

**Rafael Duarte Silva**

**Modelo experimental de indução à tendinose  
de Aquiles: Um estudo morfométrico**

**Belo Horizonte  
Faculdade de Medicina  
Universidade Federal de Minas Gerais  
2008**

**Rafael Duarte Silva**

**Modelo experimental de indução à tendinose  
de Aquiles: Um estudo morfométrico**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Patologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Anilton César Vasconcelos

Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Tânia Clarete Sampaio

**Belo Horizonte  
Faculdade de Medicina  
Universidade Federal de Minas Gerais  
2008**

Silva, Rafael Duarte.

S586m Modelo experimental de indução à tendinose de Aquiles  
[manuscrito]; um estudo morfométrico. / Rafael Duarte Silva.  
- - Belo Horizonte: 2008.

91f.: il.

Orientador: Anilton César Vasconcelos.

Co-orientadora: Tânia Clarete Sampaio.

Área de concentração: Patologia.

Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas  
Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Tendinopatia. 2. Tendão do Calcâneo/etiologia. 3.  
Modalidades de Fisioterapia. 4. Dissertações Acadêmicas. I.  
Vasconcelos, Anilton César. II. Sampaio, Tânia Clarete. III.  
Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de  
Medicina. IV. Título

NLM: WE 600





**Dedico este trabalho aos meus pais, Nívio e Lourdes, pelo amor incondicional, à Fernanda, minha companheira, à minha irmã Lívia, pela credibilidade, e aos meus familiares e amigos por todo apoio.**

## **Agradecimentos**

- Primeiramente à Deus, por mais uma etapa vencida.
- Ao Prof. Dr. Anílton César Vasconcelos, por ter acreditado no projeto e pela sincera amizade. Muito obrigado Professor Anílton!
- A todos os meus professores da Faculdade de Ciências Médicas de Minas Gerais, que foram exemplo de profissionalismo em minha carreira, e em especial a Prof<sup>a</sup>. Dra. Tânia Clarete Sampaio, pela sua contribuição no trabalho.
- A todos os professores da Universidade Federal de Minas Gerais, em especial a Prof<sup>a</sup>. Dra. Denise Carmona Cara, que me “abriu as portas” do Departamento de Patologia.
- Ao Prof. Dr. Mark Anthony Glazebrook, por sua atenção e assistência.
- Ao meu pai, à minha mãe e à minha irmã, pela credibilidade e amor incondicional.
- À Fernanda, pelo amor, companherismo e paciência nos momentos difíceis.
- A todos os integrantes do Laboratório de Apoptose, em especial minha amiga Laís, que sempre se demonstrou disponível em ajudar.
- Aos meus colegas de profissão, pelo incentivo de buscar sempre mais, pois nada é impossível.
- A todos os meus familiares e amigos, que sempre estiveram do meu lado.
- Ao Departamento de Farmacologia, pelas contribuições no projeto.
- À FAPEMIG e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

**“Aprende que não importa aonde já chegou, mas aonde está indo...”**

**“... e que ser flexível não significa ser fraco ou sem personalidade, pois não importa o quão delicada e frágil é uma situação, sempre existem dois lados.”**

**“Aprende que paciência requer muita prática...”**

**“... e que maturidade tem mais a ver com os tipos de experiência que se teve e o que você aprendeu com elas, do que com quantos aniversários você celebrou.”**

**“Portanto, plante seu jardim e decore sua alma em vez de esperar que alguém lhe traga flores.”**

**“Nossas dádivas são traidoras e nos fazem perder o bem que poderíamos conquistar se não fosse o medo de tentar.”**

**O Menestrel – William Shakespeare**



## **Resumo**

**Introdução:** Microscopicamente, a tendinopatia se apresenta com desorganização e microruptura das fibras de colágeno, hiper celularidade, maior deposição de colágeno tipo III e glicosaminoglicanos.

**Objetivo:** Avaliar morfometricamente os eventos envolvidos na patogenia e evolução da tendinose de Aquiles utilizando um modelo de indução em ratos machos.

**Metodologia:** Foram utilizados trinta ratos machos Wistar divididos aleatoriamente em Grupo experimental ( $n=15$ ) e Grupo controle ( $n=15$ ). Cada grupo foi dividido nos intervalos de quatro ( $n=5$ ), oito ( $n=5$ ) e dezesseis ( $n=5$ ) semanas. O grupo experimental correu em uma esteira adaptada cinco vezes por semana, durante 80 minutos diários, com velocidade de 26,8 m/min. Após o protocolo, os animais foram submetidos à eutanásia e os tendões de Aquiles direito e esquerdo foram extirpados, fixados e processados. Em seguida, realizou-se as colorações de Hematoxilina-Eosina, Picrosirius Red, Alcian Blue, AgNOR e TUNEL.

**Resultados:** A densidade celular e as lacunas intersticiais aumentaram nos grupos experimentais da quarta ( $0,92 \pm 0,06$  vs  $0,61 \pm 0,05$  -  $P<0,01$ ) (9,93  $\pm$  1,55 vs 3,7  $\pm$  0,79 -  $P<0,01$ ), oitava ( $0,85 \pm 0,04$  vs  $0,58 \pm 0,06$  -  $P<0,05$ ) (11,6  $\pm$  2,59 vs 3,81  $\pm$  0,87 -  $P<0,01$ ) e décima sexta ( $0,82 \pm 0,04$  vs  $0,53 \pm 0,06$  -  $P<0,01$ ) (12,13  $\pm$  1,03 vs 4,44  $\pm$  0,56 -  $P<0,001$ ) semana, respectivamente. Houve maior deposição de colágeno tipo III e glicosaminoglicanos nos grupos experimentais da quarta ( $43.4 \pm 3.84$  vs  $6.57 \pm 3.06$  -  $P<0.001$ ) (8,33  $\pm$  1,17 vs 3,97  $\pm$  0,71 -  $P<0,01$ ), oitava ( $50.45 \pm 4.2$  vs  $6.71 \pm 2.84$  -  $P<0.0001$ ) (9,12  $\pm$  1,17 vs 4,19  $\pm$  0,75 -  $P<0,01$ ) e décima sexta ( $59.6 \pm 2.41$  vs  $4.96 \pm 1.32$  -  $P<0.0001$ ) (12,53  $\pm$  1,56 vs 3,84  $\pm$  0,66 -  $P<0,01$ ) semana, respectivamente. A expressão da atividade celular foi maior nos grupos experimentais (4 grumos/núcleo vs 2 grumos/núcleo -  $P<0,0001$ ) de todos os intervalos de tempo.

**Conclusão:** Pode-se observar que o modelo proposto é eficaz para desenvolver uma lesão degenerativa no tendão de Aquiles livre de infiltrado inflamatório. Apartir desse modelo, futuras pesquisas devem investigar o efeito das diversas terapias físicas e farmacológicas para a tendinose de Aquiles.

**Palavras-chaves:** *tendinopatia, tendão de Aquiles, experimento animal.*

## **Abstract**

**Background:** Microscopically, tendinosis presents collagen fibers disorganization and microtears, hipercellularity, higher collagen type III and glicosaminoglicans deposition.

**Purpose:** Morphometric evaluation of the Aquiles tendinosis` pathogen events and evolution, using a male rats induction model.

**Methods:** Thirty male Wistar rats were randomized splitted in an experimental ( $n=15$ ) and a control groups ( $n=15$ ). Five animals/group were euthanized at four, eight and sixteen weeks. Experimental group ran on an adapted treadmill 5 times a week, 80 minutes daily, at 26.8 m/min. Then, the right and left Achilles tendons were collected and processed. Obtained slides were stained by Hematoxilyn-Eosin, Picrosirius Red, Alcian Blue, AgNOR and TUNEL.

**Results:** Cellular density and microtearing raised in the experimental group at fourth ( $0.92 \pm 0.06$  vs  $0.61 \pm 0.05$  -  $P<0.01$ ) ( $9.93 \pm 1.55$  vs  $3.7 \pm 0.79$  -  $P<0.01$ ), eighth ( $0.85 \pm 0.04$  vs  $0.58 \pm 0.06$  -  $P<0.05$ ) ( $11.6 \pm 2.59$  vs  $3.81 \pm 0.87$  -  $P<0.01$ ) and sixteenth ( $0.82 \pm 0.04$  vs  $0.53 \pm 0.06$  -  $P<0.01$ ) ( $12.13 \pm 1.03$  vs  $4.44 \pm 0.56$  -  $P<0.001$ ) weeks, respectively. There were more type III collagen and glycosaminoglycans deposition in the experimental group at fourth ( $43.4 \pm 3.84$  vs  $6.57 \pm 3.06$  -  $P<0.001$ ) ( $8.33 \pm 1.17$  vs  $3.97 \pm 0.71$  -  $P<0.01$ ), eighth ( $50.45 \pm 4.2$  vs  $6.71 \pm 2.84$  -  $P<0.0001$ ) ( $9.12 \pm 1.17$  vs  $4.19 \pm 0.75$  -  $P<0.01$ ) and sixteenth ( $59.6 \pm 2.41$  vs  $4.96 \pm 1.32$  -  $P<0.0001$ ) ( $12.53 \pm 1.56$  vs  $3.84 \pm 0.66$  -  $P<0.01$ ) weeks, respectively. The cellular activity expression was higher in the experimental groups (4 clusters/nucleus vs 2 clusters/nucleus -  $P<0.0001$ ) of all time intervals.

**Conclusions:** The proposed model was able to induce degenerative injury and morphometry showed important results. Future researches must investigate physical and pharmacological therapies effects to the Achilles tendinosis.

**Keywords:** *tendinopathy, Achilles tendon, animal experimentation.*

## Lista de figuras

	Página
<b>Figura I</b>	Molécula de tropocolágeno composta por três cadeias peptídicas, sendo duas do tipo $\alpha 1$ e uma do tipo $\alpha 2$ ..... 13
<b>Figura II</b>	Organização das fibras de colágeno no tendão..... 14
<b>Figura III</b>	Arranjo das fibras de colágeno nos tendões (A) e nos ligamentos (B)..... 14
<b>Figura IV</b>	Comportamento biomecânico dos ligamentos e tendões ao stress..... 15
<b>Figura V</b>	Visão anterior (A) e lateral (B) dos animais correndo..... 23
<b>Figura VI</b>	Visão lateral (A) e posterior (B) da esteira adaptada especialmente para os ratos..... 24
<b>Figura VII</b>	Binarização de uma imagem do tendão..... 27
<b>Figura VIII</b>	Diferença da densidade celular entre um tendão controle (A) e experimental (B) da quarta semana. HE, objetiva de 10x..... 29
<b>Figura IX</b>	Diferença do percentual de lacunas intersticiais entre um tendão controle (A) e experimental (B) da décima sexta semana. HE, objetiva de 10x..... 30
<b>Figura X</b>	Aumento de colágeno tipo III com o decorrer do protocolo – quarta semana (A), oitava semana (B) e décima sexta semana (C) – detectado pelas áreas esverdeadas. Picrosirius Red sob luz polarizada, objetiva de 10x..... 33
<b>Figura XI</b>	Diferença da deposição de glicosaminoglicanos, evidenciado como áreas densamente azuladas, entre um tendão controle (A) e experimental (B) da décima sexta semana. Alcian Blue, objetiva de 10x..... 34
<b>Figura XII</b>	Expressão das AgNORs no grupo experimental. Em detalhe, a grande quantidade de marcações intranucleares. AgNOR, objetiva de 40x..... 35
<b>Figura XIII</b>	Expressão das AgNORs no grupo controle. Em detalhe, a pequena quantidade de marcações intranucleares. AgNOR, objetiva de 40x..... 35
<b>Figura XIV</b>	Diferença da quantidade de marcação para apoptose entre um tendão controle (A) e experimental (B). TUNEL, objetiva de 40x..... 36
<b>Figura XV</b>	Resposta dos tenócitos à sobrecarga mecânica. Essa resposta biológica poderá ter um caráter adaptativo ou patológico que depende diretamente das características da carga imposta..... 41

## Lista de organogramas

	Página
<b>Organograma I</b> Etiologia multifatorial da tendinose.....	17
<b>Organograma II</b> Representação esquemática do processo das lesões por <i>overuse</i> no tendão.....	18
<b>Organograma III</b> Desenho de estudo do experimento.....	23

## Lista de gráficos

	Página
<b>Gráfico I</b> Evolução da densidade celular no grupo experimental e controle nos três intervalos de tempo.....	30
<b>Gráfico II</b> Evolução do percentual de lacunas intersticiais no grupo experimental e controle nos três intervalos de tempo.....	31
<b>Gráfico III</b> Evolução do percentual de colágeno tipo III no grupo experimental e controle ao decorrer do protocolo.....	31
<b>Gráfico IV</b> Evolução do percentual de colágeno tipo I e tipo III no grupo controle ao decorrer do protocolo.....	32
<b>Gráfico V</b> Evolução do percentual de colágeno tipo I e tipo III no grupo experimental ao decorrer do protocolo.....	32
<b>Gráfico VI</b> Evolução do percentual de glicosaminoglicanos no grupo experimental e controle nos três intervalos de tempo.....	33

## Lista de tabelas

	Página
<b>Tabela I</b> Média $\pm$ erro padrão da densidade celular no grupo controle e experimental.....	29
<b>Tabela II</b> Média $\pm$ erro padrão do percentual de lacunas intersticiais no grupo controle e experimental.....	31
<b>Tabela III</b> Média $\pm$ erro padrão do percentual de colágeno tipo III no grupo controle e experimental.....	32
<b>Tabela IV</b> Média $\pm$ erro padrão do percentual de glicosaminoglicanos no grupo controle e experimental.....	34

## Lista de abreviaturas e siglas:

AgNOR	Região Organizadora de Nucléolo corado pela Prata
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CO <sub>2</sub>	Dioxido de carbono
COX-2	<u>Ciclooxigenase-2</u>
DNA	Do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i> - Ácido desoxirribonucléico
FAPEMIG	Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais
FLAP	Do inglês 5-Lipoxygenase- <u>activating Protein</u>
HE	Hematoxilina-eosina
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
GAG	Glicosaminoglicano
IA	Índice Apoptótico
IGF-1	Fator de crescimento insulínico
IL	Interleucina
IBRAMED	<u>Indústria Brasileira de Equipamentos Médicos</u>
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
MEC	Matriz extra-celular
MMPs	Metaloproteinases de matriz
PG	Prostaglandina
TUNEL	Do inglês <i>Terminal deoxynucleotidyl Transferase Uridine Nick End Labeling</i> - Marcação <i>in situ</i> da fragmentação do genoma com transferase terminal de deoxinucleotídio
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
µm	micrômetros

## **Sumário**

	Página
<b>Introdução</b>	
Fisiologia do tendão.....	13
Tendinose.....	16
Modelos de indução a tendinose.....	19
<b>Objetivos.....</b>	<b>22</b>
<b>Material e métodos</b>	
<b>Distribuição dos grupos.....</b>	<b>23</b>
<b>Análise histológica.....</b>	<b>24</b>
Parâmetros e estratégia morfométrica.....	25
Avaliação histopatológica do tendão através da HE.....	25
Avaliação dos tipos de colágeno através do Picrosirius Red.....	26
Avaliação dos glicosaminoglicanos através do Alcian Blue.....	27
Avaliação da atividade celular através do AgNOR.....	27
Avaliação da apoptose através da reação de TUNEL.....	28
Análise estatística.....	28
<b>Resultados.....</b>	<b>29</b>
<b>Discussão.....</b>	<b>37</b>
<b>Conclusão.....</b>	<b>44</b>
<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>45</b>
<b>Apêndice I (Selecionado entre os melhores pôsteres do I Encontro de Pós-Graduação em Patologia da UFMG).....</b>	<b>55</b>
<b>Apêndice II (Modelos experimentais de indução à tendinose por esforço repetitivo - Revisão de literatura).....</b>	<b>56</b>
<b>Apêndice III (Experimental model of Achilles Tendinosis` induction: A morphometrical study).....</b>	<b>66</b>

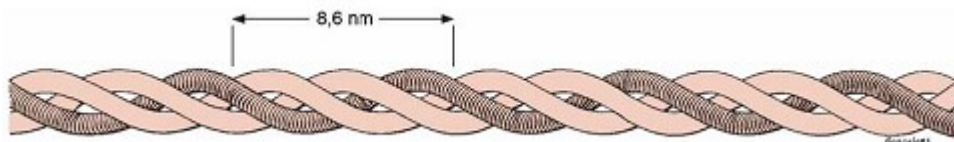


## Introdução

### ***Fisiologia do tendão***

O tendão é um conjunto de fibras colágenas compactas que conectam o músculo ao osso. Possui aproximadamente 70% de água, com boa parte associada aos glicosaminoglicanos da matriz extracelular (Riley *et al.*, 1994). Já o colágeno, seu constituinte básico, representa até 95% do peso seco do tendão, sendo que uma grande proporção se refere ao tipo I e o restante (menos de 10%) ao tipo III (Gross, 1992; Rufai *et al.*, 1995). Além desses constituintes, está presente cerca de 2% de elastina (Eyden & Tzaphlidou, 2001) e pequena quantidade de colágeno tipo IV (Ahtikoski *et al.*, 2003).

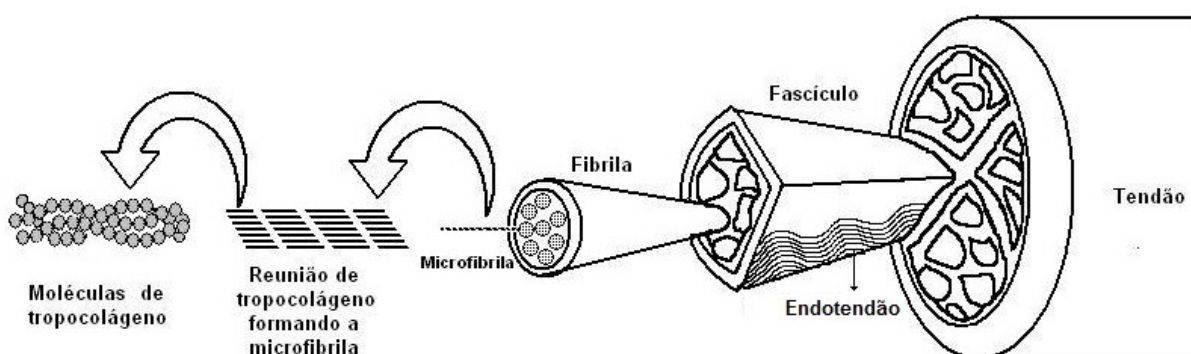
O colágeno é formado pelo tropocolágeno, que por sua vez é formado por três cadeias peptídicas helicoidais e espiraladas (Rich & Crick, 1961) (Figura I). É interessante ressaltar que a molécula de tropocolágeno é cerca de dez vezes mais resistente que o tendão (força de resistência / secção transversa). Isso porque as ligações intra-moleculares formam interações mais fortes do que as interações inter-moleculares (Gustavson, 1956). Dessa maneira, as lesões acontecem principalmente no nível inter-molecular.



**Figura I** – Molécula de tropocolágeno composta por três cadeias peptídicas, sendo duas do tipo  $\alpha 1$  e uma do tipo  $\alpha 2$  (Adaptado de Junqueira & Carneiro, 2004).

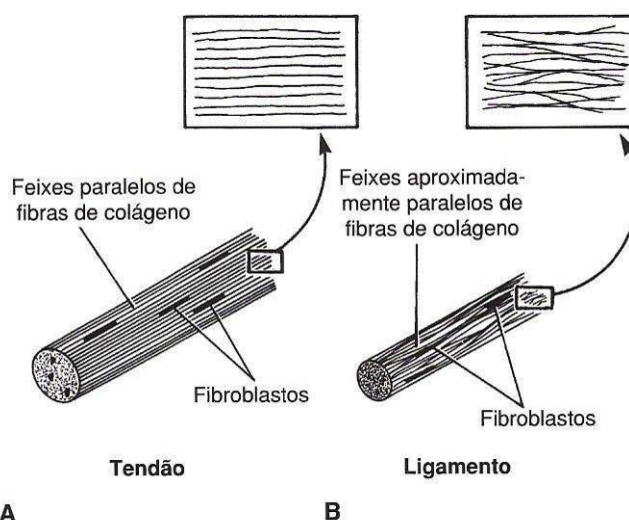
Considerando as ligações inter-moleculares, o colágeno tipo I apresenta interações mais resistentes às tensões com ligações estáveis e não-redutíveis que não se organizam dinamicamente. Por outro lado, o colágeno tipo III apresenta interações menos resistentes às tensões com poucas ligações estáveis e redutíveis que têm a capacidade de se organizar dinamicamente (Viidik *et al.*, 1982). O colágeno tipo IV não contribui para as características mecânicas do tendão.

As moléculas de tropocolágeno se agrupam em feixes primários para formar as microfibrilas e fibrilas (**Figura II**). Os grupos de feixes primários unem-se para formar os fascículos, ou feixes secundários, essas são as menores unidades funcionais do tendão (**Khan et al., 1999**). Envolvendo os fascículos, encontra-se uma camada de tecido conectivo, denominada endotendão. Essa camada contém estruturas nervosas, vasculares e linfáticas. Agrupando os endotendões e envolvendo o tendão propriamente dito se encontra o epitendão e mais externamente o paratendão, que é a camada mais vascularizada. Este último pode se tornar uma camada dupla preenchida por líquido sinovial (bursa) em tendões sujeitos a fricção.



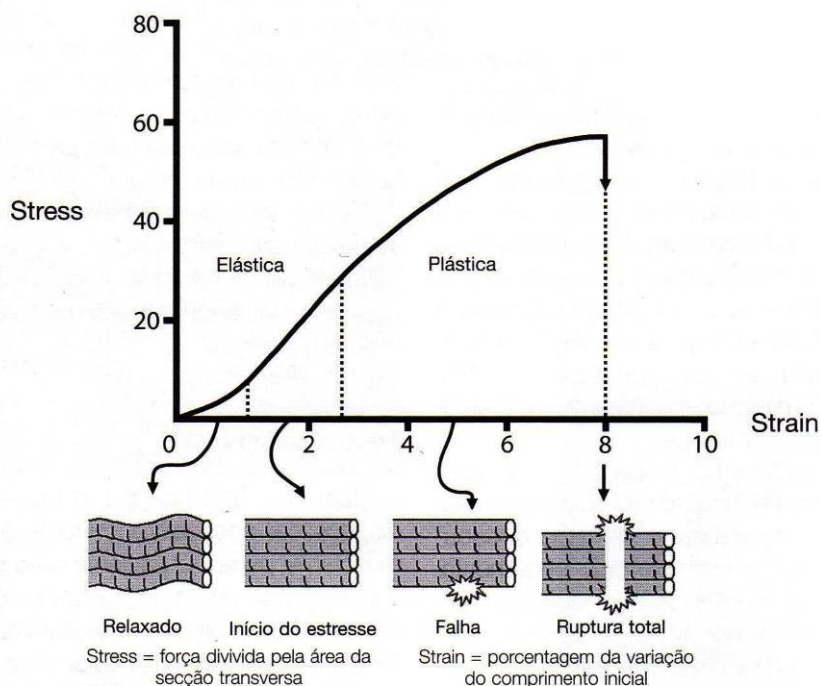
**Figura II** – Organização das fibras de colágeno no tendão (Adaptado de **Silva & Castro, 2006**)

O arranjo em paralelo dessas fibras de colágeno é adaptado para a função do tendão que controla cargas tensionais unidirecionais. De maneira distinta, os ligamentos possuem um arranjo entrelaçado, pois podem controlar cargas tensionais em várias direções (**Figura III**) (**Snell, 1984**).



**Figura III** – Arranjo das fibras de colágeno nos tendões (A) e nos ligamentos (B) (Adaptado de **Snell, 1984**).

A baixa proporção de elastina é responsável pela baixa elasticidade do tendão, sendo que seu comprimento aumenta em apenas 8% a 10% antes de atingir o ponto de ruptura total (**Figura IV**) (**Butler et al., 1978**). Isso é importante para função do tendão, pois se ele fosse mais elástico, poderia alongar-se com a contração muscular, em vez de transmitir força ao osso.



**Figura IV** – Comportamento biomecânico dos ligamentos e tendões ao stress (Adaptado de **Butler et al., 1978**)

A presença de água e glicosaminoglicanos contribui para manter o espaçamento entre as fibras de colágeno, facilitando o deslizamento entre elas. E juntamente com as fibras de colágeno e elastina conferem ao tendão sua propriedade viscoelástica, na qual o tecido retorna ao seu tamanho original depois de algum tempo, após ser submetido a certo nível de força de deformação (**Taylor et al., 1990**).

Alguns tendões apresentam zonas de hipovascularização (**Carr, 1989**), embora todos sejam nutridos suficientemente para promover o processo reparativo. Entretanto, este processo é lento devido à baixa taxa metabólica. Dessa forma, se o tendão não tiver um tempo adequado de recuperação capaz de equilibrar o processo de síntese e degradação das fibras de colágeno, ele estará então sujeito a lesões (**Riley, 2004**).

## **Tendinose**

Atualmente, há uma tendência de diagnosticar clinicamente todas as lesões no tendão como tendinopatia, reservando os termos tendinite, tendinose e/ou paratendinite apenas para análises histopatológicas (**Maffulli et al., 1998**). No entanto, é certo que as lesões agudas que apresentam infiltrado inflamatório reativo se comportam de maneira distinta das lesões crônicas degenerativas, tanto na gênese da doença, quanto na propedêutica. Portanto, critérios clínicos mais precisos são necessários para que não ocorram procedimentos terapêuticos incorretos.

A tendinose é generalizadamente caracterizada por degeneração intratendínea e desorganização das fibras de colágeno. Macroscopicamente, se apresenta como uma degeneração mucóide, com o tecido friável, desorganizado e de cor acastanhada. Microscopicamente, confirma-se que esta estrutura apresenta desorganização e microruptura das fibras de colágeno, hiper celularidade com arredondamento dos núcleos (**Khan et al., 1998; Soslowsky et al., 2000; Cook et al., 2001; Kader et al., 2002; Maffulli & Kader, 2002; Soslowsky et al., 2002; Maffulli et al., 2003; Cook et al., 2004; Nakama et al., 2005; Glazebrook et al., 2007**), aumento significativo de colágeno tipo III em relação a quantidade de colágeno tipo I (**Maffulli et al., 2000; Ireland et al., 2001; Jones et al., 2006**), aumento da quantidade de glicosaminoglicanos (**Riley et al., 1994; Potter et al., 1995; Fu et al., 2007; Scott et al., 2007**), neovascularização (**Kalebo et al., 1990; Kahn et al., 1999; Szomor et al., 2006**) e apoptose (**Yuan et al., 2002; Yuan et al., 2003; Tuoheti et al., 2005; Lian et al., 2007**). Outras características patológicas comumente presentes são as adiposes, fibrocartilaginoses e metaplasias ósseas (**Kannus & Jozsa, 1991; Riley et al., 1996**). Além dessas alterações morfológicas, pode-se observar um aumento da produção de glutamato (**Alfredson et al., 1999; Alfredson et al., 2001**) e uma maior expressão de IGF-1 (**Olesen et al., 2006; Scott et al., 2007**) e óxido nítrico (**Szomor et al., 2006**).

Os altos níveis do neurotransmissor excitatório glutamato estão relacionados com a sensação dolorosa (**Alfredson et al., 2001**). A maior expressão de IGF-1 é considerada responsável por estimular a síntese de colágeno, a proliferação celular e o acúmulo de glicosaminoglicanos em resposta às cargas, no entanto não se sabe se essa é uma resposta adaptativa ou patológica (**Olesen et al., 2006**). Já o papel do óxido nítrico não está completamente claro. Tem se associado altos níveis dessa

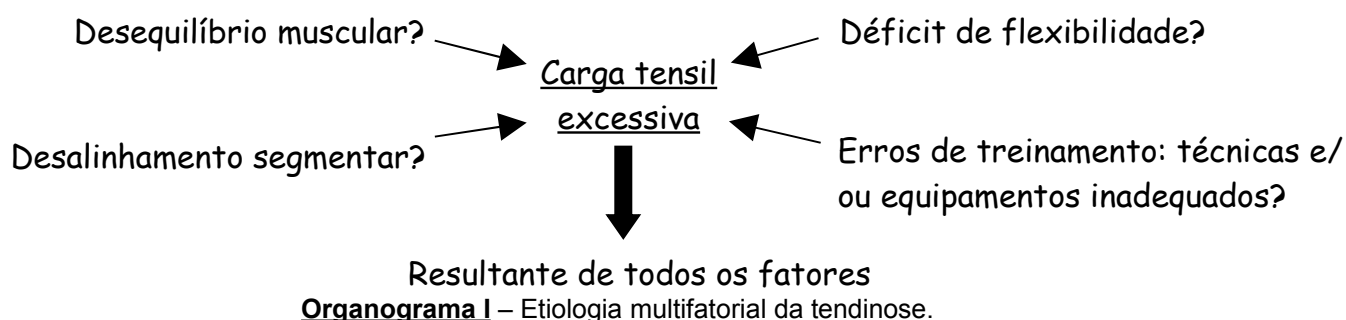
molécula a processos degradativos, mas também tem se demonstrado repostas cicatriciais. Provavelmente o óxido nítrico tem um papel duplo que é determinado pela sua concentração (**Szomor et al., 2006**).

Clinicamente, a tendinose se apresenta sensível à palpação com dor nos movimentos resistidos e incapacidade nas atividades relacionadas (**Glazebrook et al., 2007**), além de alterações nos exames de imagem específicos (**Warden, 2007**), tais como Ultra-Som e Ressonância Nuclear Magnética. Como a doença, em seu estágio inicial, é assintomática (**Lake et al., 2008**), ela pode evoluir silenciosamente e levar o tendão a uma ruptura parcial ou total.

É importante ressaltar que não se confirma a presença de células inflamatórias em amostras colhidas tanto em humanos (**Kalebo et al., 1990; Kahn et al., 1998**) quanto em modelos experimentais (**Glazebrook et al., 2007; Scott et al., 2007; Archambault et al., 2007**). Apesar de alguns genes pró-inflamatórios, tais como FLAP e COX-2 apresentarem expressão aumentada em estágio inicial da indução em um modelo experimental (**Perry et al., 2005**), eles retornaram aos níveis fisiológicos nos estágios mais avançados.

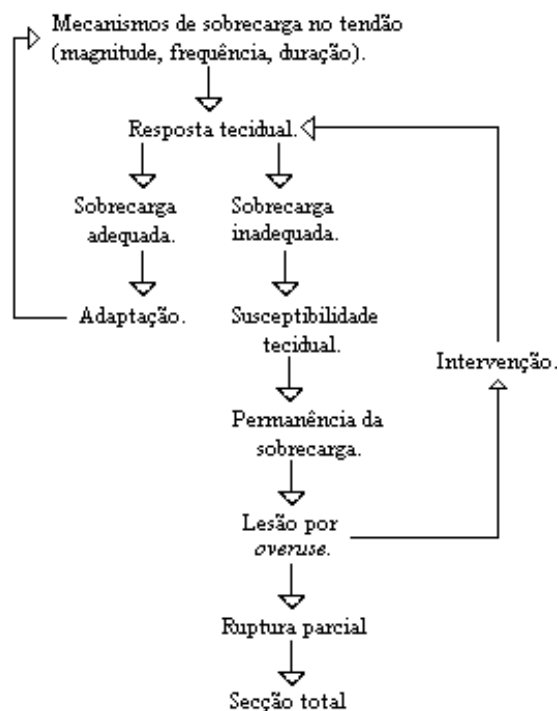
De acordo com essas considerações, pode-se dizer que as tendinoses são condições predominantemente degenerativas e não inflamatórias. Segundo **Khan et al. (2000)**, se repetitivos mecanismos de sobrecarga podem causar microrupturas e desgaste nas fibras tendinosas dando origem a degenerações locais com ausência de células inflamatórias, então essa patologia pode ser denominada como uma tendinose.

As lesões no tendão foram a causa de mais de dois milhões de consultas nos Estados Unidos em 2001 (**Li et al., 2007**). Sendo que a tendinose representa aproximadamente a metade de todas as patologias relacionadas ao trabalho nesse país (**Nakama et al., 2006**). No entanto, a etiologia dessa doença ainda não é muito clara, sendo na maioria das vezes o resultado final de vários processos – multifatorial (**Organograma I**) (**Silva & Campos, 2006**).



Os fatores constituintes da lesão podem ser intrínsecos e/ou extrínsecos. Os fatores intrínsecos estão relacionados com a função exercida, idade, força muscular, flexibilidade, irrigação peculiar, atrito e compressões contra estruturas adjacentes e com o trajeto anatômico e suas alterações. Por exemplo, 50% dos casos de tendinose patelar proximal estão significativamente associadas com o movimento patelar anormal (**Allen et al., 1999**). Já os fatores extrínsecos estão relacionados às doenças sistêmicas, tabagismo, erros no treinamento, influência hormonal, utilização de antibióticos e principalmente às atividades por esforços repetitivos (*overuse*).

*Overuse* é um processo de esforços repetitivos que pode ocasionar lesões microtraumáticas no tendão. Quando essas lesões superam a habilidade das células tendinosas de regenerar o tecido, há um desequilíbrio na taxa de renovação (*turnover*) do colágeno, com conseqüente degeneração da matriz tecidual (**Jarvinen et al., 1997**). De acordo com **Kannus (1997)**, o principal fator causal da tendinose são as lesões por *overuse*, sendo que 30% a 50% de todas as lesões no esporte apresentam essa etiologia (**Sandmeir & Renstrom, 1997**), com uma prevalência de 14% da tendinose em atletas de elite (**Lian et al., 2007**). Em 1995, **Archambault et al.** propuseram uma representação esquemática da possível interação entre o tendão e o processo das lesões por *overuse*:



**Organograma II:** Representação esquemática do processo das lesões por *overuse* no tendão (adaptado de **Archambault et al., 1995**).

Tendo em vista essa alta incidência e considerando que o tratamento conservador pode durar até seis meses (**Khan et al., 1999**), há a necessidade de um embasamento mais consistente sobre a patofisiologia da tendinose (**Maganaris et al., 2004; Scott et al., 2007**). Para isso os modelos de indução em animais devem ser padronizados e sistematizados, no que diz respeito a sua eficácia.

### ***Modelos de indução à tendinose***

Os modelos experimentais são frequentemente utilizados e têm grande valor dentro do cenário científico, pois permitem análises nos níveis orgânicos, teciduais, celulares e moleculares das doenças (**Lake et al., 2008**). Além disso, o sucesso de todo tratamento físico e/ou farmacológico depende direta ou indiretamente das pesquisas realizadas com animais.

Não existe nenhum animal que possui as mesmas características dos humanos, ou seja, não há nenhuma espécie “padrão ouro” (**Warden, 2007**). Entretanto, os ratos têm sido bem utilizados em alguns modelos, apresentando resultados favoráveis (**Carpenter et al., 1998; Soslowsky et al., 2000; Soslowsky et al., 2002; Glazebrook et al., 2007**). Além disso, eles são mais fáceis de manusear em uma cirurgia ou na extirpação de um tecido e são menos agressivos que os camundongos.

O sucesso de um modelo experimental depende diretamente da reprodução de resultados consistentes com as condições humanas (**Warden, 2007**). Nesse sentido, os modelos químicos de tendinose que utilizaram colagenase, citocinas, carreginina ou prostaglandinas apresentaram resultados consistentes com a tendinite. No entanto, não tiveram sucesso como modelo para tendinose.

Por outro lado, os modelos que submeteram os animais a sobrecargas repetidas no tendão por longos períodos apresentaram resultados mais característicos da tendinose. Entre esses, alguns utilizaram contração induzida por eletro-estimuladores (**Backman et al., 1990; Messner et al., 1999; Archambault et al., 2001; Nakama et al., 2005**) enquanto outros realizaram contração muscular ativa para a sobrecarga imposta (**Sommer, 1987; Carpenter et al., 1998; Soslowsky et al., 2000; Soslowsky et al., 2002; Huang et al., 2004**). Apesar dos modelos que utilizaram contração induzida por eletro-estimulação serem mais padronizados em relação ao número de contrações e à carga imposta ao tendão,

eles apresentaram pouca similaridade à evolução da tendinose em humanos, uma vez que os animais estão sob anestesia e todo o metabolismo se encontra alterado. Além disso, nesses modelos os animais estão livres das forças de reação impostas pelo solo, que é um importante fator biomecânico capaz de contribuir para a indução das lesões por esforço repetitivo. Já os modelos de tendinose que utilizaram indução ativa através de esforços repetitivos demonstraram ser mais fisiológicos, seguros e práticos, remetendo com mais fidedignidade ao que realmente acontece no desenvolvimento clínico da doença, sem nenhum sofrimento aparente aos animais **(Silva et al., 2008)**.

**Soslowsky et al. (2000)** propuseram um modelo para indução à tendinose do supra-espinhoso em trinta e seis ratos machos Sprague-Dawley com peso médio de 521 gramas. O protocolo consistia em corrida em uma esteira adaptada para ratos com declínio de 10° numa velocidade de 17m/min (0,28 m/s ou 1 km/h), por 16 semanas, 5 vezes semanais, 1 hora por dia. Este protocolo foi aplicado após 2 semanas de treino em velocidade e tempo menores para adaptação dos ratos à corrida e à esteira. As análises foram realizadas na quarta, oitava e décima sexta semana com um  $n=12$  para todos esses grupos e  $n=10$  para o grupo controle. De acordo com esse trabalho, alterações histopatológicas e biomecânicas foram encontradas já na quarta semana. As alterações histopatológicas consistiram em um aumento da matriz celular e uma perda na organização longitudinal das fibras de colágeno. Apesar dessas alterações terem sido discretas, elas são compatíveis com os achados em tendinoses humanas. Além disso, um aumento contínuo da área de secção transversa ( $p<0,01$ ) dos tendões foi observado. As alterações biomecânicas consistiram em dano à elasticidade e diminuição da carga suportada até o ponto de ruptura ( $p<0,007$ ). Esses resultados sugerem que o exercício por *overuse*, sem alterações intrínsecas ou extrínsecas induzidas, realizado por 16 semanas é um fator etiológico para o desenvolvimento da tendinose em supra-espinhoso de ratos.

**Huang et al. (2004)** utilizaram o modelo proposto por **Soslowsky et al. (2000)** para indução da tendinose em tendões de Aquiles de trinta ratos machos Sprague-Dawley. Sendo assim, os mesmos parâmetros metodológicos de indução foram abordados, com a pequena diferença de o primeiro grupo experimental ter sido analisado na segunda semana e não na quarta. No entanto, a intenção de obter os mesmos resultados, em relação às alterações geométricas e das propriedades biomecânicas, foi falha, pois nenhuma das alterações observadas foi significativa.



Uma possível limitação do modelo foi a utilização do declínio de 10° para priorizar a contração excêntrica do tríceps sural. De certa forma, essa relação é apropriada quando se diz respeito à indução da tendinose do supra-espinhoso, como foi visto por **Soslowsky et al. (2000)**. Entretanto, essa relação parece não ter implicação nos tendões de Aquiles. Ou seja, para diferentes tendões, protocolos distintos de indução devem ser utilizados com mudanças na frequência, intensidade e/ou duração da exposição ao exercício desencadeante.

Dessa maneira, o objetivo desse trabalho foi avaliar microscópica e morfometricamente os diversos eventos envolvidos na patogenia e evolução da tendinose de Aquiles utilizando um modelo de indução por contração ativa à sobrecarga imposta em ratos machos adultos.

## **Objetivos**

### **Geral**

- I. O objetivo desse trabalho foi descrever, analisar e sistematizar os eventos patológicos envolvidos na gênese e evolução da tendinose de Aquiles utilizando um modelo para indução por *overuse* em ratos machos Wistar.

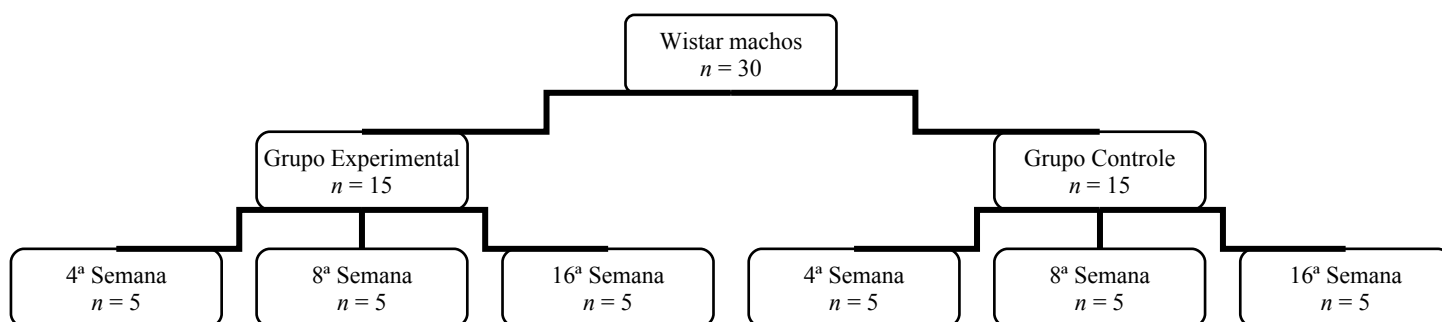
### **Específicos**

- II. Adaptar o modelo de indução à tendinose proposto **Soslowsky *et al.* (2000)** ao tendão de Aquiles.
- III. Analisar microscópica e morfometricamente a evolução da tendinose de Aquiles em ratos machos Wistar, relacionando a cascata de alterações com a patogenia.
- IV. Avaliar a celularidade, bem como a ativação e a apoptose celular na tendinose de Aquiles de ratos machos Wistar.
- V. Quantificar a composição da matriz extracelular, no que se refere ao processo de colagenização, o percentual de micro-rupturas e a quantidade de glicosaminoglicanos na tendinose de Aquiles de ratos machos Wistar.

## **Material e métodos**

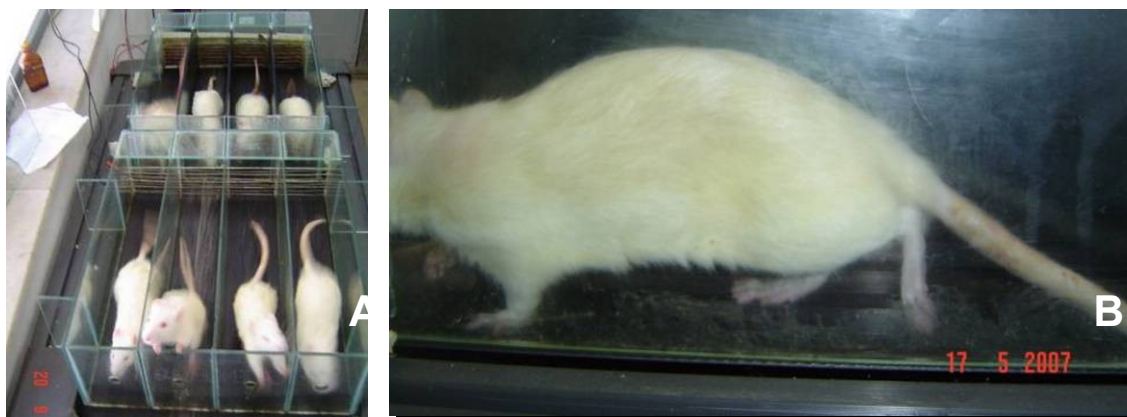
### **Distribuição dos grupos**

Para viabilização dessa pesquisa foram necessários trinta ratos machos Wistar, com 12 semanas de idade e peso inicial padronizado entre 220 e 240 gramas, para que não houvesse sobrecarga adicional em nenhum animal. Primeiramente, os trinta ratos foram divididos aleatoriamente em Grupo experimental ( $n=15$ ) e Grupo controle ( $n=15$ ). Posteriormente, cada grupo foi dividido nos seguintes intervalos de tempo: quatro, oito e dezesseis semanas. Sendo que em cada intervalo, cinco animais do grupo experimental e cinco do grupo controle serão analisados (**Organograma III**).



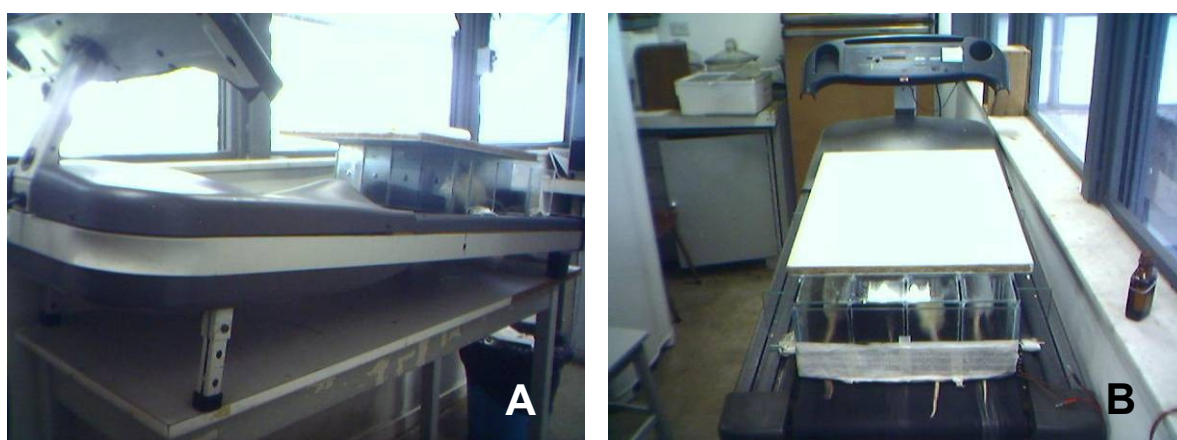
**Organograma III:** Desenho de estudo do experimento.

O grupo experimental realizou o protocolo de **Soslowsky et al. (2000)** adaptado para tendão de Aquiles. Portanto, a sobrecarga imposta consistiu em corrida por quatro, oito e dezesseis semanas, cinco vezes por semana, durante 80 minutos diários, com velocidade de 26,8 m/min, sendo os primeiros 10 minutos em velocidade progressiva e os últimos 10 em regressiva. A progressão da velocidade no início determinou o aquecimento para a prática do exercício e a regressão no final determinou a diminuição do metabolismo de maneira gradual (**Figura V**).



**Figura V** – Visão anterior (A) e lateral (B) dos animais correndo.

Os ratos correram em uma esteira (WESLO - Cadence 840) especialmente adaptada, com capacidade para até oito animais. Eles permaneciam em um compartimento de vidro com separação individual, na qual tinha material metálico em sua parte posterior. A esse material foi acoplado um eletro-estimulador (IBRAMED - Neurodyn), que utilizado em baixa intensidade, foi responsável por impedir que o animal parasse de correr. Além disso, a esteira também foi posicionada com uma inclinação de 10° (**Figura VI**). O protocolo foi aplicado posteriormente a um treinamento de duas semanas nas mesmas condições, exceto a velocidade que foi de 13,4 m/min.



**Figura VI** – Visão lateral (A) e posterior (B) da esteira adaptada especialmente para os ratos.

O grupo controle realizou atividades cotidianas, tais como, andar, alimentar e dormir. É importante ressaltar que em suas gaiolas não houve dispositivo que pudesse submeter os animais à atividade física.

Todos os grupos tiveram livre acesso a água e comida.

### **Análise histológica**

Os animais foram submetidos à eutanásia através da inalação por CO<sub>2</sub> para que os tendões de Aquiles direito e esquerdo fossem extirpados. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG e o número do parecer é 189/06.

Após a confirmação da eutanásia, por verificação dos dados vitais, todo o tríceps sural foi dissecado e a extirpação se deu ao nível da inserção no calcâneo e da junção miotendínea. Após essa etapa, os tendões foram fixados em formol

tamponado neutro a 10% por 48 a 72 horas e processados manualmente da seguinte maneira:

- álcool 70%
  - álcool 80%
  - álcool 90%
  - álcool absoluto I
  - álcool absoluto II
- } 1 hora cada
- xilol
  - parafina (banho)
- } 30 minutos cada
- inclusão em parafina

O tendão foi posicionado longitudinalmente no processo de inclusão em parafina. Em seguida, foram obtidas várias secções de 5µm de cada tendão incluído em parafina para coloração. Foram realizadas as colorações de Hematoxilina-Eosina (HE), Picrosirius Red, Alcian Blue, AgNOR e a reação de TUNEL.

#### **Parâmetros e estratégia morfométrica**

Após a coloração, as imagens de cada lâmina foram captadas por uma câmera digital (Sony DSC-W7 / 7.2 Mega Pixels) no microscópio de luz Olympus BX41 com objetivas planacromática de 10 e 40x. Em seguida, as imagens foram transferidas para o computador para realizar a morfometria. Para cada alteração ocorrida nas várias colorações estudadas foi realizada uma abordagem morfométrica diferente, dependendo do objetivo da marcação. Para a quantificação densitométrica das áreas utilizou-se o programa Kontron KS300 versão 2.0 (Kontron Elektronik Carl Zeiss). Para a quantificação das células utilizou-se o programa Media Cybernetics Image Pro-Plus (Media Cybernetics - Version 4.5029).

#### **Avaliação histopatológica do tendão através da HE**

Para a quantificação das alterações histopatológicas do tendão foi realizado a coloração de HE. Essa avaliação teve como objetivo identificar os achados característicos das tendinoses de humanos, tais como, hiper celularidade e micro-rupturas (**Schepsis et al., 2002**). Desta maneira, foi obtida uma imagem digitalizada de um campo histológico em microscópio de luz com objetiva planacromática de 10x da região central do eixo longitudinal do tendão para realizar a quantificação densitométrica da celularidade e das micro-rupturas. O mesmo critério foi usado

para ambos os grupos, controle e experimental, excluindo as imagens da êntese e da junção miotendínea.

Para quantificar a celularidade foi elaborado o seguinte índice celular (IC):

$$IC = (\sum \text{de tenócitos} / \text{área relativa do tendão}) \times 100$$

Para quantificar o percentual de micro-rupturas dividiu-se a área de lacunas intertissuais entre as fibras de colágeno pela área ocupada pelo tendão, de acordo com a seguinte fórmula:

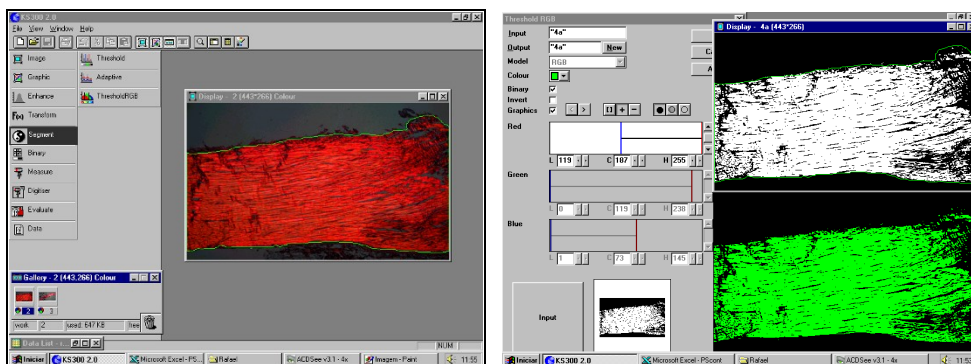
$$\% \text{ micro-rupturas} = (\sum \text{lacunas intersticiais} / \text{área relativa do tendão}) \times 100$$

### **Avaliação dos tipos de colágeno através do Picrosirius Red**

Para a quantificação dos diferentes tipos de colágeno da matriz extracelular do tendão se utilizou o Picrosirius Red, um composto aniônico que distingue a espessura e densidade das fibras de colágeno pela coloração emitida sob a luz polarizada. Enquanto as fibras finas dissociadas típicas do colágeno tipo III são esverdeadas, as fibras mais grossas fortemente associadas do colágeno tipo I emitem cores com comprimento de ondas maiores, como vermelho e amarelo (**Kesler et al., 2000**).

De cada lâmina corada em Picrosirius Red foi obtida uma imagem digitalizada em microscópio de luz com objetiva planacromática de 10x, utilizando-se de filtros de luz polarizada, da região central do eixo longitudinal do tendão. Após a captura, realizou-se a binarização da imagem real (**Figura VII**) para possibilitar o somatório das regiões ocupadas por fibras que contém "pixels" da mesma densidade. A metodologia empregada para segmentação das imagens, definição das condições morfométricas e obtenção das medidas foram descritas por **Caliari (1997)**. A quantificação das áreas ocupadas pelos diferentes tipos de colágeno se deu da seguinte maneira:

$$\text{Área de colágeno} = (\sum \text{regiões com fibras de mesmo pixel} / \text{área relativa do tendão}) \times 100$$



**Figura VII** – Binarização de uma imagem do tendão.

### **Avaliação dos glicosaminoglicanos através do Alcian Blue**

Para quantificar o percentual de glicosaminoglicanos realizou-se a coloração de Alcian Blue em um pH de 2,5 com contra-coloração nuclear em Vermelho neutro. De cada lâmina corada foi obtida uma imagem digitalizada de um campo histológico em microscópio de luz com objetiva planacromática de 10x da região central do eixo longitudinal do tendão. A quantificação densitométrica se deu através da identificação das regiões ocupadas pelos glicosaminoglicanos, que possuíam “pixels” da mesma densidade. Após subsequente binarização, a área dessas regiões foi somada e dividida pela área ocupada pelo tendão, obtendo o percentual de glicosaminoglicanos de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ de GAGs} = \left( \frac{\sum \text{regiões com mesmo pixel}}{\text{área relativa do tendão}} \right) \times 100$$

### **Avaliação da atividade celular através do AgNOR**

Para quantificar a expressão da ativação celular foi realizado a coloração de AgNOR. O objetivo dessa coloração foi identificar as regiões organizadoras de nucléolos através da impregnação pela prata, pois cada grânulo de AgNOR pode ser considerado como uma unidade ativa de transcrição do DNA (**Ploton et al., 1986**). A quantificação da marcação dessas unidades foi feita a partir de imagens digitalizadas obtidas de amostras dos campos histológicos em microscópio de luz com objetiva planacromática de 40x. Para o índice de ativação celular (IAC) realizou-se a média aritmética das AgNORs de 100 fibroblastos de campos selecionados aleatoriamente dos três intervalos considerados, tanto no grupo experimental, quanto no grupo controle.

$$\text{IAC} = \frac{\sum \text{regiões organizadoras de nucléolo de 100 fibroblastos}}{100}$$

### **Avaliação da apoptose através da reação de TUNEL**

Para quantificar a marcação das células em apoptose foi realizada a reação de TUNEL. Essa reação tem como objetivo detectar *in situ* a fragmentação do genoma na apoptose (**Gavrieli et al., 1992**). A técnica combina princípios histoquímicos e imuno-histoquímicos e é aplicada em corte de tecido embebido em parafina identificando células apoptóticas. Os nucleotídeos marcados inseridos são posteriormente identificados como grumos amarronzados (**Gavrieli et al., 1992**) a partir da reação da diaminobenzidina com a peroxidase. Para tal, foi utilizado o kit da Oncogene (*DNA Fragmentation Detection Kit*).

A quantificação das células apoptóticas levou em consideração a morfologia sugestiva da apoptose (**Vasconcelos, 2001**). Os corpos apoptóticos quando inúmeros e próximos uns dos outros foram quantificados como o resultado de uma única célula em apoptose. Quando distantes entre si, foram considerados como resultado de apoptose em células diferentes e contabilizados como tal.

### **Análise estatística**

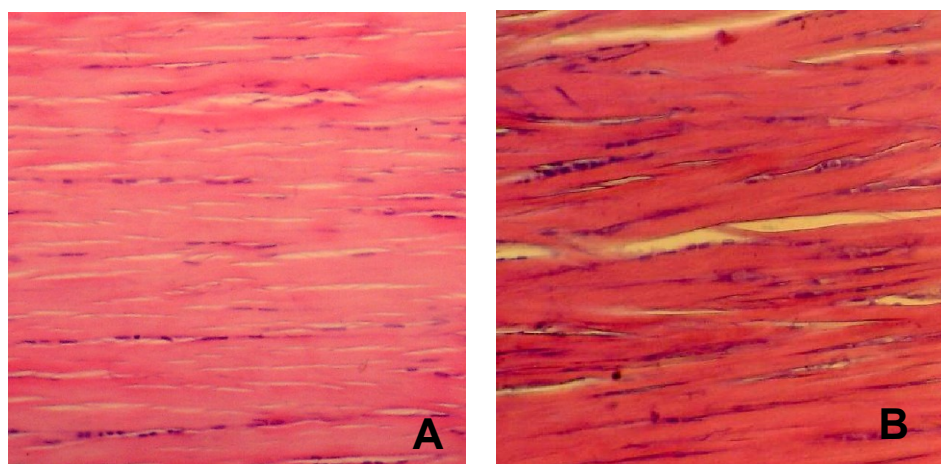
Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão ou mediana, conforme tenham obtido, respectivamente, uma distribuição normal ou não, pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Para os resultados que demonstraram normalidade foi utilizado o teste *t* de Student para comparar dois grupos dentro do mesmo intervalo de tempo e, para comparar os resultados dos três intervalos dentro grupo experimental ou controle, a análise de variância ANOVA com pós-teste de múltipla comparação Newman Keuls. Para os resultados que não demonstraram normalidade, foi utilizado o teste *t* não paramétrico para comparar dois grupos dentro do mesmo intervalo de tempo e, para comparar os resultados dos três intervalos dentro grupo experimental ou controle, o teste de Kruskal Wallis com pós-teste de múltipla comparação de Dunn. Os valores de  $P < 0,05$  foram considerados significativos.



## Resultados

Para as alterações histopatológicas do tendão, duas análises morfométricas, envolvendo celularidade e organização das fibras de colágeno, foram realizadas através da HE. Os resultados de ambas as análises demonstraram distribuição normal.

A densidade celular aumentou nos grupos experimentais (**Figura VIII**) em todos os intervalos de tempo. Essa diferença foi estatisticamente significativa em cada intervalo (**Tabela I**). No entanto, não houve diferença significativa dentro dos grupos experimentais e controles com a evolução do protocolo (**Gráfico I**).



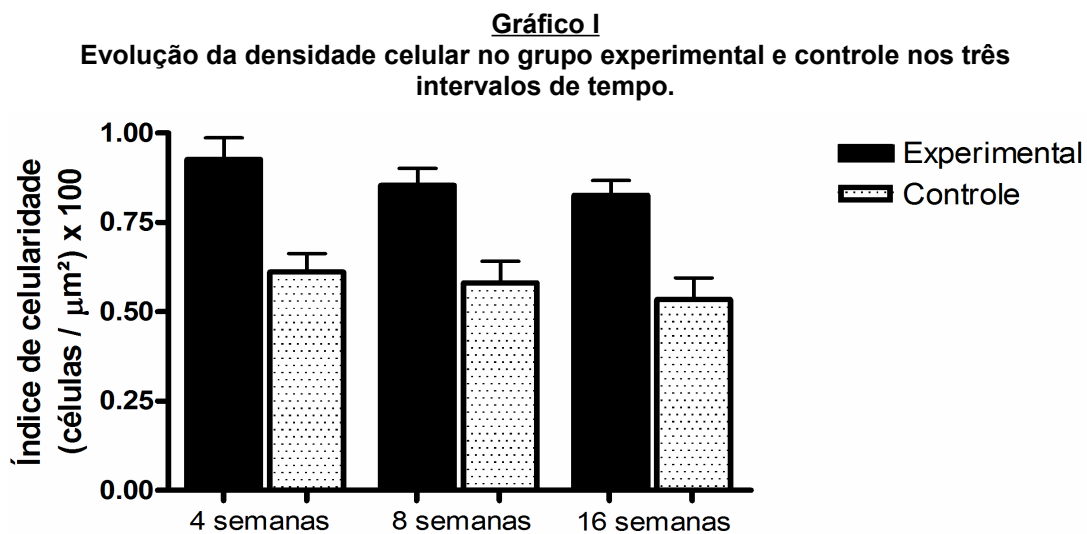
**Figura VIII** – Diferença da densidade celular entre um tendão controle (A) e experimental (B) da quarta semana. HE, objetiva de 10x.

**Tabela I**

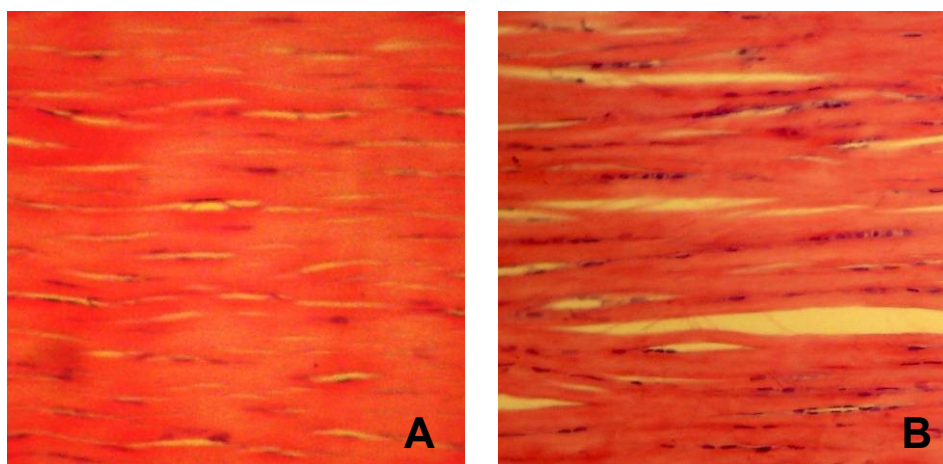
**Média ± erro padrão da densidade celular no grupo controle e experimental.**

	Grupo controle	Grupo experimental	Valor de <i>P</i>
4 semanas	0,61 ± 0,05 (Aa)	0,92 ± 0,06 (Ba)	< 0,01
8 semanas	0,58 ± 0,06 (Aa)	0,85 ± 0,04 (Ba)	< 0,05
16 semanas	0,53 ± 0,06 (Aa)	0,82 ± 0,04 (Ba)	< 0,01

**Nota:** O valor de *P* e as letras maiúsculas correspondem a comparações entre colunas (entre os grupos controle e experimental) e minúsculas entre linhas (entre os três intervalos de tempo).



As lacunas intersticiais aumentaram nos grupos experimentais como constatado pela análise densitométrica das fibras de colágeno (**Figura IX**) em todos os intervalos de tempo. Essa diferença foi estatisticamente significativa em cada intervalo (**Tabela II**). No entanto, não houve diferença significativa dentro dos grupos experimentais e controles com a evolução do protocolo (**Gráfico II**).



**Figura IX** – Diferença do percentual de lacunas intersticiais entre um tendão controle (A) e experimental (B) da décima sexta semana. HE, objetiva de 10x.

**Tabela II**

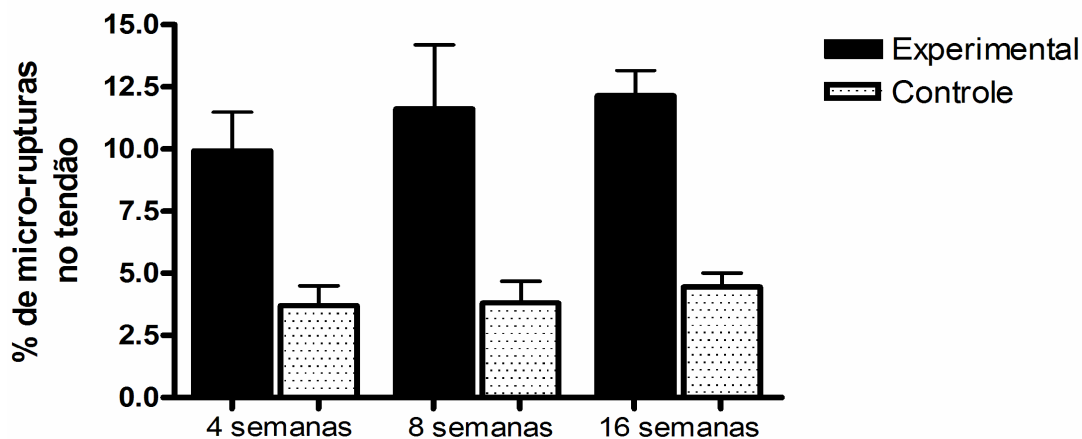
Média ± erro padrão do percentual de lacunas intersticiais no grupo controle e experimental.

	Grupo controle	Grupo experimental	Valor de <i>P</i>
4 semanas	3,7 ± 0,79 (Aa)	9,93 ± 1,55 (Ba)	< 0,01
8 semanas	3,81 ± 0,87 (Aa)	11,6 ± 2,59 (Ba)	< 0,01
16 semanas	4,44 ± 0,56 (Aa)	12,13 ± 1,03 (Ba)	< 0,001

Nota: O valor de *P* e as letras maiúsculas correspondem a comparações entre colunas (entre os grupos controle e experimental) e minúsculas entre linhas (entre os três intervalos de tempo).

**Gráfico II**

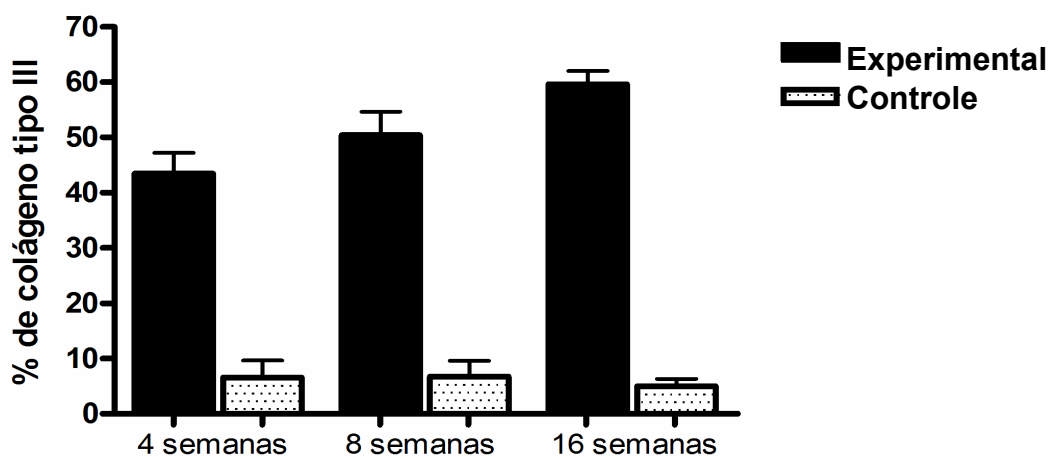
Evolução do percentual de lacunas intersticiais no grupo experimental e controle nos três intervalos de tempo.



O colágeno tipo III aumentou no grupo experimental em relação ao grupo controle em todos os intervalos de tempo (**Gráfico III**). Essa diferença foi estatisticamente significativa em cada intervalo (**Tabela III**).

**Gráfico III**

Evolução do percentual de colágeno tipo III no grupo experimental e controle ao decorrer do protocolo.



**Tabela III**

Média ± erro padrão do percentual de colágeno tipo III no grupo controle e experimental.

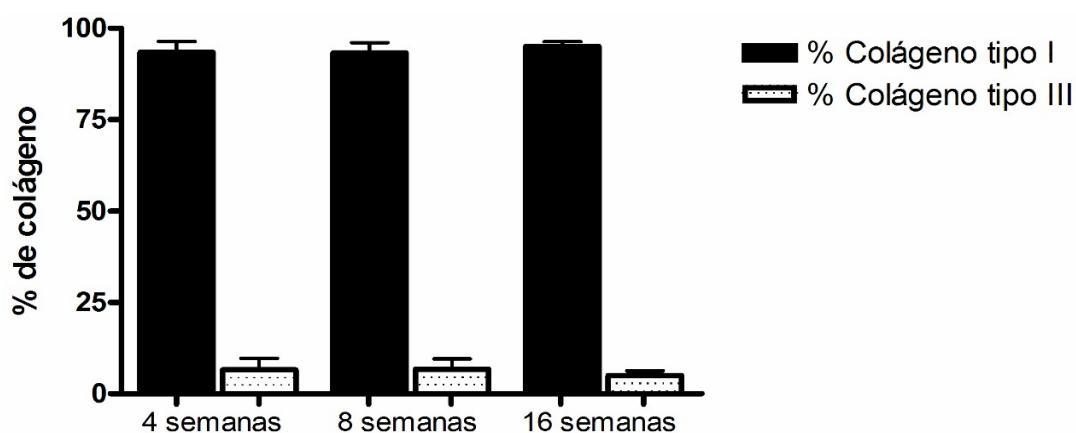
	Grupo controle	Grupo experimental	Valor de <i>P</i>
4 semanas	6,57 ± 3,06 (Aa)	43,4 ± 3,84 (Ba)	< 0,001
8 semanas	6,71 ± 2,84 (Aa)	50,45 ± 4,2 (Bab)	< 0,0001
16 semanas	4,96 ± 1,32 (Aa)	59,6 ± 2,41 (Bb)	< 0,0001

**Nota:** O valor de *P* e as letras maiúsculas correspondem a comparações entre colunas (entre os grupos controle e experimental) e minúsculas entre linhas (entre os três intervalos de tempo).

Ao longo dos três intervalos, não houve diferença no percentual de colágeno tipo III e tipo I no grupo controle (**Gráfico IV**). No entanto, no grupo experimental houve um aumento significativo de colágeno tipo III da quarta para décima sexta semana ( $P < 0,05$ ) (**Gráfico V**). A **Figura X** evidencia claramente o acúmulo de colágeno tipo III, detectado pelas áreas esverdeadas, com o decorrer do protocolo.

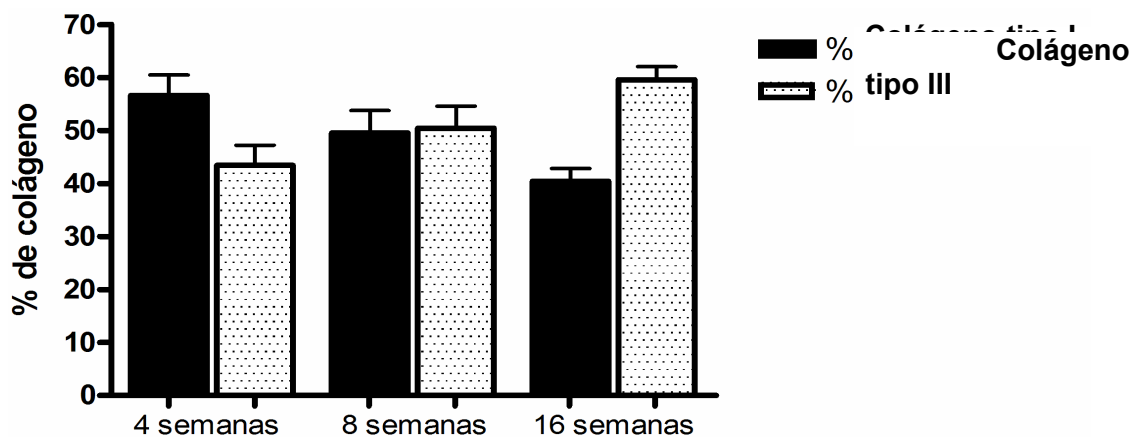
**Gráfico IV**

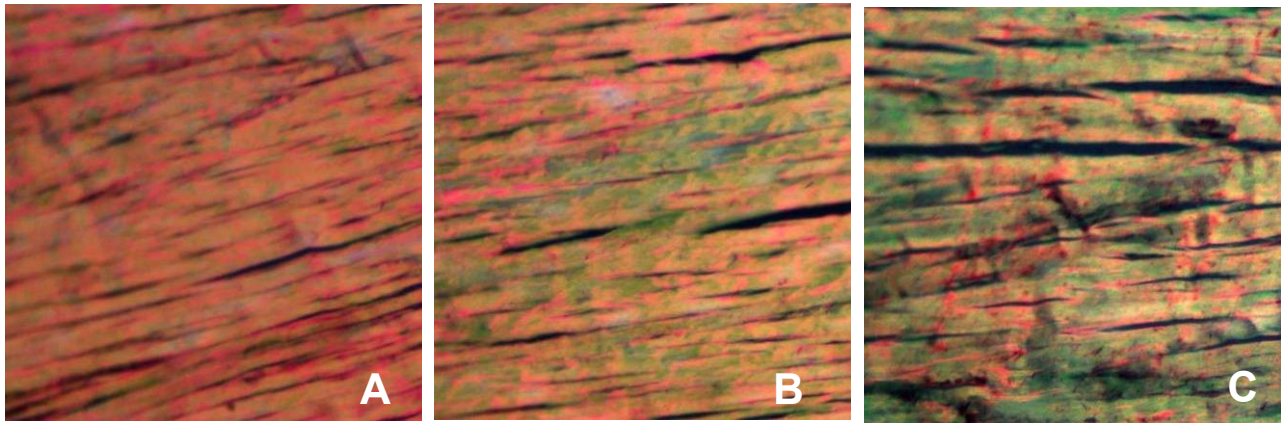
Evolução do percentual de colágeno tipo I e tipo III no grupo controle ao decorrer do protocolo.



**Gráfico V**

Evolução do percentual de colágeno tipo I e tipo III no grupo experimental ao decorrer do protocolo.

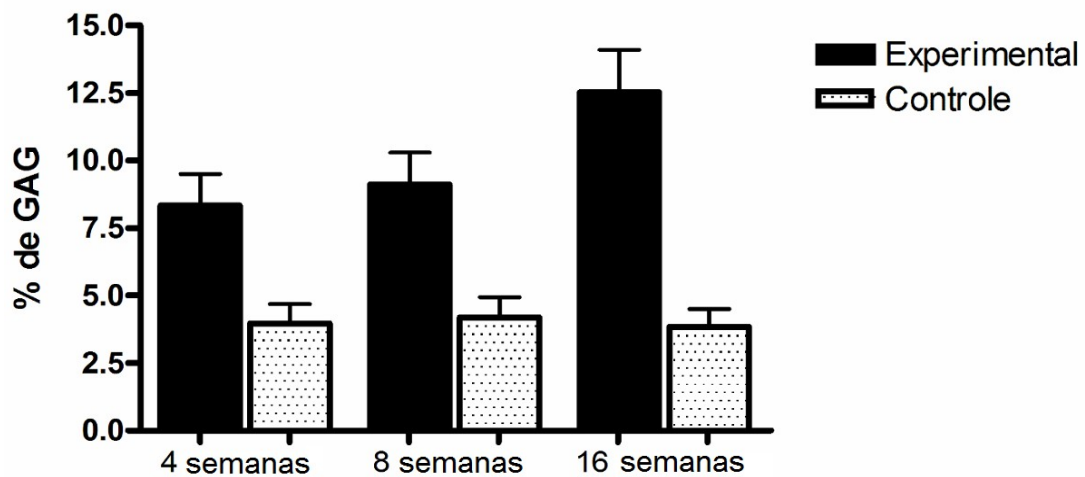




**Figura X** – Aumento de colágeno tipo III com o decorrer do protocolo – quarta semana (A), oitava semana (B) e décima sexta semana (C) – detectado pelas áreas esverdeadas. Picrosirius Red sob luz polarizada, objetiva de 10x.

O percentual de glicosaminoglicanos aumentou significativamente em todos os grupos experimentais (**Gráfico VII**) em relação aos controles em todos os períodos avaliados (**Tabela IV**). Dentro do grupo experimental, os resultados da décima sexta semana também apresentaram diferença estatística em relação aos da quarta e oitava semana ( $P < 0,05$ ).

**Gráfico VI**  
Evolução do percentual de glicosaminoglicanos no grupo experimental e controle nos três intervalos de tempo.





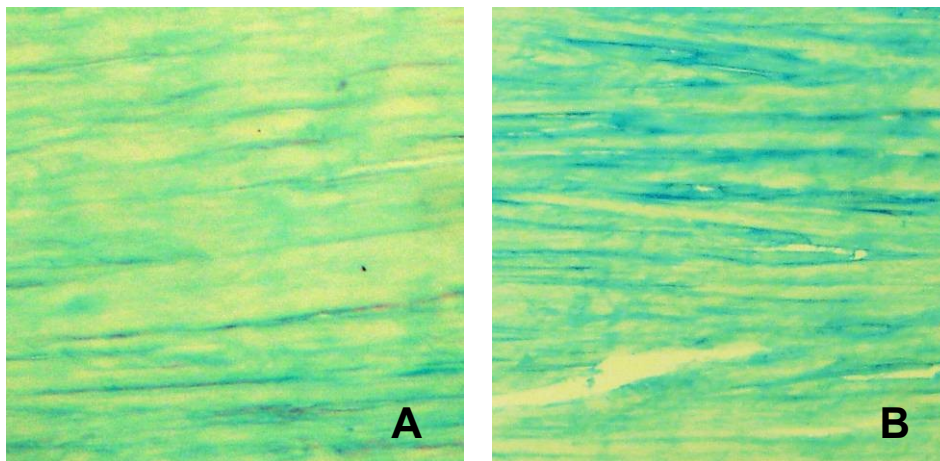
**Tabela IV**

Média  $\pm$  erro padrão do percentual de glicosaminoglicanos no grupo controle e experimental.

	Grupo controle	Grupo experimental	Valor de <i>P</i>
4 semanas	3,97 $\pm$ 0,71 (Aa)	8,33 $\pm$ 1,17 (Ba)	< 0,01
8 semanas	4,19 $\pm$ 0,75 (Aa)	9,12 $\pm$ 1,17 (Ba)	< 0,01
16 semanas	3,84 $\pm$ 0,66 (Aa)	12,53 $\pm$ 1,56 (Bb)	< 0,01

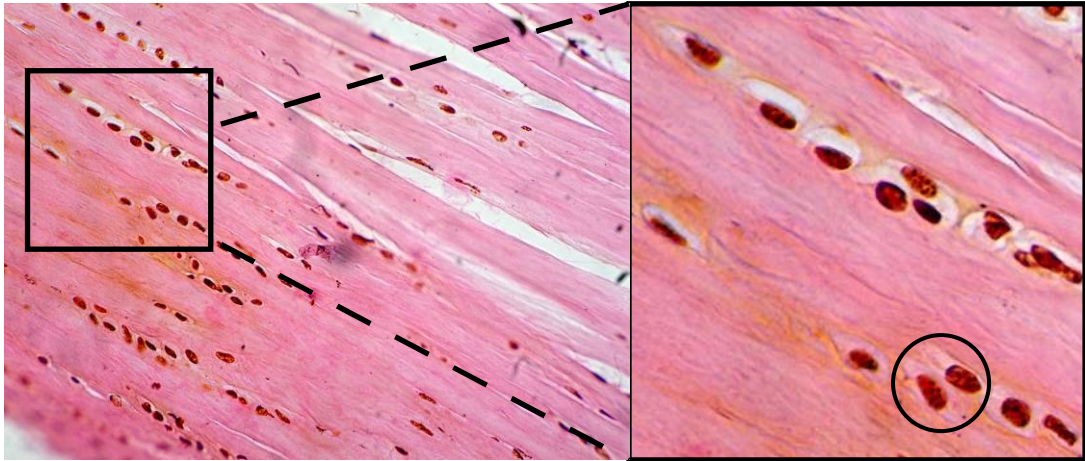
**Nota:** O valor de *P* e as letras maiúsculas correspondem a comparações entre colunas (entre os grupos controle e experimental) e minúsculas entre linhas (entre os três intervalos de tempo).

A **Figura XI** apresenta diferentes densidades de áreas azuladas, evidenciado maior quantidade de glicosaminoglicanos depositados na matriz dos tendões do grupo experimental (B) em relação ao controle (A).

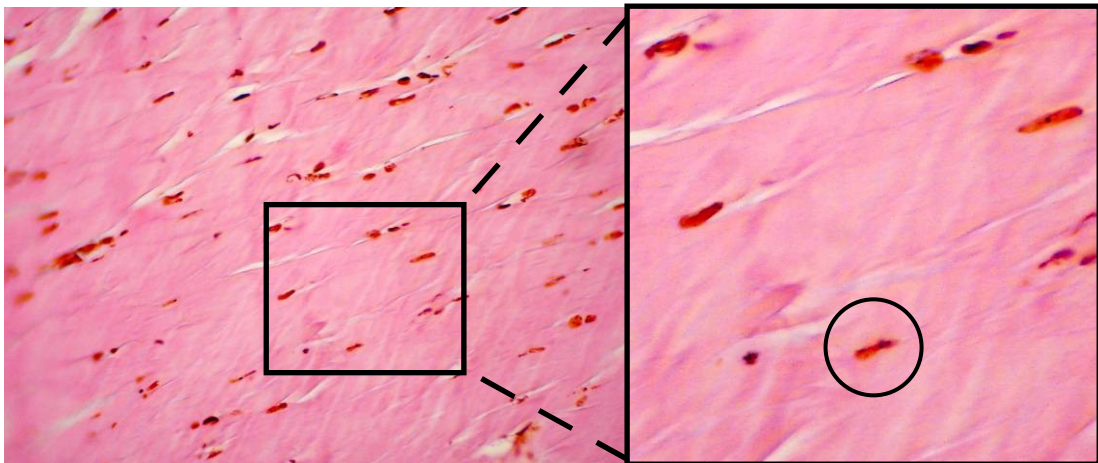


**Figura XI** – Diferença da deposição de glicosaminoglicanos, evidenciado como áreas densamente azuladas, entre um tendão controle (A) e experimental (B) da décima sexta semana. Alcian Blue, objetiva de 10x.

As regiões organizadoras de nucléolos (AgNOR) aumentaram nos fibroblastos do grupo experimental (mediana = 4 grumos/núcleo) em todos os intervalos de tempo em relação ao grupo controle (mediana = 2 grumos/núcleo). A diferença entre os grupos foi considerada estaticamente significativa ( $P < 0,0001$ ), embora não tenha havido diferença entre os períodos do grupo controle e experimental. As **Figuras XII e XIII** demonstram a maior carga de grumos de AgNOR nos núcleos das células do grupo experimental que no controle. Outro fato que chama a atenção é a maior quantidade de células marcadas no grupo experimental, que também se apresentou com maior celularidade.

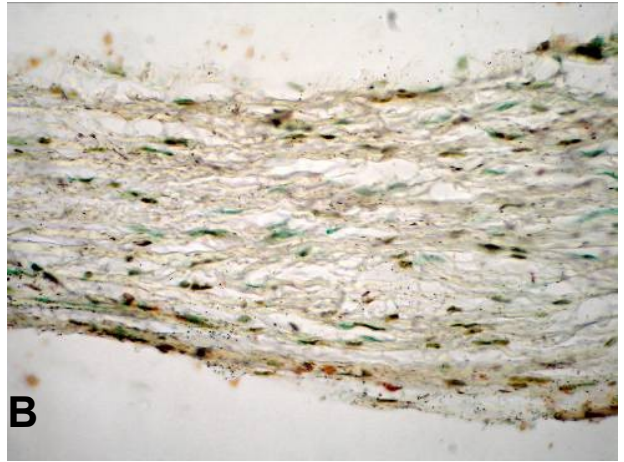
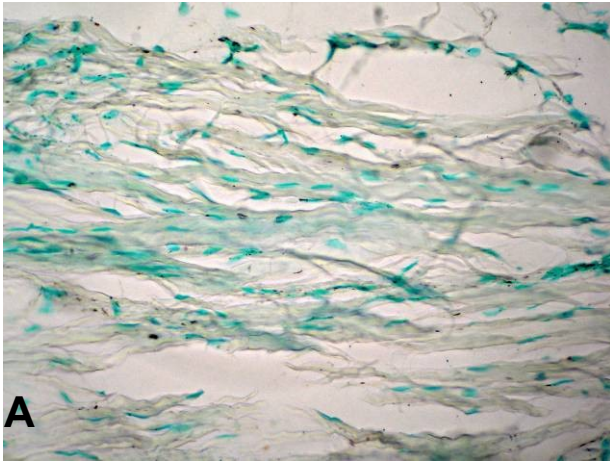


**Figura XII** – Expressão das AgNORs no grupo experimental. Em detalhe, a grande quantidade de marcações intranuclear. AgNOR, objetiva de 40x



**Figura XIII** – Expressão das AgNORs no grupo controle. Em detalhe, a pequena quantidade de marcações intranuclear. AgNOR, objetiva de 40x

A apoptose foi mais intensa no grupo experimental (**Figura XIV**) que no controle. No entanto, durante o protocolo da reação grande parte do material que seria analisado despreendeu-se da lâmina, impossibilitando a contagem da marcação pelo pequeno número de imagens obtidas. Portanto, esse é uma avaliação qualitativa dos resultados.



**Figura XIV** – Diferença da quantidade de marcação para apoptose entre um tendão controle (A) e experimental (B). TUNEL, objetiva de 40x



## **Discussão**

Os resultados obtidos neste trabalho não destoam das características histopatológicas da tendinose encontradas em humanos e em outros modelos similares: aumento da densidade celular e maior quantidade densitométrica das lacunas intersticiais (**Khan et al., 1998; Soslowsky et al., 2000; Cook et al., 2001; Kader et al., 2002; Maffulli & Kader, 2002; Soslowsky et al., 2002; Maffulli et al., 2003; Cook et al., 2004; Nakama et al., 2005; Glazebrook et al., 2007**), aumento da presença de colágeno tipo III em relação à quantidade de colágeno tipo I (**Maffulli et al., 2000; Ireland et al., 2001; Jones et al., 2006**), aumento da quantidade de glicosaminoglicanos (**Riley et al., 1994; Potter et al., 1995; Fu et al., 2007; Scott et al., 2007**), maior atividade celular (**Scott et al., 2007**) e maior número de células em apoptose (**Yuan et al., 2002; Yuan et al., 2003; Tuoheti et al., 2005; Lian et al., 2007**).

Em relação à densidade celular houve um aumento significativo no grupo experimental da quarta ( $P<0,01$ ), oitava ( $P<0,05$ ) e décima sexta ( $P<0,01$ ) semana, quando comparada com o grupo controle. No entanto, não houve diferença entre os intervalos de tempo. Isso demonstra que já inicialmente há um crescimento da densidade celular que não se altera com a contínua exposição ao fator agressivo. O aumento da densidade celular, entretanto, já foi também descrito e discutido por inúmeros autores (**Khan et al., 1998; Soslowsky et al., 2000; Cook et al., 2001; Kader et al., 2002; Maffulli & Kader, 2002; Soslowsky et al., 2002; Maffulli et al., 2003; Cook et al., 2004; Nakama et al., 2005; Glazebrook et al., 2007**).

Em relação às lacunas intersticiais verificou-se um aumento significativo no grupo experimental da quarta ( $P<0,01$ ), oitava ( $P<0,01$ ) e décima sexta ( $P<0,001$ ) semana, sem diferença estatística entre os intervalos de tempo. Pode-se inferir que essas lacunas representam micro-rupturas entre as fibras de colágeno, como já foi elucidado por outros autores (**Khan et al., 1998; Soslowsky et al., 2000; Cook et al., 2001; Kader et al., 2002; Maffulli & Kader, 2002; Soslowsky et al., 2002; Maffulli et al., 2003; Cook et al., 2004; Nakama et al., 2005; Glazebrook et al., 2007**). Portanto, essas micro-rupturas não aumentam significativamente com a permanência da sobrecarga.

Essas micro-rupturas são consequências da fraqueza mecânica do tendão. Tal condição pode ser confirmada pela grande quantidade de colágeno tipo III (menos resistente às tensões) encontrada no grupo experimental da quarta ( $P < 0,001$ ), oitava ( $P < 0,0001$ ) e décima sexta ( $P < 0,0001$ ) semana. Neste último período, já ocorria predominância do colágeno tipo III, alcançando quase 60% da quantidade total de fibras colágenas do tendão e apresentando diferença estatística com o grupo experimental da quarta semana ( $P < 0,05$ ). **Maffulli et al. (2000)** reportaram que culturas de fibroblastos provenientes de tendões de Aquiles rompidos produzem mais colágeno tipo III que tendões fisiológicos. **Ireland et al. (2001)** e **Jones et al. (2006)** também demonstraram uma maior expressão gênica para o colágeno tipo III nas tendinoses. Isso demonstra que o tecido tem uma tendência a reduzir sua força de resistência ao estresse contínuo, ficando cada vez mais propenso a uma ruptura parcial ou total.

Em relação aos glicosaminoglicanos houve um aumento significativo no grupo experimental ( $P < 0,01$ ) em todos os intervalos, quando comparada com o grupo controle. Este aumento foi gradual com o decorrer do protocolo, apresentando diferença estatística entre a quarta e a décima sexta semana ( $P < 0,05$ ) do grupo experimental. A maior produção de glicosaminoglicanos também foi reportada por outros autores (**Riley et al., 1994; Potter et al., 1995; Fu et al., 2007; Scott et al., 2007**) e ela pode ser considerada uma resposta fundamental para contribuir com a manutenção das propriedades viscoelásticas do tendão, já que não apresenta uma função de transmissão de forças (**Screen et al., 2005**).

A marcação da atividade celular através da contagem das regiões organizadoras de nucléolo demonstrou um aumento das unidades ativas de transcrição do DNA no grupo experimental ( $P < 0,0001$ ) em relação ao grupo controle, sem diferença estatística entre os intervalos de tempo. **Scott et al. (2007)** também demonstraram um aumento da atividade celular através da proliferação (mitose) dos tenócitos. Esses resultados vêm a corroborar com os outros achados desse trabalho, já que um tecido que apresenta células contendo o dobro de unidades ativas de transcrição em seu núcleo, quando comparado com seu fisiológico, deverá exibir conseqüentemente maior densidade celular e maior quantidade de matriz extracelular, nesse caso, fibras de colágeno e glicosaminoglicanos.

As células apoptóticas aumentaram no grupo experimental em relação ao grupo controle. No entanto, não foi possível realizar o índice apoptótico, pois poucas

imagens foram obtidas devido ao desprendimento do material da lâmina durante o processo da reação. Estas dificuldades de processamento também foram relatadas por **Glazebrook et al. (2007)** que tiveram problemas com o material durante as reações imuno-histoquímicas. Por outro lado, **Tuoheti et al. (2005)** utilizaram a reação de TUNEL em tendinoses de supra-espinhoso e obtiveram resultados positivos para apoptose. É provável que o tendão do rato não se enquadre em alguns protocolos de imuno-histoquímica, pois o tecido é sensível. Isso implica a necessidade de aperfeiçoar as técnicas para o correto procedimento.

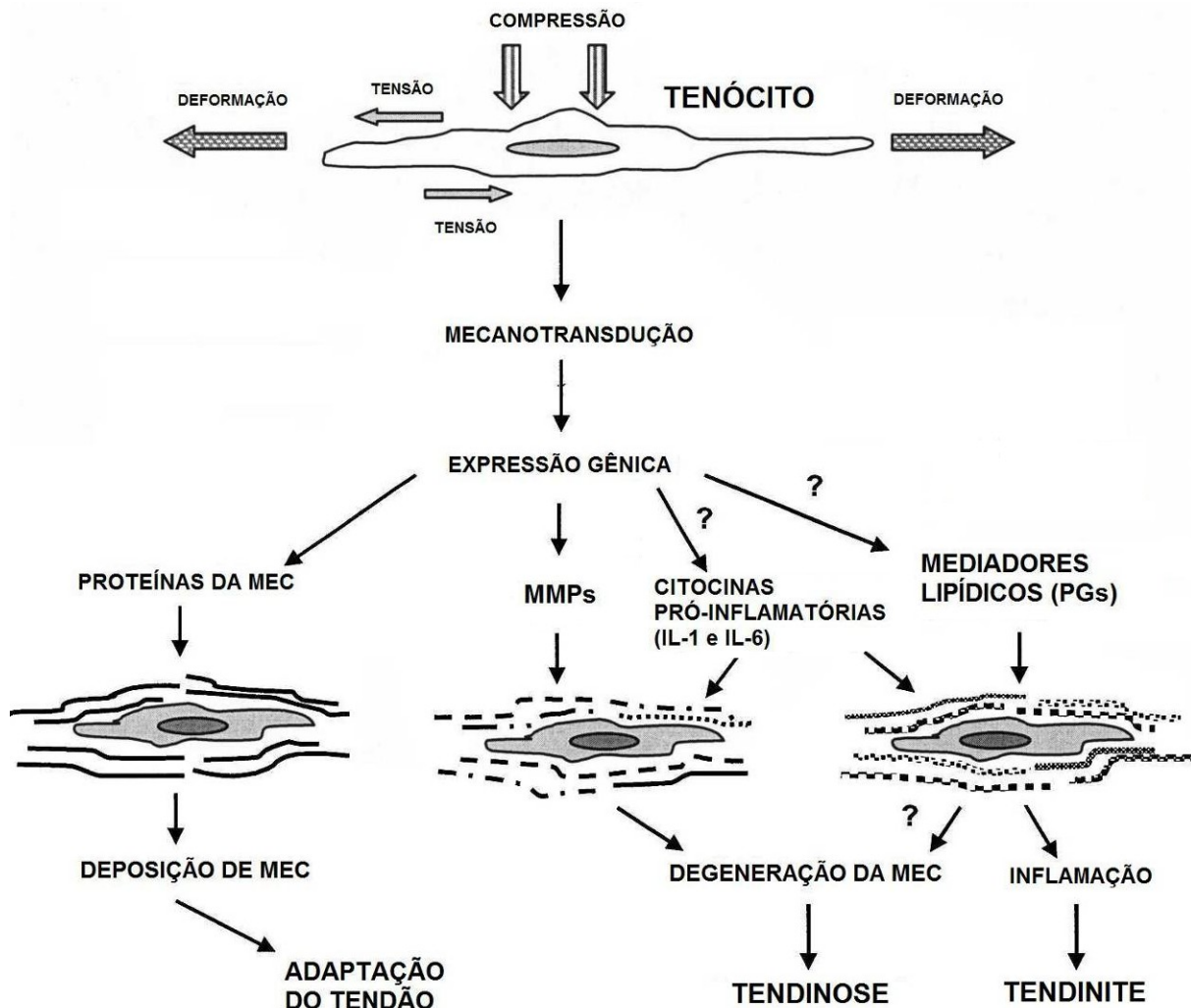
Vale à pena ressaltar que os tendões dos grupos controles apresentaram características histológicas similares aos padrões fisiológicos descrito por **Gross, (1992); Rufai et al. (1995); Soslowsky et al. (2000); Nakama et al. (2005); Glazebrook et al. (2007); e Scott et al. (2007)**.

Os dados aqui obtidos referentes à evolução patológica da tendinose sustentam que o tecido está em franca tentativa de recuperação frente à sobrecarga constante. As células que estão em alta atividade nuclear se multiplicam através de mitoses, aumentando a densidade celular. Essas, por sua vez, se diferenciam e produzem maior quantidade de matriz extracelular (colágeno e glicosaminoglicanos) na expectativa de renovar o tecido. Por outro lado, a síntese e a deposição predominantemente de colágeno tipo III refletem uma tentativa frustrada de manter a homeostase tecidual. Além disso, os tenócitos sobrecarregados mecânicamente entram mais frequentemente em apoptose, como reflexo do desgaste bioquímico e mecânico (**Visentini et al., 1998; Scott & Duronio, 2003; Scott et al., 2005**).

Apoptose é uma morte celular programada que ocorre de maneira fisiológica (na embriogênese e nas glândulas mamárias após a lactação) ou patológica (sobrecarga mecânica, hipertermia e/ou alterações bioquímicas). Nesta, o conteúdo intracelular é fragmentado sem rupturas da membrana e endocitado por células vizinhas sem desencadear ativação de células fagocitárias. Por outro lado, a necrose é uma morte celular não programada que ocorre exclusivamente por agentes patológicos, na qual o conteúdo intracelular é exposto ao meio externo, desencadeando processo inflamatório reativo (**Pereira, 2006**). Assim, na evolução da tendinose, a própria morte celular dos tenócitos não estimula uma reação inflamatória, pois ela ocorre principalmente por apoptose, havendo uma quantidade mínima de células em necrose (**Scott et al., 2007**).

Outra importante consideração é que as tendinoses, como lesões degenerativas reversíveis, não envolvem necessariamente acúmulo de substâncias apenas no meio intracelular, como ocorre em outros tecidos (**Pereira, 2006**). Elas também apresentam alterações que modificam o meio extracelular. Dessa maneira, observa-se o seguinte paradoxo sobre patogênese da tendinose: São lesões celulares que alteram o intertécio? Ou são lesões da matriz extracelular que alteram o funcionamento dos tenócitos?

Uma interessante hipótese para essa reflexão é a mecanotransdução. Mecanotransdução é capacidade dos tenócitos em responder às cargas a fim de manter a homeostasia tecidual (**Ingber, 1997; Ruoslahti, 1997**). Segundo **Provenzano et al. (2002)** os fibroblastos exibem invaginações contendo fibrilas de colágeno que podem transmitir força. Essa organização afeta diretamente o mecanismo celular no que diz respeito à deformação, ou seja, a aplicação de cargas capaz de deformar a matriz extracelular pode ser transmitida à membrana celular e/ou citoesqueleto. Dessa maneira, uma resposta é sinalizada ao núcleo através de um sistema mecano-sensorial de tensigridade capaz de traduzir essas informações em respostas metabólicas adaptativas ou patológicas (**Wang et al., 2006; Arnoczky et al., 2007**). Sendo assim, uma sobrecarga mecânica constante e de intensidade inferior a uma deformação plástica total pode conduzir uma via de expressão gênica direta com consequentes alterações morfológicas que levam o tendão a uma resposta patológica degenerativa livre de um infiltrado inflamatório clássico (**Figura VX**).



**Figura XV** – Resposta dos tenócitos à sobrecarga mecânica. Essa resposta biológica apresenta um caráter adaptativo ou patológico que depende diretamente das características da carga imposta (Adaptado de **Wang et al., 2006**).

Como não há um período de descanso adequado para adaptação do tendão no protocolo do presente trabalho é plausível inferir que a expressão gênica conduza o tecido a alterações degenerativas (**Kjaer, 2004**), tais como aqui apresentadas.

Em relação ao local das lesões, elas podem ocorrer tanto no corpo do tendão, quanto na sua inserção com o osso (êntese). A êntese possui uma arquitetura complexa com obliquidade das fibras de colágeno e zonas de transição tecidual, além de ser uma região rica em condrócitos e glicosaminoglicanos. Devido à conformação dessa estrutura foi atribuída a função de minimizar a concentração do estresse na interface de tecido mole e osso (**Benjamin et al., 2006**). Apesar disso as alterações degenerativas concentram-se principalmente nesse ponto, sendo conseqüentemente o local mais comum de ruptura (**Maganaris et al., 2004**). Portanto, a escolha de obter imagens da região central do eixo longitudinal para

morfometria teve o intuito avaliar apenas as lesões bem estabelecidas em todo tendão.

Apesar de não haver nenhuma espécie “padrão-ouro”, os modelos que utilizaram ratos apresentaram comportamento tecidual semelhante ao humano, tendo uma boa evolução das condições da lesão e reproduzindo com fidedignidade as características teciduais patológicas, além de ser de fácil aplicação. Os ratos e camundongos também são os animais mais usados em pesquisa, sendo que cerca de 85% dos artigos da Medline e 70,5% dos artigos da Lilacs são referentes a esses roedores (**Fagundes & Taha, 2004**).

Todos os grupos tiveram livre acesso à água e comida, pois segundo **Enwemeka et al. (1992)**, a restrição de comida associada a exercícios pode levar a uma adaptação morfológica do tecido, predispondo a uma renovação com fibras de colágeno de tamanho reduzido.

É importante ressaltar no projeto piloto realizado observamos alterações degenerativas embora não tenha sido possível executar todas as colorações, pois o tecido tendinoso se mostrou sensível ao processamento histológico automatizado, se tornando friável aos cortes. Portanto, para esse trabalho padronizou-se o processamento histológico manual com o tempo do xilol e da parafina reduzidos, evitando, dessa maneira, desidratação excessiva e desnaturação das proteínas respectivamente.

Há uma tendência por parte dos Comites de Ética de orientar a utilização da quantidade mínima de animais para os projetos, visando a integridade física dos mesmos. Corroborando com esse fato, as variáveis do presente trabalho mostraram-se pouco instáveis. Sendo assim, a pequena quantidade de animais utilizados foi suficiente para obter precisão e confiança nos resultados (**Sampaio, 1998**). Já o método de eutanásia através da inalação por CO<sub>2</sub> produz efeito imediato sem aparente sofrimento, causando assim, o menor dano possível aos animais.

A biomecânica da marcha dos quadrúpedes apresenta uma característica propulsora predominantemente nos membros posteriores e uma desaceleradora nos membros anteriores (**Courtine et al., 2005**). Dessa maneira podemos observar que uma possível limitação do modelo de **Huang et al. (2004)** foi a utilização do declínio de 10° para priorizar a contração excêntrica do tríceps sural, pois a biomecânica dessa marcha não reproduziria o efeito desejado. Além disso, a própria gravidade

trabalhava a favor da propulsão dos animais. Portanto, diferentemente de **Huang et al. (2004)**, nesse trabalho foi utilizada uma inclinação de 10 graus da esteira e um protocolo com velocidade maior. A inclinação foi responsável por potencializar a contração dos músculos dos membros posteriores na fase de impulsão da corrida. Já a velocidade maior foi responsável por sobrecarregar ainda mais o tendão de Aquiles, pois segundo **Magnusson & Kjaer (2003)**, a relação tríceps sural/tendão é maior que supra-espinhoso/tendão.

Os modelos devem levar em consideração a especificidade de cada tendão no que se refere às diferenças na anatomia, função, mecanismo de lesão e/ou tamanho relativo músculo/tendão, pois todas essas características podem ser relevantes na gênese da tendinose. Além disso, eles devem procurar induzir a lesão da maneira similar ao que acontece em humanos. Dessa maneira, os modelos que utilizaram contração ativa para indução apresentam maior similaridade ao que realmente acontece no desenvolvimento clínico da tendinose, principalmente naqueles em que o tendão tem participação ativa durante a atividade imposta. No entanto, é importante ressaltar que o esforço repetitivo é apenas um potencial fator etiológico. Existem outros fatores não considerados nesse trabalho, que também afetam as propriedades biomecânicas do tendão, tais como, imobilização, envelhecimento e corticóides.

Futuras pesquisas devem investigar os mecanismos moleculares e bioquímicos envolvidos na patogênese, bem como o efeito de diversas terapias físicas e farmacológicas para a tendinose de Aquiles.

## **Conclusão**

De acordo com os resultados, pode-se observar que o modelo proposto atingiu o objetivo de descrever, analisar e sistematizar os eventos patológicos envolvidos na gênese da tendinose de Aquiles através de um modelo de indução por *overuse* em ratos machos Wistar.



## **Referências Bibliográficas:**

- Ahtikoski AM, Koskinen SOA, Virtanen P, Kovanen V, Risteli J, Takala TES. Type IV collagen in rat skeletal muscle during immobilization in shortened and lengthened positions. *Acta Physiol Scand.* 2003; 177: 473-481.
- Alfredson H, Thorsen K, Lorentzon R. In situ microdialysis in tendon tissue: High levels of glutamate, but not prostaglandin E2 in chronic Achilles tendon pain. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 1999; 7(6): 378-381.
- Alfredson H, Forsgren S, Thorsen K, Lorentzon R. In vivo microdialysis and immunohistochemical analyses of tendon tissue demonstrated high amounts of free glutamate and glutamate NMDAR1 receptors, but no signs of inflammation, in Jumper's knee. *J Orthop Res.* 2001; 19(5): 881-886.
- Allen GM, Tauro PG, Ostlere SJ. Proximal patellar tendinosis and abnormalities of patellar tracking. *Skeletal Radiol.* 1999; 28(4): 220-223.
- Archambault JM, Hart DA, Herzog W. Response of rabbit Achilles tendon to chronic repetitive loading. *Connect Tissue Res.* 2001; 42(1): 13-24.
- Archambault JM, Jelinsky SA, Lake SP, Hill AA, Glaser DL, Soslowsky LJ. Rat supraspinatus tendon expresses cartilage markers with overuse. *J Orthop Res.* 2007; 25(5): 617-624.
- Archambault JM, Wiley JP, Bray RC. Exercise loading of tendon and the development of overuse injuries: a review of current literature. *Sports Med.* 1995; 20(2): 77-89.
- Arnoczky SP, Lavagnino M, Egerbacher M. The mechanobiological aetiopathogenesis of tendinopathy: is it the over-stimulation or the under-stimulation of tendon cells? *Int J Exp Pathol.* 2007; 88: 217-226.

- Backman C, Boquist L, Friden J, Lorentzon R, Toolanen G. Chronic Achilles paratenonitis with tendinosis: An experimental model in the rabbit. *J Orthop Res.* 1990; 8: 541-47.
- Benjamin M, Toumi H, Ralphs JR, Bydder G, Best TM, Milz S. Where tendons and ligaments meet bone: attachment sites ('entheses') in relation to exercise and/or mechanical load. *J Anat.* 2006; 208: 471-90.
- Butler DL, Grood ES, Noyes FR, Zernicke RF. Biomechanics of ligaments and tendons. *Exerc Sport Sci Rev.* 1978; 6: 125-181.
- Caliari MV. *Princípios de morfometria digital: KS 300 para iniciantes.* Belo Horizonte: UFMG, 1997.
- Carpenter JE, Flanagan CL, Thomopoulos S, Yian EH, Soslowky LJ. The Effects of Overuse Combined With Intrinsic or Extrinsic Alterations in an Animal Model of Rotator Cuff Tendinosis. *Am J Sports Med.* 1998; 26(6): 801-807.
- Carr AJ, Norris SH. The blood supply of the calcaneal tendon. *J Bone Joint Surg Br.* 1989; 71(1): 100-101.
- Cook JL, Feller JA, Bonar SF, Khan KM. Abnormal tenocyte morphology is more prevalent than collagen disruption in asymptomatic athletes' patellar tendons. *J Orthop Res.* 2004; 22: 334–338.
- Cook JL, Khan K, Purdam C. Conservative Treatment of Patellar Tendinopathy. *Phys Ther in Sport.* 2001; 2: 1-12.
- Courtine G, Roy RR, Hodgson J, McKay H, Raven J, Zhong H, Yang H, Tuszynski MH, Edgerton VR. Kinematic and EMG Determinants in Quadrupedal Locomotion of a Non-Human Primate (Rhesus). *J Neurophysiol.* 2005; 93: 3127-3145.

- [Enwemeka CS](#), [Maxwell LC](#), [Fernandes G](#). Ultrastructural morphometry of matrical changes induced by exercise and food restriction in the rat calcaneal tendon. *Tissue Cell*. 1992; 24(4): 499-500.
- Eyden B, Tzaphlidou M. Structural variations of collagen in normal and pathological tissues: role of electron microscopy. *Micron*. 2001; 32: 287-300.
- Fagundes DJ, Taha MO. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. *Acta Cir Bras*. 2004; 19(1): 59-65.
- Fu SC, Chan KM, Rolf CG. Increased deposition of sulfated glycosaminoglycans in human patellar tendinopathy. *Clin J Sport Med*. 2007; 17(2): 129-134.
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*. 1992; 119(3): 493-501.
- Glazebrook MA, Wright Jr JR, Langman M, Stanish WD, Lee JM. Histological Analysis of Achilles Tendons in an Overuse Rat Model. *J Orthop Res*. 2007; 25: 1-8.
- Gross M. Chronic Tendinitis: Pathomechanics of Injury, Factors Affecting the Healing Response, and Treatment. *J Orthop Sports in Phys Ther*. 1992; 16(6): 248-261.
- Gustavson KH. The Chemistry and Reactivity of Collagen. New York: Acad Press, p. 224, 1956.
- Huang TF, Perry SM, Soslowsky LJ. The effect of overuse activity on Achilles tendon in an animal model: A biomechanical study. *Ann Biomed Eng*. 2004; 32(3): 336-341.

- Ireland D, Harrall R, Curry V, Holloway G, Hackney R, Hazleman B, Riley G. Multiple changes in gene expression in chronic human Achilles tendinopathy. *Matrix Biol.* 2001; 20: 159–169.
  
- Ingber DE. Tensegrity: the architectural basis of cellular mechanotransduction. *Annu Rev Physiol.* 1997; 59: 575–599.
  
- [Jarvinen M, Jozsa L, Kannus P, Jarvinen TL, Kvist M, Leadbetter W.](#) Histopathological findings in chronic tendon disorders. *Scand J Med Sci Sports.* 1997; 7(2): 86-95.
  
- Jones GC, Corps AN, Pennington CJ, Clark IM, Edwards DR, Bradley MM. Expression profiling of metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in normal and degenerate human Achilles tendon. *Arthritis Rheum.* 2006; 54(3): 832-842.
  
- Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica.* 10 edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
  
- Kader D, Saxena A, Movin T, Maffulli N. Achilles tendinopathy: Some aspects of basic science and clinical management. *Br J Sports Med.* 2002; 36(4): 239-249.
  
- Kalebo P, Goksor LA, Sward L. Soft tissue radiography, computed tomography and ultrasonography of partial Achilles tendon ruptures. [Acta Radiol.](#) 1990; 31: 565-570.
  
- Kannus, P. Etiology and pathophysiology of chronic tendon disorders in sports. *Scand J Med Sci Sports.* 1997; 7(2): 78-85.

- 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: 1507-1525.
- Kesler G, Koren R, Kesler A, Kristt D, Gal R. Differences in histochemical characteristics of gingival collagen after ER:YAG laser periodontal plastic surgery. *J Clin Laser Med Surg.* 2000; 18:203-207.
- 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): 393-404.
- Khan KM, Cook JL, Taunton JE. Overuse Tendinosis, Not Tendinitis - Part 1: A New Paradigm for a Difficult Clinical Problem. *Phys Sportsmed.* 2000; 28(5): 38-48.
- Khan KM, Maffulli N, Coleman BD, Cook JL, Taunton JE. Patellar tendinopathy: Some aspects of basic science and clinical management. *Br J Sports Med.* 1998; 32(4): 346-355.
- Kjaer, M. Role of Extracellular Matrix in Adaptation of Tendon and Skeletal Muscle to Mechanical Loading. *Physiol Rev.* 2004; 84: 649-698.
- Lake SP, Ansoorge HL, Soslowsky LJ. Animal models of tendinopathy. *Disabil Rehabil.* 2008; 30: 1-12.
- Li XJ, Schelling SH, Gavin DL, Wallace C, Clark C, Muzzi K, Archambault JM, Wozney J, Seeherman H. Rat achilles tendinopathy induced by peritendinous injections of PGE & pefloxacin. *Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society.* 2007.

- Lian OB, Engebretsen L, Bahr R. Prevalence of jumper's knee among elite athletes from different sports: a cross-sectional study. *Am J Sports Med.* 2007; 33: 561-567.
- Maganaris CN, Narici MV, Almekinders LC, Maffulli N. Biomechanics and Pathophysiology of Overuse Tendon Injuries. *Sports Med.* 2004; 34(14): 1005-1017.
- Maffulli N, Ewen SWB, Waterston SW, Reaper J, Barrass V. 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.* 2000; 28(4): 499-505.
- Maffulli N, Kader D. Tendinopathy of tendon Achilles. *J Bone Joint Surg Br.* 2002; 84(1): 1-8.
- Maffulli N, Khan, KM, Puddu G. Overuse Tendon Conditions: Time to Change a Confusing Terminology. *Arthroscopy.* 1998; 14(8): 840-843.
- Maffulli N, Wong J, Almekinders LC. Types and epidemiology of tendinopathy. *Clin Sports Med.* 2003; 22(4): 675-692.
- Magnusson SP, Kjaer M. Region-specific differences in Achilles tendon cross-sectional area in runners and non-runners. *Eur J Appl Physiol.* 2003; 90: 549-553.
- Messner K, Wei Y, Andersson B, Gillquist J, Rasanen T. Rat model of Achilles tendon disorder: A pilot study. *Cells Tissues Organs.* 1999; 169: 30-9.
- Nakama LH, King KB, Abrahamsson S, Rempel DM. Evidence of tendon microtears due to cyclical loading in an in vivo tendinopathy model. *J Orthop Res.* 2005; 23: 1199–1205.

- Nakama LH, King KB, Abrahamsson S, Rempel DM. VEGF, VEGFR-1, and CTGF cell densities in tendon are increased with cyclical loading: An in vivo tendinopathy model. *J Orthop Res.* 2006; 24(3): 393-400.
- Olesen JL, Heinemeier KM, Haddad F, Langberg H, Flyvbjerg A, Kjaer M. Expression of insulin-like growth factor I, insulinlike growth factor binding proteins, and collagen mRNA in mechanically loaded plantaris tendon. *J Appl Physiol.* 2006; 101: 183-188.
- Pereira FEL. Degenerações. Morte Celular. Alterações do Interstício. Cap 4: 38-69. Em: Filho, GB. *Bogliolo – Patologia.* 7 edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.
- Perry SM, McIlhenny SE, Hoffman MC, Soslowky LJ. Inflammatory and angiogenic mRNA levels are altered in a supraspinatus tendon overuse animal model. *J Shoulder Elbow Surg.* 2005; 14(1S): 79-83.
- Ploton D, Menager M, Jeannesson P. Improvement in the staining and the visualization of the argyrophilic proteins of nucleolar organizer regions at the optical level. *Histochem J.* 1986; 18(1): 5-14.
- Potter HG, Hannafin JA, Morwessel RM, DiCarlo EF, O'Brien SJ, Altchek DW. Lateral epicondylitis: Correlation of MR imaging, surgical, and histopathologic findings. *Radiology.* 1995; 196(1): 43-46.
- Provenzano PP, Heisey D, Hayashi K, Lakes R, Vanderby Jr R. Subfailure damage in ligament: a structural and cellular evaluation. *J Appl Physiol.* 2002; 92: 362-371.
- Rich A, Crick FHC. The molecular structure of collagen. *J Mol Biol.* 1961; 3: 483.

- Riley G. The pathogenesis of tendinopathy. A molecular perspective. *Rheumatology (Oxford)*. 2004; 43: 131-142.
  
- Riley GP, Harrall RL, Constant CR, Cawston TE, Hazleman BL. Prevalence and possible pathological significance of calcium phosphate salt accumulation in tendon matrix degeneration. *Ann Rheum Dis*. 1996; 55:109-115.
  
- Riley GP, Harrall RL, Constant CR, Cawston TE, and Hazleman BL. Tendon degeneration and chronic shoulder pain: changes in the collagen composition of the human rotator cuff tendons in rotator cuff tendinitis. *Ann Rheum Dis*. 1994; 53: 359–366.
  
- Riley GP, Harrall RL, Constant CR, Chard MD, Cawston TE, Hazleman BL. Glycosaminoglycans of human rotator cuff tendons: changes with age and in chronic rotator cuff tendinitis. *Ann Rheum Dis*. 1994; 53: 367-376.
  
- Rufai A, Ralphs JR, Benjamin M. Structure and histopathology of the insertional region of the human Achilles tendon. *J Orthop Res*. 1995; 13: 585–593.
  
- Ruoslahti E. Stretching is good for a cell. *Science*. 1997; 276: 1345–1346.
  
- Sampaio, IBM. *Estatística Aplicada à Experimentação Animal*. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998.
  
- Sandmeier R, Renstrom PA. Diagnosis and treatment of chronic tendon disorders in sports. *Scand J Med Sci Sports*. 1997; 7(2): 96-106.
  
- Schepesis AA, Jones H, Haas AL. Achilles tendon disorders in athletes. *Am J Sports Med*. 2002; 30(2):287-305.
  
- Scott A, Cook JL, Hart DA, Walker DC, Duronio V, Khan KM. Tenocyte Responses to Mechanical Loading In Vivo - A Role for Local Insulin-Like



Growth Factor 1 Signaling in Early Tendinosis in Rats. *Arthritis Rheum.* 2007; 56(3): 871-881.

- Scott A, Duronio V. Understanding tendinopathies. *Br J Sports Med.* 2003; 37: 279.
- Scott A, Khan KM, Duronio V. IGF-I activates PKB and prevents anoxic apoptosis in Achilles tendon cells. *J Orthop Res.* 2005; 23: 1219-1225.
- Screen HR, Shelton JC, Chhaya VH, Kayser MV, Bader DL, Lee DA. The influence of noncollagenous matrix components on the micromechanical environment of tendon fascicles. *Ann Biomed Eng.* 2005; 33: 1090-1099.
- Silva RD, Vasconcelos AC, Campos, VC. Modelos experimentais de indução à tendinose por esforço repetitivo - Revisão de literatura. *Fisioterapia em Movimento.* 2008; 21(4): 101-10.
- Silva RD, Campos VC. *Cinesioterapia – Fundamentos Teóricos para Prática.* 1 edição. Belo Horizonte: Coopmed, 2006.
- Snell R S. *Clinical and functional histology for medical students.* Boston: Little, Brown, 1984.
- Sommer HM. The biomechanical and metabolic effects of a running regime on the Achilles tendon in the rat. *Int Orthop.* 1987; 11: 71-75.
- Soslowky LJ, Thomopoulos S, Esmail A, Flanagan CL, Iannotti JP, Williamson JD, Carpenter JE. Rotator Cuff Tendinosis in an Animal Model: Role of Extrinsic and Overuse Factors. *Ann Biomed Eng.* 2002; 30: 1057-1063.
- Soslowky LJ, Thomopoulos S, Tun S, Flanagan CL, Keefer CC, Mastaw J, Carpenter JE, Mich AA. Overuse activity injures the supraspinatus tendon in an animal model: A histologic and biomechanical study. *J Shoulder Elbow Surg.* 2000; 9: 79-84.

- Szomor ZL, Appleyard RC, Murrell GA: Overexpression of nitric oxide synthases in tendon overuse. *J Orthop Res* 2006, 24(1):80-6.
  
- Taylor DC, Dalton JD, Seaber AV, Garrett WE. Viscoelastic properties of muscle tendon units. The biomechanical effects of stretching. *Am J Sports Med.* 1990; 18(3): 300-308.
  
- Tuoheti Y, Itoi E, Pradhan RL, Wakabayashi I, Takahashi S, Minagawa H, Kobayashi M, Okada K, Shimada Y. Apoptosis in the supraspinatus tendon with stage II subacromial impingement. *J Shoulder Elbow Surg.* 2005; 14(5):535-541
  
- Vasconcelos AC. *Métodos aplicados ao estudo da Apoptose.* Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 2001, 17p. Print out do Curso PAG 807 – Métodos de Estudo aplicados à Apoptose.
  
- Viidik A, Danielsen CC, Oxlund H. Fourth International Congress of Biorheology Symposium on Mechanical Properties of Living Tissues: On fundamental and phenomenological models, structure and mechanical properties of collagen, elastic and glycosaminoglycan complexes. *Biorheology.* 1982; 19: 437.
  
- Visentini PJ, Khan K, Cook J, Kiss ZS, Harcourt PR, Wark JD. 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.* 1998; 1: 22-28.
  
- Wang JHC, Iosifidis MI, Fu FH. Biomechanical basis for tendinopathy *Clin Orthop Relat Res.* 2006; 443: 320-332.
  
- Warden SJ. Animal models for the study of tendinopathy. *Br J Sports Med.* 2007; 41: 232–240.

- Yuan J, Murrell GA, Trickett A, Wang MX. Involvement of cytochrome c release and caspase-3 activation in the oxidative stress-induced apoptosis in human tendon fibroblasts. *Biochim Biophys Acta*. 2003; 1641: 35-41.
  
- Yuan J, Murrell GA, Wei A, Wang MX. Apoptosis in rotator cuff tendonopathy. *J Orthop Res*. 2002; 20: 1372–1379.

# Luigi Bogliolo

1908-2008

Declaramos que o trabalho “MODELO EXPERIMENTAL DE INDUÇÃO À TENDINOSE DE AQUILES: UM ESTUDO DA PATOGÊNESE”, de autoria do estudante RAFAEL DUARTE SILVA, foi selecionado entre os melhores pôsteres (mestrado) do I Encontro de Pós-Graduação em Patologia da UFMG - Centenário de Nascimento de Luigi Bogliolo, realizado nos dias 17 e 18 de abril de 2008, na Faculdade de Medicina da UFMG.



**Professor Giovanni Cassali**

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFMG

