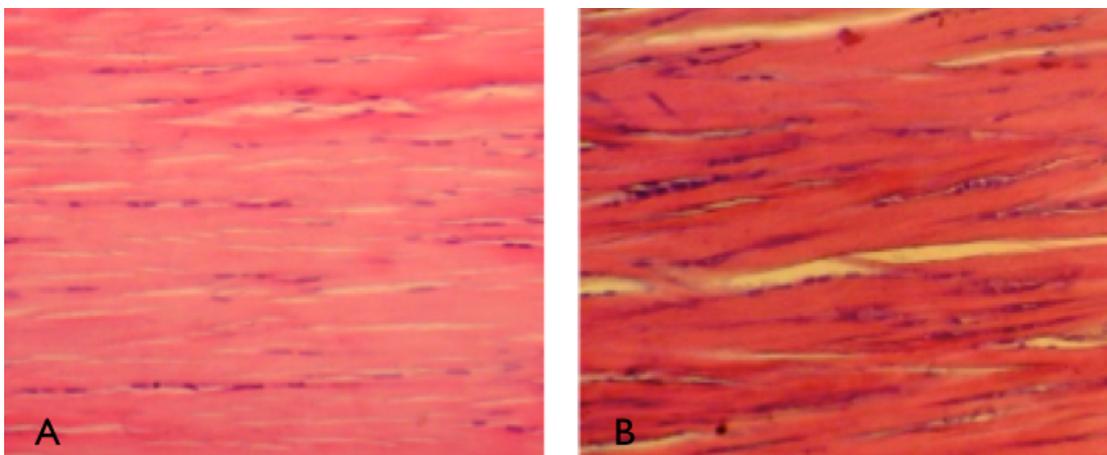
Figura 4 – Preparação manual de lâminas



Os tendões foram posicionados longitudinalmente no processo de inclusão e submetidos a cortes de 5 $\mu$ m, tendo sido um para coloração Hematoxilina-Eosina (HE) e um para coloração Picrosirius Red. Tendo sido retirado um feixe central do mesmo.

A hiper celularidade vista nos quadros de tendinose foi aferida neste estudo através da contagem dos núcleos das células por campo em coloração HE. Foram utilizados dois campos em cada lâmina (Kesler *et al.*, 2000; Glazebrook M.A., 2007). Com objetivo de somar a quantidade dos núcleos de tenócitos em 2 campos em cada lâmina (Fig. 5).

Figura 5 – Microfotografia da lâmina com coloração HE (400x).

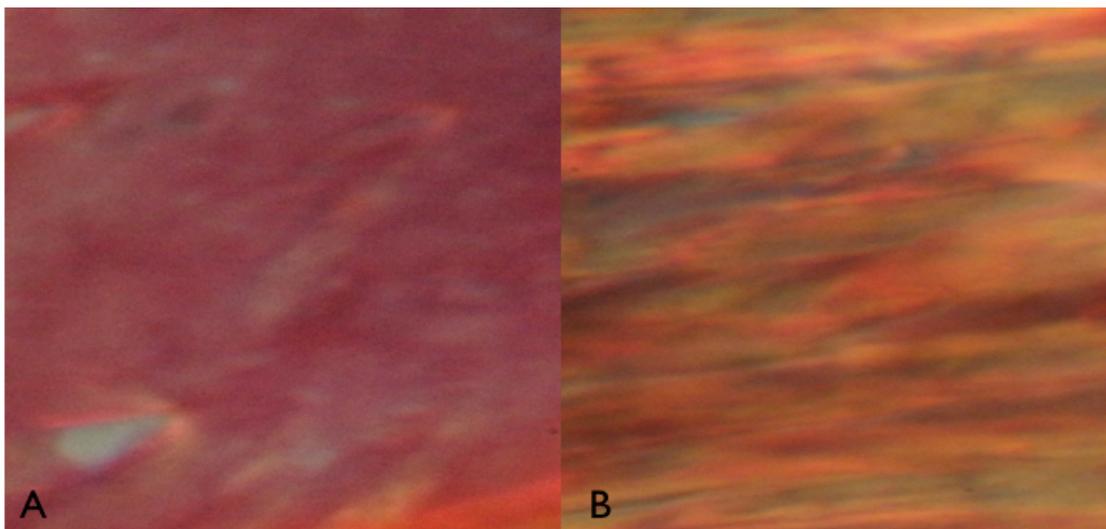


A - grupo controle e B - grupo experimental, mostrando maior quantidade de tenócitos

A quantificação do colágeno foi realizada através da coloração Picrosirius red. Neste método o colágeno tipo I resultará em cores com maior comprimento de onda (vermelho e amarelo), já as fibras dissociadas do colágeno tipo III a cor predominante será a verde (Kesler *et al.*, 2000), que detém um menor comprimento de onda (Fig. 6). Foram avaliadas no experimento, 300 imagens de cada grupo (controle e experimental), de 12 lâminas coradas com Picrosirius red (12 tendões), submetidas a 5 captações com luz polarizada (aumento de 400x), em cada uma dessas selecionamos 5 imagens 400 x 700 megapixels, em formato Windows Bitmap (BMP). Foram obtidos resultados percentuais para cada imagem das colorações Vermelha, Vermelha + Amarela (correspondendo ao colágeno tipo I) e Verde (colágeno tipo III) através de análise utilizando o programa de computador desenvolvido na Universidade Federal do Ceará SAMM (Sistema de Análise Morfométrica) versão 1.0 por Fachine-Jamacaru, Fachine Junior e De Moraes Filho (2005), que já quantifica esses percentuais

A análise estatística seguiu-se mediante a submissão dos resultados ao teste não-paramétrico de Kolmogorov-Smirnov para verificar se a distribuição do conjunto de dados avaliados adere à distribuição normal. Em caso de normalidade, foram submetidas ao teste t de Student para amostras não-pareadas. Em sendo não-paramétrico, seria utilizado o teste t para amostras não-paramétricas. O nível de significância aplicado foi de 5%. Foi utilizado o aplicativo para análise estatística Wizard Pro, versão 1.3.17.

Figura 6 – Microfotografia da lâmina com coloração Picrosirius Red (400x).



**A** - grupo controle, predomínio do vermelho (colágeno tipo I) e **B** - grupo experimental, predomínio do verde (colágeno tipo III)

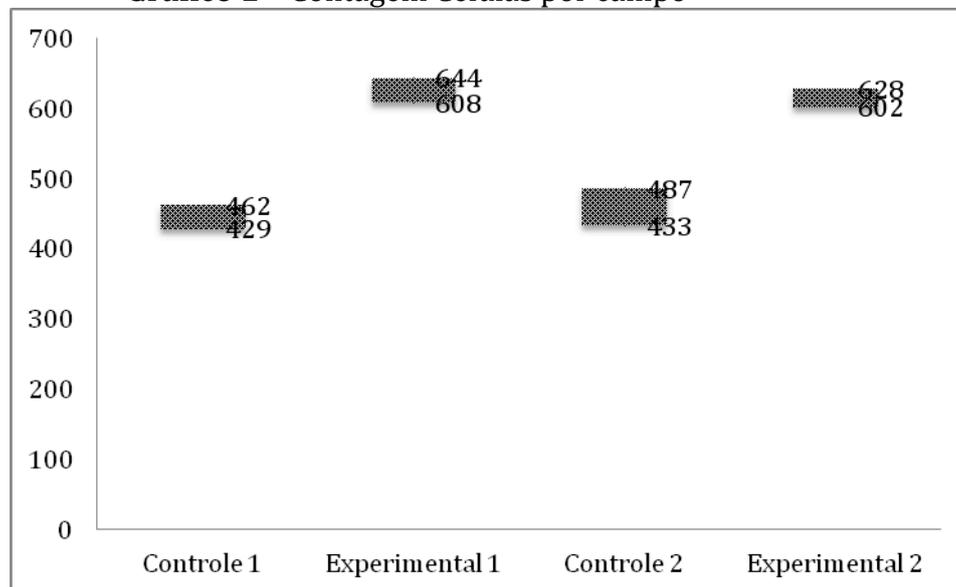
## 4 RESULTADOS

O aumento do número de células no grupo experimental foi estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ), a distribuição dos resultados foi paramétrica nos dois grupos (Tabela 1).

**Tabela 1** – Contagem de células por campo

	Grupo Controle	Grupo Experimental	Significância
Células/campo 1	445,08 ± 16,48	626,08 ± 18,37	$p < 0,05$
Células/campo 2	460,00 ± 27,49	615,67 ± 13,51	$p < 0,05$

**Gráfico 1** – Contagem Células por campo

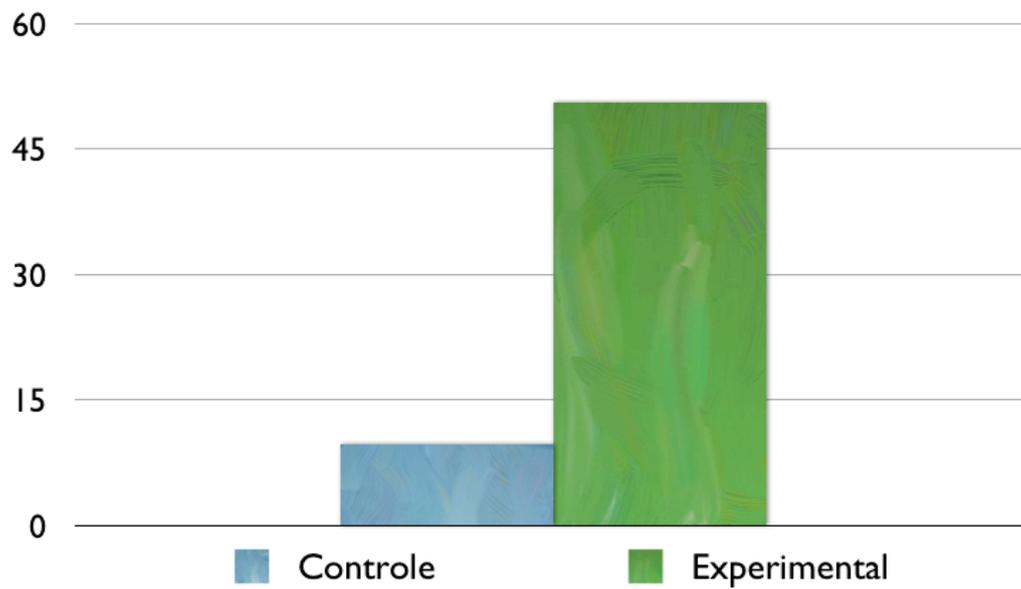


Não foi observado na coloração HE a presença de células características de processo inflamatório agudo, como polimorfonucleares.

O aumento do colágeno tipo III, característico dos quadros de tendinose, bem como a diminuição do colágeno tipo I, foram observados no grupo experimental de forma estatisticamente significativa (Tabela 2, 3 e 4). Os mesmos são caracterizados pelo cor verde (tipo III), amarela e vermelha (tipo I) após o preparo com Picrosirius red e visualização em luz polarizada.

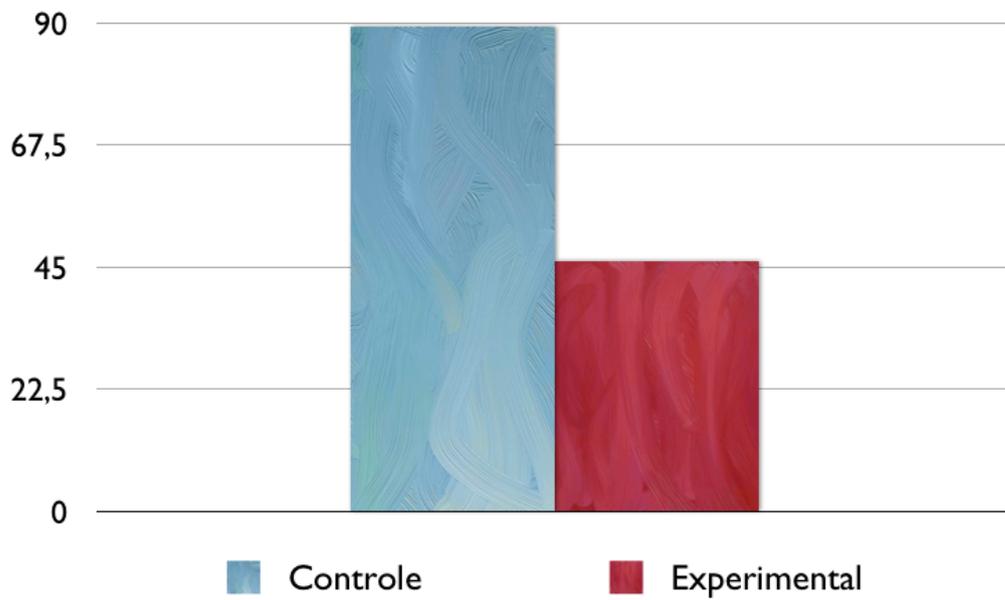
**Tabela 2** – Percentual de colágeno tipo III (verde)

	Média	Variância	Significância
Grupo Controle	9,59	± 0,435	p< 0,001
Grupo Experimental	50,551	± 4,002	p< 0,001

**Gráfico 2** – Percentual de colágeno tipo III

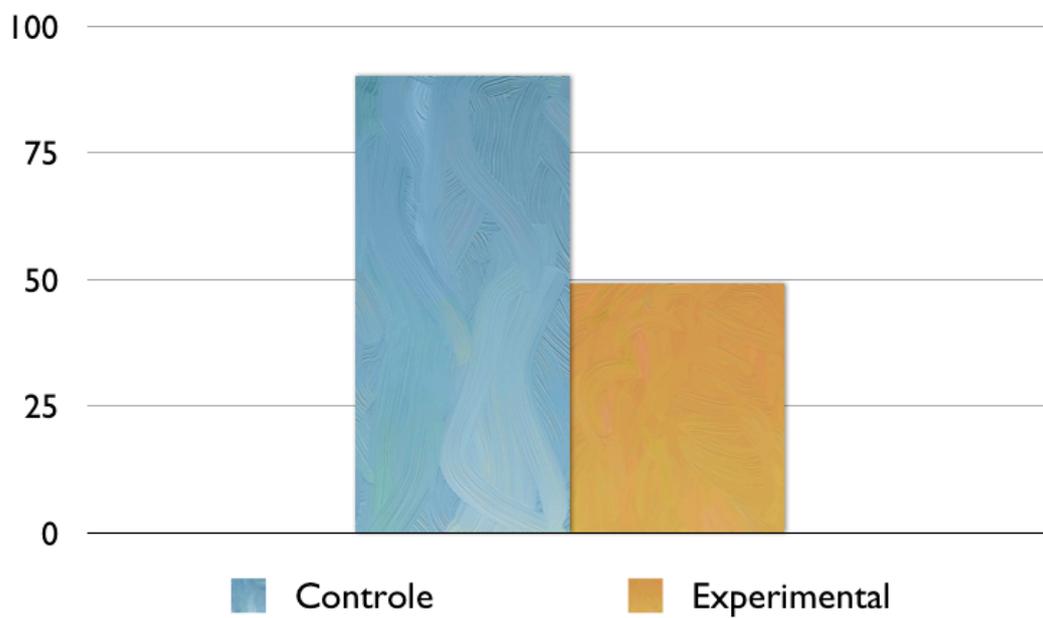
**Tabela 3** – Percentual de colágeno tipo I (vermelho)

	Média	Variância	Significância
Grupo Controle	89,275	± 0,494	p< 0,001
Grupo Experimental	45,932	± 3,904	p< 0,001

**Gráfico 3** – Percentual de colágeno tipo I

**Tabela 4** – Percentual de colágeno tipo I (vermelho e amarelo)

	Média	Variância	Significância
Grupo Controle	90,118	$\pm 0,437$	$p < 0,001$
Grupo Experimental	49,269	$\pm 3,986$	$p < 0,001$

**Gráfico 4** – Percentual de colágeno tipo I (Vermelho e Amarelo)

## 5 DISCUSSÃO

O primeiro passo para o desenvolvimento de um modelo animal é a escolha da espécie apropriada. Não há animal com características iguais as dos humanos, nenhum deles representa o padrão ouro (Warden, 2007). Por conta disso, muitas espécies são usadas como modelos, primatas (Manske, Ogata e Lesker, 1985), cavalos, ovinos, cachorros, ratos e camundongos, são os mais utilizados (Zantop *et al.*, 2006). Os animais pequenos (coelhos, ratos e camundongos) são mais populares pela facilidade de manuseio, sendo os dois últimos preferidos pelo menor custo e tempo de gestação, bem como pelo rápido crescimento. Em nosso estudo, optamos pelo uso de ratos por serem maiores e conseqüentemente com tendões de mais fácil visualização e dissecação que os camundongos e de manuseio mais simples que os coelhos.

O experimento mostra que no grupo que foi submetido à atividade em esteira obtivemos um aumento da densidade celular característico dos quadros de tendinose (Khan *et al.*, 1999), sem a presença de células indicadoras de atividade inflamatória aguda que, conforme descrito por Maffulli, Khan e Puddu (1998), são definidores do conceito dessa patologia.

A hipercelularidade foi aferida pela contagem de tenócitos em dois campos por lâmina. Observou-se um aumento, estatisticamente significativo, do grupo experimental em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). Portanto, no grupo submetido ao estresse mecânico houve incremento do número de células, achado compatível com processo degenerativo da tendinose (Nakama *et al.*, 2005).

O colágeno é responsável por 70% do peso seco da estrutura tendinosa (O'brien, 1992). No tendão normal é predominante a presença do colágeno tipo I (Rufai, Ralphs e Benjamin, 1995). A grande força de tensão dessas estruturas é baseado no arranjo em paralelo das moléculas de colágeno e a covalência transversa formada entre estas e as fibrilas (Bailey e Lapierre, 1973).

Ippolito *et al.* (1980) realizaram experimentos utilizando tendões normais e tendões acometidos de tendinose, demonstrando que nos lesionados há uma redução na quantidade de colágeno tipo I e um significativo aumento do tipo III. O decréscimo do colágeno tipo I e o aumento do colágeno tipo III produz um tendão com menor resistência a tração mecânica, pois o tipo I é formado por fibras colágenas mais densas (1 a 20  $\mu\text{m}$ ) e o tipo III formado por

fibras reticulares, mais delgadas (0,5 a 2  $\mu\text{m}$ ). A diminuição da resistência da estrutura associada a continuidade do estresse mecânico sobre ela pode levar a rotura (ANEXO B).

Em nosso trabalho utilizamos o software desenvolvido na Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, SAMM (Sistema de Análise Morfométrica) na versão 1.0 (Fechine-Jamacaru, Fechine Junior e De Moraes Filho, 2005). Esta metodologia de quantificação de colágeno, já foi validada por diversos autores, sendo utilizada para averiguar percentual de colágeno em pele de camundongos (Rocha, 2010), fêmur de ratos (Rocha, 2011), entre outros.

Obtivemos resultados compatíveis com os da literatura no tocante ao decréscimo do percentual vermelho e vermelho + amarelo do grupo experimental em relação ao controle de maneira estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ). Portanto houve uma diminuição da quantidade de colágeno tipo I no grupo submetido ao estresse mecânico. Entretanto, observamos um aumento da variância do grupo experimental ( $\pm 3,904$  e  $\pm 3,986$ , vermelho e vermelho + amarelo, respectivamente) em relação ao grupo controle ( $\pm 0,494$  e  $\pm 0,437$ ). Atribuimos essa diferença a forma idiossincrática do acometimento da doença tendinosa, conforme afirma Maffulli *et al.* (2000), tendo as cobaias graus diferentes de acometimento.

Em relação a coloração verde, correspondendo ao colágeno tipo III, os resultados são semelhantes. Há um incremento na proporção deste de forma estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ). Mas como nos grupos anteriores, observamos uma maior variância do grupo experimental ( $\pm 4,002$ ) em relação ao grupo controle ( $\pm 0,435$ ), ratificando o acometimento variável das cobaias.

O aumento da produção de colágeno tipo III (ou uma produção diminuída de colágeno tipo I) pode ser uma característica adquirida dos tendões submetidos a injúria crônica. É também concebível que tenócitos de alguns indivíduos estão prontos para produzir maiores quantidades de colágeno tipo III ou uma produção menor do tipo I. Ambas as instâncias podem coexistir, como o que acontece no nosso experimento. Segundo Nirschl (1992), é possível que pessoas com uma capacidade aumentada para produzir colágeno tipo III que, por razões ocupacionais ou atléticas, estão expostas a repetitivos estresses aos seus tendões, produzirem mais colágeno tipo III do que outras pessoas, resultando em degeneração de seus tendões, e conseqüente lesão.

O aumento do número de células é reflexo da tentativa de recuperação celular frente a sobrecarga constante (Knobloch, Yoon e Vogt, 2008). A alta atividade nuclear (que se reproduzem através de mitoses) gera um aumento da densidade celular (Silva, 2008). Na tentativa de renovação do tecido, há um aumento da matriz extracelular, principalmente

colágeno. Essa tentativa frustrada de manter a homeostase tecidual é refletida através da síntese predominante de colágeno tipo III (Visentini *et al.*, 1998).

Scott, Khan e Duronio (2005) afirmaram que a morte celular dos tenócitos (cujo principal mecanismo é a apoptose) que acontece na evolução da tendinose, não estimula reação inflamatória, havendo mínima quantidade de células em necrose. O que corresponde ao que visualizamos em nosso experimento. Isso se dá pelo fato da apoptose ser uma morte celular programada, que pode acontecer fisiologicamente ou por patologia (no caso da tendinose, sobrecarga mecânica), onde o conteúdo intracelular é fragmentado sem alterações em sua membrana e endocitado por células vizinhas sem desencadear a ativação de células fagocitárias (inflamatórias).

Os tenócitos tem a capacidade de responder às cargas com a finalidade de manter a homeostase tecidual através do mecanismo de mecanotransdução (Ingber, 1997). Há invaginações nos fibroblastos que contém fibrilas de colágeno (que podem transmitir forças), alterando o mecanismo de resposta celular no que diz respeito a deformação, ou seja, a carga capaz de deformar a matriz extracelular pode ser transmitida ao citoesqueleto (Provenzano *et al.*, 2002). As respostas metabólicas adaptativas ou patológicas são fruto de um sistema mecano-sensorial de tensegridade (Wang, Iosifidis e Fu, 2006). Portanto, sobrecargas mecânicas constantes, porém de intensidade não capaz de uma deformidade plástica total conduzem o tendão a uma resposta patológica degenerativa livre de um infiltrado inflamatório clássico (Silva *et al.*, 2011).

As lesões podem ocorrer na inserção do tendão ao osso (ênese), bem como no seu corpo. Maganaris, Narici e Maffulli (2008) relatam que as alterações degenerativas concentram-se na ênese, sendo este o local mais comum de rotura. Optamos, portanto, por realizar os cortes para as análises do eixo central de forma longitudinal, com o objetivo de captar as lesões melhor estabelecidas.

Segundo Courtine *et al.* (2005), os quadrúpedes tem característica predominantemente propulsora nas patas posteriores e desaceleradora nos membros anteriores. Silva *et al.* (2011) atribuem a esse fator a falha na indução de tendinose em patas posteriores do modelo proposto por Huang, Perry e Soslowsky (2004), que utilizava declínio de  $10^\circ$ , o modelo não priorizaria a contração excêntrica do tríceps sural, inclusive com a contribuição da própria gravidade na propulsão. Foi desenvolvido, então, um modelo que utilizava inclinação de  $10^\circ$  para induzir lesão de Aquiles. As cobaias eram submetidas a uma velocidade 26,8 m/min, ou seja 44,67 cm/s. Em nossos estudos preliminares, essa velocidade não foi conseguida de maneira uniforme nas cobaias. Optamos, portanto, por utilizar velocidade próxima ao que

imprimiu o modelo de Soslowky *et al.* (2000) para tendinose de supraespinhoso, utilizamos velocidade de 30 cm/s (18m/min) obtendo resultado positivos para indução de tendinose Aquiles com a inclinação de 10°.

É de suma importância a padronização e capacidade reprodução de um método indutor de tendinose em animais que mimetize quer na cronologia, quer nas alterações histomorfométricas, esse evento em humanos. Isso permitirá a pesquisa tanto da fisiopatologia do evento, como de sua terapêutica e principalmente profilaxia através de nutracêuticos que sabidamente são inibidores de apoptose celular (Leitao *et al.*, 2011).

## **6 CONCLUSÃO**

Os resultados levam a conclusão que o modelo proposto de indução da tendinose de Aquiles em ratos, é válido. O que permite que o mesmo seja utilizado em pesquisas futuras que tenham propósito de realizar estudos mecânicos, histopatológicos, morfométricos, profiláticos ou terapêuticos desta patologia.

## REFERÊNCIAS

AHTIKOSKI, A. M. et al. Regulation of type IV collagen gene expression and degradation in fast and slow muscles during dexamethasone treatment and exercise. **Pflugers Arch**, v. 448, n. 1, p. 123-30, Apr 2004. ISSN 0031-6768 (Print)  
0031-6768 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14685862> >.

ALFREDSON, H. et al. Glutamate NMDAR1 receptors localised to nerves in human Achilles tendons. Implications for treatment? **Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc**, v. 9, n. 2, p. 123-6, 2001. ISSN 0942-2056 (Print)  
0942-2056 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11354854> >.

ALLEN, G. M.; TAURO, P. G.; OSTLERE, S. J. Proximal patellar tendinosis and abnormalities of patellar tracking. **Skeletal Radiol**, v. 28, n. 4, p. 220-3, Apr 1999. ISSN 0364-2348 (Print)  
0364-2348 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10384993> >.

ARCHAMBAULT, J. M.; WILEY, J. P.; BRAY, R. C. Exercise loading of tendons and the development of overuse injuries. A review of current literature. **Sports Med**, v. 20, n. 2, p. 77-89, Aug 1995. ISSN 0112-1642 (Print)  
0112-1642 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7481284> >.

BACKMAN, C. et al. Chronic achilles paratenonitis with tendinosis: an experimental model in the rabbit. **J Orthop Res**, v. 8, n. 4, p. 541-7, Jul 1990. ISSN 0736-0266 (Print)  
0736-0266 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2355294> >.

BAILEY, A. J.; LAPIERE, C. M. Effect of an additional peptide extension of the N-terminus of collagen from dermosparactic calves on the cross-linking of the collagen fibres. **Eur J Biochem**, v. 34, n. 1, p. 91-6, Apr 2 1973. ISSN 0014-2956 (Print)  
0014-2956 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4701498> >.

BUTLER, D. L. et al. Biomechanics of ligaments and tendons. **Exerc Sport Sci Rev**, v. 6, p. 125-81, 1978. ISSN 0091-6331 (Print)  
0091-6331 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/394967> >.

CHO, N. S. et al. Tendinosis-like histologic and molecular changes of the Achilles tendon to repetitive stress: a pilot study in rats. **Clin Orthop Relat Res**, v. 469, n. 11, p. 3172-80, Nov 2011. ISSN 1528-1132 (Electronic)  
0009-921X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21800208> >.

COLLINS, M.; RALEIGH, S. M. Genetic risk factors for musculoskeletal soft tissue injuries. **Med Sport Sci**, v. 54, p. 136-49, 2009. ISSN 0254-5020 (Print) 0076-6070 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19696512> >.

COURTINE, G. et al. Kinematic and EMG determinants in quadrupedal locomotion of a non-human primate (Rhesus). **J Neurophysiol**, v. 93, n. 6, p. 3127-45, Jun 2005. ISSN 0022-3077 (Print) 0022-3077 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15647397> >.

EGAWA, E. Y. et al. Enhanced proliferation of neural stem cells in a collagen hydrogel incorporating engineered epidermal growth factor. **Biomaterials**, v. 32, n. 21, p. 4737-43, Jul 2011. ISSN 1878-5905 (Electronic) 0142-9612 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21481452> >.

EYDEN, B.; TZAPHLIDOU, M. Structural variations of collagen in normal and pathological tissues: role of electron microscopy. **Micron**, v. 32, n. 3, p. 287-300, Apr 2001. ISSN 0968-4328 (Print) 0968-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11006508> >.

FECHINE-JAMACARU, F. V.; FECHINE JUNIOR, J. U.; DE MORAES FILHO, M. O. [Model of inflammatory angiogenesis in rabbit cornea induced by punctual alkaline cauterization]. **Acta Cir Bras**, v. 20, n. 1, p. 64-73, Jan-Feb 2005. ISSN 0102-8650 (Print) 0102-8650 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15810467> >.

FU, S. C.; CHAN, K. M.; ROLF, C. G. Increased deposition of sulfated glycosaminoglycans in human patellar tendinopathy. **Clin J Sport Med**, v. 17, n. 2, p. 129-34, Mar 2007. ISSN 1050-642X (Print) 1050-642X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17414481> >.

FYFE, I.; STANISH, W. D. The use of eccentric training and stretching in the treatment and prevention of tendon injuries. **Clin Sports Med**, v. 11, n. 3, p. 601-24, Jul 1992. ISSN 0278-5919 (Print) 0278-5919 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1638642> >.

GLAZEBROOK M.A., W. J. J. R., LANGMAN M., STANISH W.D., LEE J.M. Histological Analysis of Achilles Tendons in an Overuse Rat Model. **J Orthop Res**, v. 25, n. 1554-527X, p. 1-8, 2007. ISSN 1554-527X.

GROSS, M. T. Chronic tendinitis: pathomechanics of injury, factors affecting the healing response, and treatment. **J Orthop Sports Phys Ther**, v. 16, n. 6, p. 248-61, 1992. ISSN 0190-6011 (Print)

0190-6011 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18796742> >.

HUANG, T. F.; PERRY, S. M.; SOSLOWSKY, L. J. The effect of overuse activity on Achilles tendon in an animal model: a biomechanical study. **Ann Biomed Eng**, v. 32, n. 3, p. 336-41, Mar 2004. ISSN 0090-6964 (Print)

0090-6964 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15095808> >.

INGBER, D. E. Tensegrity: the architectural basis of cellular mechanotransduction. **Annu Rev Physiol**, v. 59, p. 575-99, 1997. ISSN 0066-4278 (Print)

0066-4278 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9074778> >.

IPPOLITO, E. et al. Morphological, immunochemical, and biochemical study of rabbit achilles tendon at various ages. **J Bone Joint Surg Am**, v. 62, n. 4, p. 583-98, 1980. ISSN 0021-9355 (Print). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6991502> >.

JARVINEN, M. et al. Histopathological findings in chronic tendon disorders. **Scand J Med Sci Sports**, v. 7, n. 2, p. 86-95, Apr 1997. ISSN 0905-7188 (Print)

0905-7188 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9211609> >.

JOZSA, L. et al. Three-dimensional ultrastructure of human tendons. **Acta Anat (Basel)**, v. 142, n. 4, p. 306-12, 1991. ISSN 0001-5180 (Print)

0001-5180 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1801522> >.

KADER, D. et al. Achilles tendinopathy: some aspects of basic science and clinical management. **Br J Sports Med**, v. 36, n. 4, p. 239-49, Aug 2002. ISSN 0306-3674 (Print)

0306-3674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12145112> >.

KANNUS, P. Etiology and pathophysiology of chronic tendon disorders in sports. **Scand J Med Sci Sports**, v. 7, n. 2, p. 78-85, Apr 1997. ISSN 0905-7188 (Print)

0905-7188 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9211608> >.

KANNUS, P.; NATRI, A. Etiology and pathophysiology of tendon ruptures in sports. **Scand J Med Sci Sports**, v. 7, n. 2, p. 107-12, Apr 1997. ISSN 0905-7188 (Print)

0905-7188 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9211611> >.

KARUBE, I.; SUZUKI, S. Electrochemical aggregation of tropocollagen. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 48, n. 2, p. 320-5, Jul 25 1972. ISSN 0006-291X (Print)

0006-291X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5043186> >.

KESLER, G. et al. Differences in histochemical characteristics of gingival collagen after ER:YAG laser periodontal plastic surgery. **J Clin Laser Med Surg**, v. 18, n. 4, p. 203-7, Aug 2000. ISSN 1044-5471 (Print)  
1044-5471 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11573512>>.

KHAN, K. M. et al. Histopathology of common tendinopathies. Update and implications for clinical management. **Sports Med**, v. 27, n. 6, p. 393-408, Jun 1999. ISSN 0112-1642 (Print)  
0112-1642 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10418074>>.

KHAN, K. M. et al. Subcutaneous rupture of the Achilles tendon. **Br J Sports Med**, v. 32, n. 2, p. 184-5, Jun 1998. ISSN 0306-3674 (Print)  
0306-3674 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9631234>>.

KHAN, K. M. et al. Patellar tendinopathy: some aspects of basic science and clinical management. **Br J Sports Med**, v. 32, n. 4, p. 346-55, Dec 1998. ISSN 0306-3674 (Print)  
0306-3674 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9865413>>.

KNOBLOCH, K.; YOON, U.; VOGT, P. M. Acute and overuse injuries correlated to hours of training in master running athletes. **Foot Ankle Int**, v. 29, n. 7, p. 671-6, Jul 2008. ISSN 1071-1007 (Print)  
1071-1007 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18785416>>.

LAKE, S. P.; ANSORGE, H. L.; SOSLOWSKY, L. J. Animal models of tendinopathy. **Disabil Rehabil**, v. 30, n. 20-22, p. 1530-41, 2008. ISSN 0963-8288 (Print)  
0963-8288 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18608372>>.

LEITAO, J. P. et al. L-alanyl-glutamine dipeptide pretreatment attenuates ischemia-reperfusion injury in rat testis. **Acta Cir Bras**, v. 26 Suppl 1, p. 21-5, 2011. ISSN 1678-2674 (Electronic)  
0102-8650 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21971652>>.

LIEBICH, H. M. et al. Non-enzymatic glycation of histones. **Biol Mass Spectrom**, v. 22, n. 2, p. 121-3, Feb 1993. ISSN 1052-9306 (Print)  
1052-9306 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8448220>>.

LUI, P. P. et al. What are the validated animal models for tendinopathy? **Scand J Med Sci Sports**, v. 21, n. 1, p. 3-17, Feb 2011. ISSN 1600-0838 (Electronic)  
0905-7188 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20673247>>.

MAFFULLI, N. et al. Tenocytes from ruptured and tendinopathic achilles tendons produce greater quantities of type III collagen than tenocytes from normal achilles tendons. An in vitro model of human tendon healing. **Am J Sports Med**, v. 28, n. 4, p. 499-505, Jul-Aug 2000. ISSN 0363-5465 (Print)

0363-5465 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10921640> >.

MAFFULLI, N.; KHAN, K. M.; PUDDU, G. Overuse tendon conditions: time to change a confusing terminology. **Arthroscopy**, v. 14, n. 8, p. 840-3, Nov-Dec 1998. ISSN 0749-8063 (Print)

0749-8063 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9848596> >.

MAGANARIS, C. N.; NARICI, M. V.; MAFFULLI, N. Biomechanics of the Achilles tendon. **Disabil Rehabil**, v. 30, n. 20-22, p. 1542-7, 2008. ISSN 0963-8288 (Print)

0963-8288 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18720120> >.

MANSKE, P. R.; OGATA, K.; LESKER, P. A. Nutrient pathways to extensor tendons of primates. **J Hand Surg Br**, v. 10, n. 1, p. 8-10, Feb 1985. ISSN 0266-7681 (Print)

0266-7681 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3998611> >.

MESSNER, K. et al. Rat model of Achilles tendon disorder. A pilot study. **Cells Tissues Organs**, v. 165, n. 1, p. 30-9, 1999. ISSN 1422-6405 (Print)

1422-6405 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10460971> >.

MILLER, A. E.; VOGEL, T. A. Haglund's deformity and the Keck and Kelly osteotomy: a retrospective analysis. **J Foot Surg**, v. 28, n. 1, p. 23-9, Jan-Feb 1989. ISSN 0449-2544 (Print)

0449-2544 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2654263> >.

NAKAMA, L. H. et al. Evidence of tendon microtears due to cyclical loading in an in vivo tendinopathy model. **J Orthop Res**, v. 23, n. 5, p. 1199-205, Sep 2005. ISSN 0736-0266 (Print)

0736-0266 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16140201> >.

NIRSCHL, R. P. Elbow tendinosis/tennis elbow. **Clin Sports Med**, v. 11, n. 4, p. 851-70, Oct 1992. ISSN 0278-5919 (Print)

0278-5919 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1423702> >.

O'BRIEN, M. Functional anatomy and physiology of tendons. **Clin Sports Med**, v. 11, n. 3, p. 505-20, Jul 1992. ISSN 0278-5919 (Print)

0278-5919 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1638638> >.

PERRY, S. M. et al. Inflammatory and angiogenic mRNA levels are altered in a supraspinatus tendon overuse animal model. **J Shoulder Elbow Surg**, v. 14, n. 1 Suppl S, p. 79S-83S, Jan-Feb 2005. ISSN 1058-2746 (Print)

1058-2746 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15726091> >.

PROVENZANO, P. P. et al. Subfailure damage in ligament: a structural and cellular evaluation. **J Appl Physiol** (1985), v. 92, n. 1, p. 362-71, Jan 2002. ISSN 8750-7587 (Print)

0161-7567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11744679> >.

PUDDU, G.; IPPOLITO, E.; POSTACCHINI, F. A classification of Achilles tendon disease. **Am J Sports Med**, v. 4, n. 4, p. 145-50, Jul-Aug 1976. ISSN 0363-5465 (Print)

0363-5465 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/984291> >.

RALEIGH, S. M. et al. Variants within the MMP3 gene are associated with Achilles tendinopathy: possible interaction with the COL5A1 gene. **Br J Sports Med**, v. 43, n. 7, p. 514-20, Jul 2009. ISSN 1473-0480 (Electronic)

0306-3674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19042922> >.

ROCHA, J. L. C. **Estudo dos efeitos do tratamento tópico da mitomicina C na cicatrização na pele dorsal dos camundongos swiss albino submetidos a queimadura térmica**. 2010. 88f (Mestrado). Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, Universidade Federal do Ceará

ROCHA, S. N. C. **Efeitos do ácido zoledrônico na consolidação de fraturas da diáfise femoral de ratos**. 2011. 64f (Mestrado). Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, Universidade Federal do Ceará

RUFAL, A.; RALPHS, J. R.; BENJAMIN, M. Structure and histopathology of the insertional region of the human Achilles tendon. **J Orthop Res**, v. 13, n. 4, p. 585-93, Jul 1995. ISSN 0736-0266 (Print)

0736-0266 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7674075> >.

SCOTT, A.; KHAN, K. M.; DURONIO, V. IGF-I activates PKB and prevents anoxic apoptosis in Achilles tendon cells. **J Orthop Res**, v. 23, n. 5, p. 1219-25, Sep 2005. ISSN 0736-0266 (Print)

0736-0266 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16140203> >.

SILVA, R. D. **Modelo Experimental de Indução à Tendinose de Aquiles: Um Estudo Morfométrico**. 2008. (Dissertação Mestrado). Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais

SILVA, R. D. et al. Achilles tendinosis: a morphometrical study in a rat model. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 4, n. 7, p. 683-91, 2011. ISSN 1936-2625 (Electronic) 1936-2625 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22076169> >.

SOMMER, H. M. The biomechanical and metabolic effects of a running regime on the Achilles tendon in the rat. **Int Orthop**, v. 11, n. 1, p. 71-5, 1987. ISSN 0341-2695 (Print) 0341-2695 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3557758> >.

SOSLOWSKY, L. J. et al. Neer Award 1999. Overuse activity injures the supraspinatus tendon in an animal model: a histologic and biomechanical study. **J Shoulder Elbow Surg**, v. 9, n. 2, p. 79-84, Mar-Apr 2000. ISSN 1058-2746 (Print) 1058-2746 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10810684> >.

SULLO, A. et al. The effects of prolonged peritendinous administration of PGE1 to the rat Achilles tendon: a possible animal model of chronic Achilles tendinopathy. **J Orthop Sci**, v. 6, n. 4, p. 349-57, 2001. ISSN 0949-2658 (Print) 0949-2658 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11479765> >.

SZOMOR, Z. L.; APPELYARD, R. C.; MURRELL, G. A. Overexpression of nitric oxide synthases in tendon overuse. **J Orthop Res**, v. 24, n. 1, p. 80-6, Jan 2006. ISSN 0736-0266 (Print) 0736-0266 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16419972> >.

VISENTINI, P. J. et al. The VISA score: an index of severity of symptoms in patients with jumper's knee (patellar tendinosis). Victorian Institute of Sport Tendon Study Group. **J Sci Med Sport**, v. 1, n. 1, p. 22-8, Jan 1998. ISSN 1440-2440 (Print). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9732118> >.

WANG, J. H.; IOSIFIDIS, M. I.; FU, F. H. Biomechanical basis for tendinopathy. **Clin Orthop Relat Res**, v. 443, p. 320-32, Feb 2006. ISSN 0009-921X (Print) 0009-921X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16462458> >.

WARDEN, S. J. Animal models for the study of tendinopathy. **Br J Sports Med**, v. 41, n. 4, p. 232-40, Apr 2007. ISSN 1473-0480 (Electronic) 0306-3674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17127722> >.

YANG, J. et al. Epidemiology of overuse and acute injuries among competitive collegiate athletes. **J Athl Train**, v. 47, n. 2, p. 198-204, Mar-Apr 2012. ISSN 1938-162X (Electronic) 1062-6050 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22488286> >.

YUAN, J. et al. Apoptosis in rotator cuff tendonopathy. **J Orthop Res**, v. 20, n. 6, p. 1372-9, Nov 2002. ISSN 0736-0266 (Print)

0736-0266 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12472255>>.

ZANTOP, T. et al. Extracellular matrix scaffolds are repopulated by bone marrow-derived cells in a mouse model of achilles tendon reconstruction. **J Orthop Res**, v. 24, n. 6, p. 1299-309, Jun 2006. ISSN 0736-0266 (Print)

0736-0266 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16649228>>.

## APÊNDICE A – APROVAÇÃO CEPA



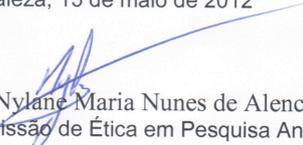
Universidade Federal do Ceará  
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA  
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo  
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE  
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

### DECLARAÇÃO

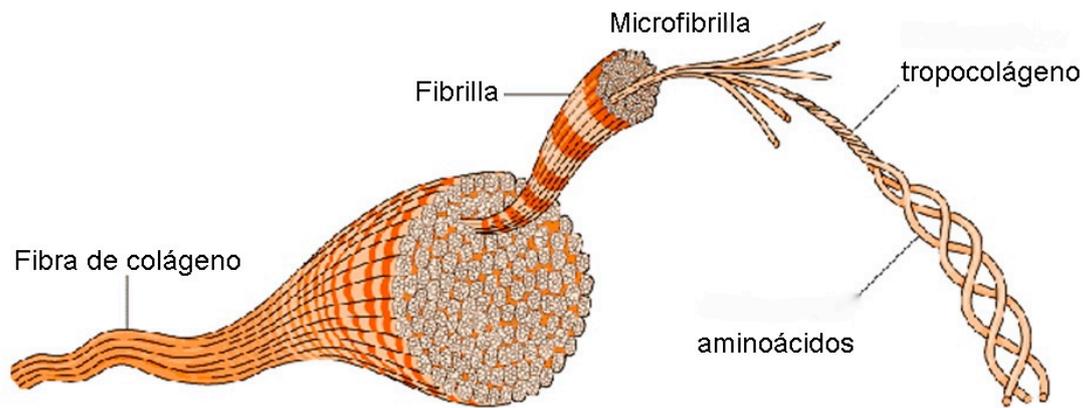
Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação n° 42/2011, sobre o projeto intitulado: **“EFEITOS DA L-ALANIL-GLUTAMINA NA PREVENÇÃO DA TENDINOSE EM RATOS”**, de responsabilidade de JOSÉ ALBERTO DIAS LEITE, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA – em reunião realizada em 07 de dezembro de 2011.

Fortaleza, 15 de maio de 2012

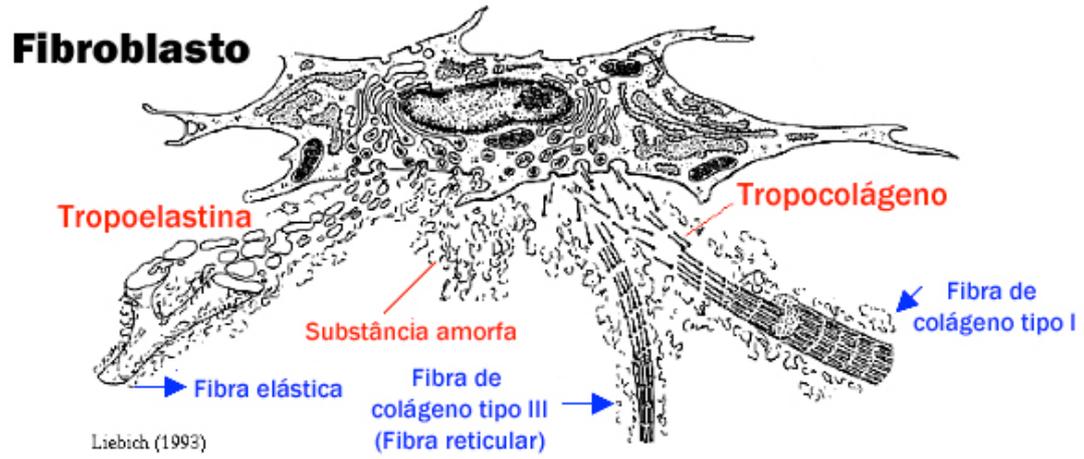
  
Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar  
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA

## ANEXO A - ESTRUTURA EM TRIPLA HÉLICE E COMPOSIÇÃO DAS FIBRAS DE COLÁGENO



Adaptação JUNQUEIRA, L. C.; Carneiro, J. **Histologia Básica**. 12a ed. 2013.

## ANEXO B - DIFERENÇA COLÁGENO TIPO I E III



Adaptado de Liebich *et al.* (1993)