



MARTHA COSTA DE SOUZA

**O TRATAMENTO COM ÁCIDO ASCÓRBICO ACELERA O PROCESSO DE
REPARO DO TENDÃO CALCÂNEO EM MODELO DE LESÃO TENDÍNEA
EM RATOS**

Dissertação de mestrado submetido ao
Programa de Pós-Graduação em Neurociências e
Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade Federal do Pará para obtenção do
grau de mestre em Neurociências e Biologia Celular
- área de concentração em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano
Oliveira da Silva, ICB – UFPA.

BELÉM/PA
2015

Ficha Catalográfica

S719t Souza, Martha Costa de

O tratamento com ácido ascórbico acelera o processo de reparo do tendão calcâneo em modelo de lesão tendínea em ratos./ Martha Costa de Souza – Belém, Pará, 2015.
62 f.; il.

Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Anderson Manuel Herculano Oliveira da Silva.

1. Tendinopatia. 2. Vitamina C. 3. Estresse oxidativo. I. Silva, Anderson Manuel Herculano Oliveira da. II. Título. III. Universidade Federal do Pará.

CDD 617.470044

Bibliotecária responsável:
Kátia Valéria Amoras Botelho
CRB-2/1412

MARTHA COSTA DE SOUZA

O TRATAMENTO COM ÁCIDO ASCÓRBICO ACELERA O PROCESSO DE
REPARO DO TENDÃO CALCÂNEO EM MODELO DE LESÃO TENDÍNEA EM
RATOS

Defesa do trabalho de Mestrado submetido ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular – área de concentração em Neurociências.

Banca examinadora:

Orientador: Professor Dr Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará - UFPA.

Membro da Banca: Professor Dr. Carlo Magno Pacheco Bahia
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará - UFPA

Membro da Banca: Prof.Dr. Karen Renata Herculano Matos Oliveira
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará - UFPA.

BELÉM/PA
2015

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Neuroendocrinologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará sob orientação do Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva. A realização da pesquisa contou com o apoio das seguintes instituições de fomento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) e Fundação Amazônia Paraense de Amparo à Pesquisa (Fapespa).

Aos meus pais Luiz Sérgio e Regina Souza
pelos investimentos em minha educação e ao
Ricardo França pelo incentivo e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me conceder a felicidade dessa conquista, me dando saúde e força para batalhar a cada dia.

Agradeço ao meu pai Luiz Souza, o primeiro professor que conheci na vida e que de qualquer forma, nem que seja indiretamente influenciou minha escolha profissional, desde as minhas brincadeiras de criança de professora quando pegava a caixa de giz dele e saía dando aula pra minhas bonecas, até os dias de hoje pela paixão demonstrada à profissão.

A minha mãe, Regina Souza meus eternos agradecimentos pelo apoio, incentivo e pelo exemplo de guerreira determinada e otimista. Palavras que nunca esquecerei: “não existem profissionais mal-sucedidos, existem profissionais que não amam o que fazem”.

Ao meu eterno companheiro Ricardo França, que dividiu comigo todas as conquistas e que nos momentos difíceis sempre teve palavras de incentivo.

Gostaria de agradecer ao meu orientador Prof.Dr. Anderson Herculano por ter aberto as portas do seu laboratório (LNE) e me permitido adentrar no mundo da ciência. Cada ensinamento, cobrança e apoio foram fundamentais em minha formação.

Não poderia deixar de agradecer a Mônica Lima por ter me apoiado e me direcionado quando tudo ainda era apenas um sonho.

Aos meus colegas do “tendão”, Dlânio Gabriel e Suellen Moraes pela paciência e tempo investido em minha formação.

Agradeço aos colegas do LNE que diretamente ou indiretamente me apoiaram ao longo dessa caminhada e que hoje compartilham comigo esta alegria.

A CAPES, CnPq e Fapespa pelo apoio financeiro.

RESUMO

A ruptura do tendão calcâneo acomete uma grande parte da população, principalmente atletas e idosos e seu processo de reparo ainda necessita de maiores esclarecimentos, possibilitando novos tratamentos. O ácido ascórbico (AA) é uma substância conhecida pela participação na hidroxilação de prolina e lisina, importante para síntese da matriz extracelular, bem como eficiência comprovada em diversos tratamentos por suas propriedades antioxidantes. Dessa forma, o presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito do tratamento local com AA nos parâmetros de reparo tecidual e funcional no tendão calcâneo de ratos. O trabalho foi aprovado pelo comitê de ética da instituição (CEPAE-UFPa) sob o parecer 161-13. Os animais foram submetidos à ruptura do tendão calcâneo, em três grupos (n=18): Controle; Injúria+AA (30mM); Injúria+veículo (NaCl 0,9%). Todos os tratamentos foram realizados por injeção local, a partir do segundo dia pós-lesão e a cada dois dias até o 14º dia ou 21º dia. Foi avaliado a marcha dos animais pelo Índice funcional de Aquiles (IFA) nos dias 7(n=6), 14(n=6) e 21(n=3) dias pós-lesão, o número de células por marcação com DAPI no 14º(n=9) e 21º(n=9) dia pós-lesão e a estrutura do tecido por marcação com HE, nos mesmos dias. Os animais não diferiram no ganho de massa corporal. O grupo Injúria+AA(-39.51±15.3) apresentou melhora funcional principalmente no 14º dia, se comparado ao grupo Injúria+veículo(-89.22±16.57, p<0,01). A análise histológica demonstrou sob contagem do número de células, que o grupo Injúria+AA(762±29.6) apresentou um menor número de células no 21º dia em relação ao grupo Injúria+veículo(916±57.0, p<0,01). A análise da autofluorescência do colágeno e HE demonstrou que o grupo tratado com AA apresentou uma estrutura tecidual mais conservada em 14 e 21 dias pós-lesão em relação ao grupo veículo que, por sua vez, difere bastante do grupo controle. Nossos resultados sugerem que o ácido ascórbico acelera o processo de reparo da lesão tendínea, apresentando melhoras teciduais e funcionais 21 dias após a lesão.

Palavra Chave: Tendinopatia. Vitamina C. Estresse oxidativo.

ABSTRACT

Tendon rupture affects a large part of the population in special seniors and athletes. The repair process requires more studies which can indicate the possibility of new treatments. The ascorbic acid (AA) is a well known substance by its requirement for proline and lysine hydroxylase activity during the collagen synthesis and the efficiency of this vitamin for various treatments, because of its antioxidant properties. So, the aim of the present study is to evaluate the local treatments effects with this substance on tissue and functional repair the Achilles tendon from rats. The study was approved by the ethics committee of the institution (CEPAE-UFPA) according to the license 161-13. The animals were submitted to rupture of Achilles tendon, divided into three groups (n=27): control, injury+AA (30 mM), injury+vehicle (0.9% NaCl). All treatments were performed by local injection, from the second day after injury and every other day until day 14 or 21. The walk of the animals was assessed by functional index of Achilles (IFA) on days 7(n=6), 14(n=6) e 21(n=3), cells number was assessed by staining with DAPI and tissue organization by staining with HE and autofluorescence, at 14(n=9) and 21(n=9) days of injury. The animals did not differ in body mass gain. The injury+AA group (-39.51 ± 15.3) showed functional improvement especially at day 14 when compared to the injury+vehicle (-89.22 ± 16.57 , $p < 0.01$). The histological examination demonstrated in counting the number of cells that the injury+AA group (762 ± 29.6) showed a smaller number of cells on day 21 (762 ± 29.6) in relation to the groups injury+vehicle (916 ± 57.0 , $p < 0.01$). The analysis of autofluorescence of collagen and HE showed that the injury+AA group achieved better ECM organization on day 14 and 21 in relation to the groups injury+vehicle, in turn, differs significantly from the control group. Our results suggest that AA accelerates the healing process of tendon injury, presenting tissue and functional improvements 21 days after injury

Key-word: Tendinopathy. Vitamin C. Oxidative Stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Lesão do Tendão calcâneo. Indicação da região onde ocorre a ruptura (porção medial).....	18
Figura 2	Morfologia do colágeno na tendinopatia.....	19
Figura 3	Estrutura e organização do tendão.....	21
Figura 4	Tripla hélice do colágeno.....	22
Figura 5	Fases de reparo do tendão.....	27
Figura 6	Estrutura anatômica do tendão calcâneo de rato.....	28
Figura 7	Efeito do tratamento com AA no número de células em 14 e 21 dias pós-lesão.....	40
Figura 8	Papel do tratamento com AA no número de células por campo nos dias 14 e 21 pós lesão.....	41
Figura 9	Papel do AA na estrutura do colágeno em 14 dias e 21 dias pós-lesão.....	43
Figura 10	Efeito do tratamento com AA na organização tecidual em 14 e 21 dias pós-lesão.....	44
Figura 11	Papel do AA na recuperação funcional da marcha.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA: Ácido Ascórbico

ATP: Trifosfato de adenosina

CAT: Catalase

COMP: Proteína de matriz oligomérica da cartilagem

CTR: Controle

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DORT: Distúrbios osteomusculares relacionados ao trabalho

ERNs: Espécies reativas de nitrogênio

EROs: Espécies reativas de oxigênio

GPX: Glutathione peroxidase

GR: Glutathione reductase

HE: Hematoxilina Eosina

IFA: Índice funcional de Aquiles

IL-1 β : Interleucina 1 beta

I.P.: Intraperitoneal

ITF: Fator teste intermediário

I.V.: Intravenoso

LER: Lesão por esforço repetitivo

MMPs: Metaloproteinases

PFL: Fator de comprimento da pegada

PGs: Proteoglicanos

SH: Grupamento sulfidril

SOD: Superóxido desmutase

TSF: Fator de espalhamento dos dedos do pé

TNF α : Fator de Necrose Tumoral Alfa

VE: Veículo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1	TENDINOPATIA.....	16
2.1.1	ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS.....	17
2.2	CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DO TENDÃO SADIO.....	20
2.3	FISIOPATOLOGIA DA LESÃO TENDÍNEA.....	25
2.4	DEFESA ANTIOXIDANTE E AS LESÕES TENDÍNEAS.....	29
2.5	O ÁCIDO ASCÓRBICO.....	30
3	OBJETIVO.....	33
3.1	OBJETIVO GERAL.....	33
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
4.1	ANIMAIS.....	34
4.2	CIRURGIA.....	34
4.3	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	35
4.4	ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	35
4.4.1	CORTES HISTOLÓGICOS.....	35
4.4.2	COLORAÇÃO COM HEMATOXILINA E EOSINA.....	36
4.4.3	AUTOFLUORESCÊNCIA DO COLÁGENO.....	36
4.4.4	CONTAGEM DE CÉLULAS.....	37
4.5	AVALIAÇÃO DO ÍNDICE FUNCIONAL DE AQUILES (IFA).....	37
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
5	RESULTADOS.....	39
5.1	ANÁLISE DO Nº DE CÉLULAS NO TENDÃO CALCÂNEO DE RATOS TRATADOS COM ÁCIDO ASCÓRBICO.....	39
5.2	EFEITO DO TRATAMENTO COM ÁCIDO ASCÓRBICO NA ORGANIZAÇÃO TECIDUAL APÓS A LESÃO TENDÍNEA.....	42
5.3	ANÁLISE DO ÍNDICE FUNCIONAL DE AQUILES DE RATOS TRATADOS COM ÁCIDO ASCÓRBICO.....	45
6	DISCUSSÃO.....	47
7	CONCLUSÃO.....	52
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

9	ANEXO (PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA).....	62
----------	--	-----------

1 INTRODUÇÃO

A tendinopatia é uma doença que atinge os tendões e afeta em sua maioria atletas e idosos, sendo responsável pela ineficiência em atividades da vida diária como também pelo afastamento precoce das atividades esportivas e de trabalho. Associada a dor crônica, tal patologia ganha maiores proporções ao apresentar limitações no movimento nos indivíduos acometidos (FREDBERG, 2004; MOS *et al*, 2007; SCOTT *et al*, 2007; RILEY, 2008).

A lesão é geralmente atribuída ao uso excessivo do tendão, e representam mais de 50% das lesões tendíneas em esportes. Os tendões mais suscetíveis a injúrias são o patelar, tibial posterior, cabeça longa do bíceps braquial, manguito rotador, extensores do punho e tendão calcâneo (ou tendão de Aquiles) (GIBBON, 1999; REES, 2006; REES, 2009).

A etiologia da doença ainda não está clara e muitas causas atribuídas à injúria ainda são apenas hipóteses. Hipóxia, dano isquêmico, estresse oxidativo, predisposição genética, hipertermia, ativação de mediadores inflamatórios e desequilíbrio das metaloproteinases têm sido implicados como mecanismos de degeneração do tendão (SHARMA; MAFFULI, 2006; LONGO, 2014).

O Brasil não possui dados estatísticos da prevalência dessa doença. No entanto o ministério da saúde tem demonstrado necessidade de atenção à temática apresentando cartilhas publicadas pelo Departamento de Ações Programáticas e Estratégicas da Secretaria de Política de Saúde, contendo esclarecimentos e alertas para a existência de tratamento e prevenção da Lesão por Esforço Repetitivo (LER) e Distúrbios Osteomioarticulares Relacionados ao Trabalho (DORT), nos quais a tendinopatia está inclusa (BRASIL, 2001).

Alguns aspectos são apontados como complicadores para o processo de tratamento dessas doenças como: a complexidade do quadro clínico, a intervenção de quem faz o diagnóstico e as condições em que se pode tomar a conclusão diagnóstica, que na maioria das vezes não são ideais. Considerando que múltiplos fatores podem desencadear o quadro clínico, se faz necessário uma investigação mais cuidadosa desta injúria (BRASIL, 2001).

Diante de inúmeros casos recorrentes de tendinopatia, muitas pesquisas têm sido desenvolvidas a fim de tratar essa doença, buscando estratégias com o intuito de

acelerar o processo de reparo e devolver ao tecido uma estrutura e função mais próxima de um tendão saudável. Nesse contexto diversas abordagens terapêuticas vêm sendo testadas, no entanto, os resultados de tais tratamentos ainda não são suficientes para possibilitar uma recuperação satisfatória, ficando evidente a necessidade de mais estudos voltados para esse campo de pesquisa.

Os estudos realizados até o momento discutem as alterações estruturais, funcionais e dos fatores que modulam a manutenção da injúria, no entanto acreditamos que o direcionamento das pesquisas devem se voltar também para a busca do aperfeiçoamento de ferramentas farmacológicas a fim de beneficiar os indivíduos lesionados.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 TENDINOPATIA

As condições que afetam os tendões que incluem dor crônica e ruptura são referidas geralmente como tendinopatias em detrimento de termos como tendinose (referida à degeneração) e tendinites (referida à inflamação), uma vez que, a terminologia não refere à patologia em sua complexidade (GABEL, 1999; RILEY, 2008).

A tendinopatia é caracterizada por uma injúria que atinge os tendões, estando mais associado aos que são expostos a altas cargas mecânicas e se submetem a uma remodelagem muito extensiva da matriz extracelular (BANK *et al.*, 1999; RILEY *et al.*, 2002; BIRCH, 2007).

A lesão tendínea pode ocorrer por fatores intrínsecos ou extrínsecos, porém, a interação entre esses dois fatores é comumente observada no surgimento desse quadro. Fatores extrínsecos como idade, obesidade, uso excessivo do tendão ou então uma biomecânica e alinhamento corporal incorreto podem acabar induzindo inflamação e alterações degenerativas que eventualmente podem levar a ruptura. Intervenções externas que acarretem o alongamento do tecido além de sua capacidade elástica, a exemplo de uma super pronação do tornozelo sobrecarregando o tendão calcâneo, também pode ser fator causal da patologia (SHARMA; MAFFULLI, 2006; REES, 2009; FRANCESCHI, 2014).

Os fatores extrínsecos são mais facilmente esclarecidos, em contrapartida, as causas intrínsecas envolvidas no processo de regeneração da matriz ainda vêm sendo teorizadas sob diversas hipóteses, bem como condições de hipóxia, presença de mediadores inflamatórios, estresse oxidativo, desregulação da atividade de metaloproteinases, hipertermia, desordens hereditárias ou adquiridas entre outros (O'BRIEN, 1997; SHARMA; MAFFULLI, 2006; MOS *et al.*, 2007; MAGRA; MAFFULLI, 2008).

2.1.1 Aspectos Fisiopatológicos

A tendinopatia pode apresentar vários diagnósticos, que variam do menos grave, representado pela presença de inflamação e ruptura parcial ocorrida mais frequentemente; para o mais grave, cuja ruptura total é observada. Essa ruptura geralmente ocorre na região medial do tendão, como mostra a figura 1 (GIBBON,1999; SHARMA; MAFFULLI, 2006; RILEY, 2008).

Independente da gravidade da tendinopatia, a dor está sempre presente. Alguns estudos atribuem a dor à inflamação, no entanto, outros estudos se opõe a essa afirmativa ao concluir que, na dor crônica, muito frequente e de difícil manejo, não há mais processo inflamatório, portanto, alegam que a dor deve estar relacionada à presença de fibras nervosas, neurotransmissores e/ou substâncias químicas que são expressas no local mediante os mecanismos do processo de reparo (ALFREDSON *et al*, 2003; OHBERG; ALFREDSON, 2003; SHARMA; MAFFULLI, 2006).

O tendão saudável possui uma textura fibroelástica de aparência branca e brilhante. Suas células são alongadas e se organizam em feixes de fibras paralelas de colágeno e possuem grande quantidade de matriz extracelular. Porém, após a lesão, o tecido muda completamente essa estrutura. Há uma perda drástica do colágeno tipo I, e as fibras que permanecem são sintetizadas ou ficam desorganizadas e adquirem aparência opaca de coloração castanha. Um aumento no volume total do tendão também é notável em decorrência da quantidade de água que migra para o tecido. As diferenças morfológicas são melhores compreendidas através de uma visão ultramicroscópica, como podemos observar na figura 2 (SHARMA; MAFFULLI, 2006; BRING, 2007; MOS, 2007).

Para uma melhor compreensão das demais mudanças ocorridas no tecido tendíneo é necessário primeiramente tomar conhecimento das características desse tecido sadio que serão descritos abaixo.

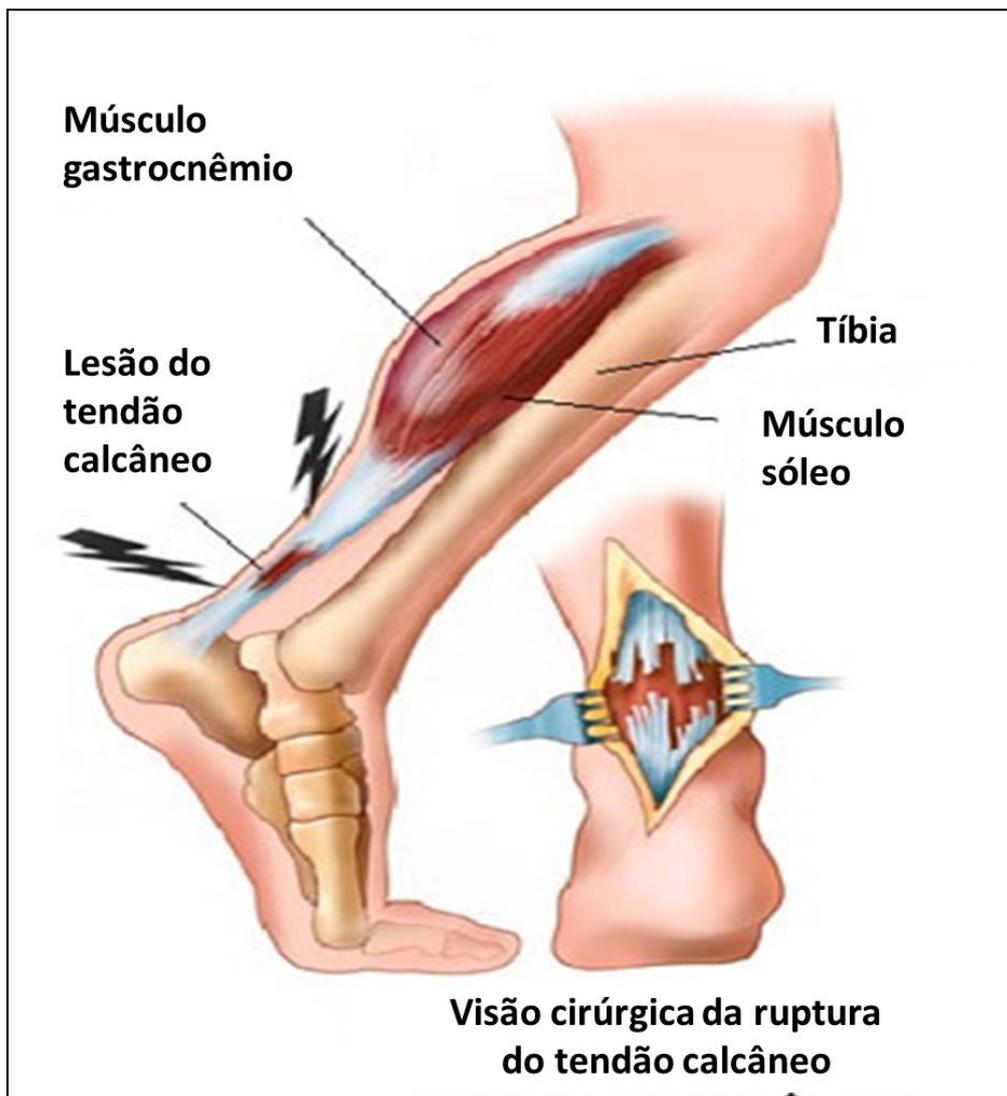


Figura 1 - Lesão do Tendão calcâneo. Indicação da região onde ocorre a ruptura (porção medial). Fonte: www.ruinelson.net acesso em 27 de outubro de 2014.

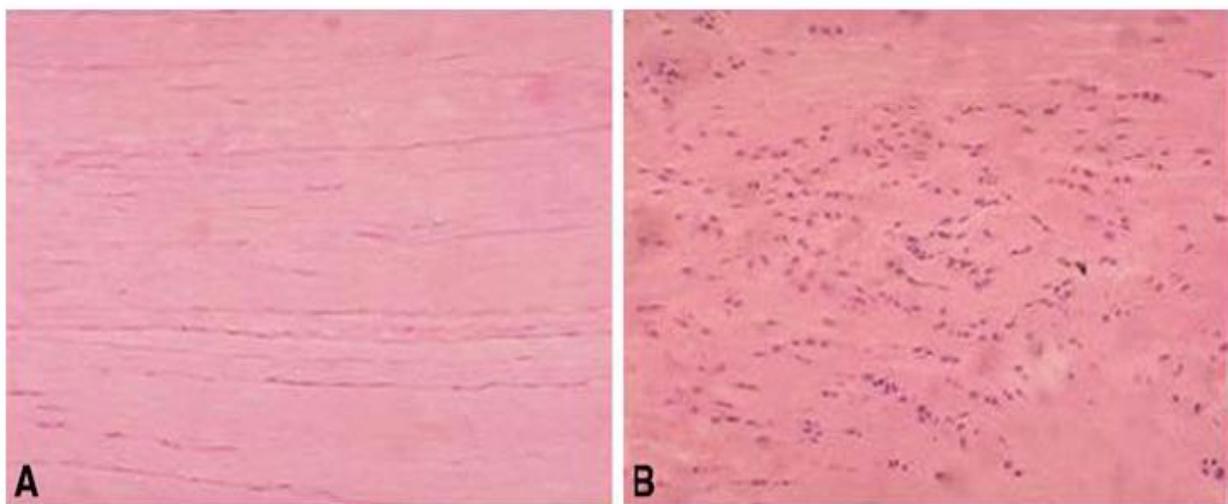


Figura 2 - Morfologia do colágeno na tendinopatia. **A** e **B**, Coloração HE. Microscopia de luz. Fotomicrografia de secção histológica do tendão normal, demonstrando em **A**, boa organização do colágeno fibrilar com padrão de bandas típicas e células fusiformes. **B**, lesão do tendão supraespinal por uso excessivo, demonstrando fibras de colágeno desalinhas e células arredondadas. Fonte: SOSLOWSKY *et al*, 2000.

2.2 CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DO TENDÃO SADIO

Os tendões são constituídos essencialmente por tecido conjuntivo denso modelado, apresentam uma textura fibroelástica e composição predominante de colágeno e tenócitos (fibroblastos especializados do tendão) e em sua minoria de proteoglicanos, glicoproteínas, elastina e tenoblastos (células tendíneas imaturas) (KANNUS, 2000; BRING, 2007).

O colágeno que compõe a matriz do tendão é equivalente a 65 a 80% da massa do peso seco do tecido, dos quais, 95% é de colágeno tipo I e os 5% restante de colágeno do tipo III, IV e V (O'BRIEN, 1997; RILEY, 2004).

Os feixes de fibras que compõem o tendão resultam da agregação de fibrilas de colágeno individuais que nada mais são que um conjunto de moléculas de colágeno que, por sua vez, organizam-se de forma hierárquica. A unidade de tendão é rodeada pelo tecido conjuntivo chamado paratendão o qual possui uma camada interna de líquido sinovial e evita a fricção contra tecidos circundantes. Os fascículos são rodeados pelo epitendão que é um tecido conjuntivo que contém os sistemas vasculares, linfáticos e nervos. Mais profundamente as fibras de colágeno são circundadas pelo endotendão (figura 3) (KANNUS, 2000; CANTY; KADLER, 2002; FRANCHI, 2007).

As moléculas de colágeno são constituídas por uma tripla hélice de polipeptídios chamadas de cadeias alfas (α), subdivididas em dois tipos: Alfa1 ($\alpha 1$) e Alfa2 ($\alpha 2$) (Figura 4). Essas fitas possuem uma sequência de aminoácidos, sendo eles: glicina, prolina e lisina, além de outros aminoácidos modificados, a hidroxiprolina e hidroxilisina, derivados respectivamente da prolina e lisina através do processo enzimático de hidroxilação. A hidroxilação é dependente de vitamina C e ocorre depois da cadeia peptídica ter atingido um determinado comprimento. Desta forma, em caso de lesão, a utilização in loco de substâncias que favoreçam a polimerização do colágeno pode representar uma importante estratégia terapêutica. (O'BRIEN, 1997; PHILLIPS; YEOWELL, 1997; CANTY; KADLER, 2005; MARTOS *et al*, 2007)

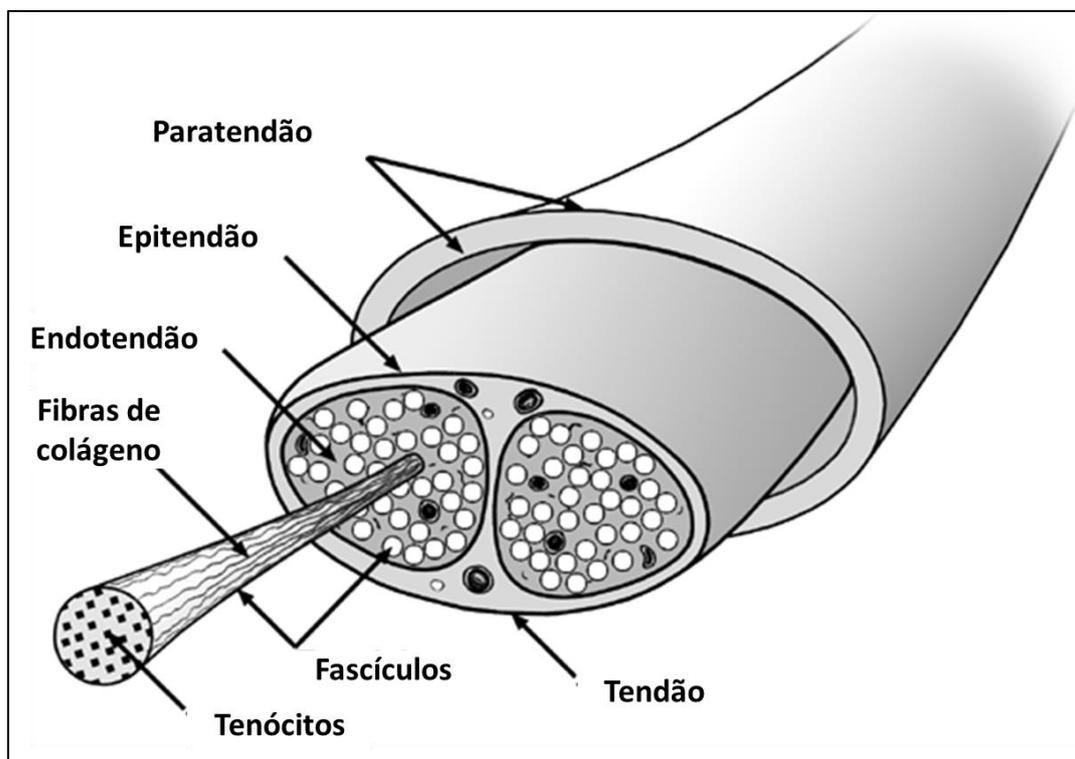


Figura 3. Estrutura e organização do tendão. Diagrama ilustrando a relação entre as fibras de colágeno, fascículos, unidades de tendão e os tecidos conjuntivo que os circundam respectivamente. Fonte: www.msdlatinamerica.com acesso em 25 de outubro de 2014.

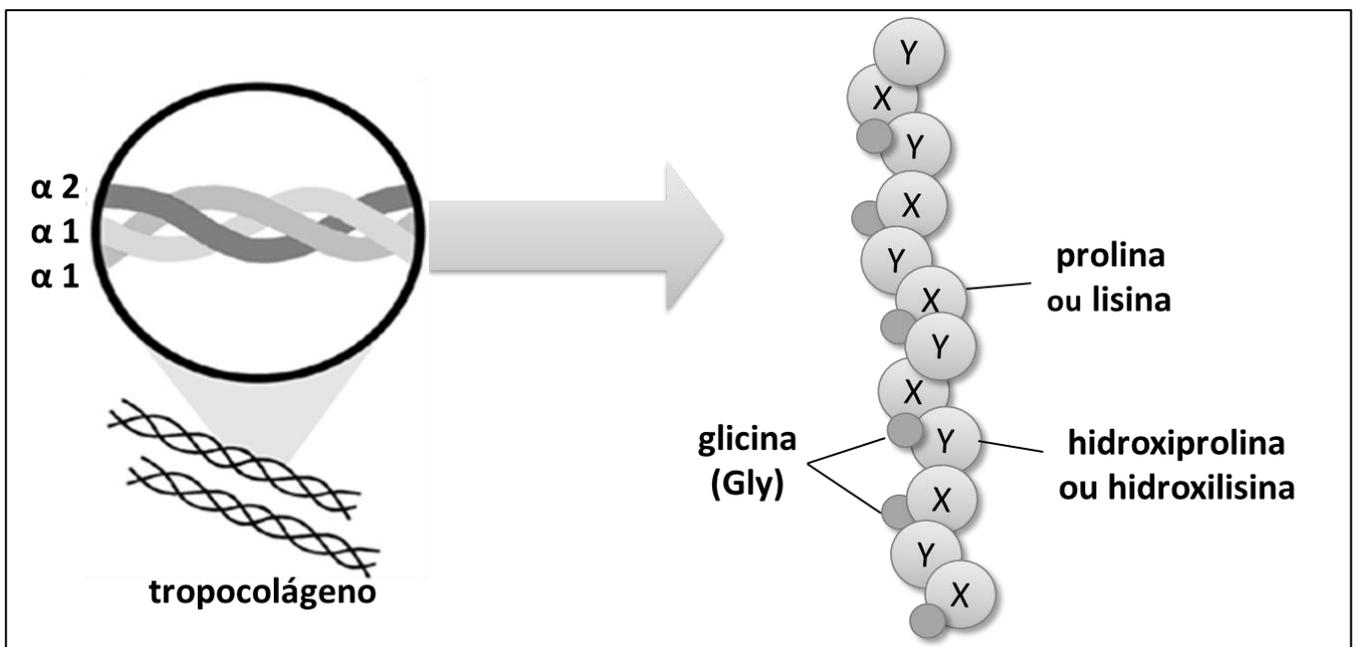


Figura 4. Tripla hélice de polipeptídios que constituem o colágeno, subdivididas em cadeias $\alpha 1$ e $\alpha 2$. Tais cadeias são compostas por aminoácidos denominados de prolina, lisina e glicina; hidroxiprolina e hidroxilisina derivados respectivamente da prolina e lisina após processo enzimático de hidroxilação.

Nos períodos de reparo do tecido, bem como no de desenvolvimento embrionário e regeneração, ocorre a síntese e remoção de colágeno e esses processos são orquestrados pelos fibroblastos (tenoblastos no tendão). As células do tendão (tenócitos e tenoblastos) compõem cerca de 90-95% dos elementos celulares desse tecido e situam-se entre as fibras de colágeno. Os tenoblastos são células imaturas que estão dispostas em cadeias longas paralelas e apresentam formas e tamanhos diferentes, alguns são alongados, outros arredondados ou poligonais. Com o amadurecimento dessas células, todas tornam-se semelhantes apresentando forma de fuso e, a partir de então, são denominadas tenócitos (O'BRIEN, 1997; KANNUS, 2000; CANTY; KADLER, 2005; SHARMA; MAFFULLI, 2006).

A regulação das atividades celulares é feita pelos proteoglicanos (PGs), que representam cerca de 1% da composição do tecido. Além dos PGs a matriz não colágena também é composta por outras moléculas de glicoproteínas, como proteína de matriz oligomérica da cartilagem (COMP), lubricina e a tenascina-C. Embora estas proteínas não colagenosas sejam conhecidas por estarem presentes no tendão, há relativamente pouco conhecimento da localização precisa ou a função de proteínas específicas no interior da matriz extracelular de tendão (SMITH *et al*, 1997; KINSELLA *et al*, 2004; YOON; HALPER, 2005; SCHAEFER; IOZZO, 2008; SAMIRIC, 2009; THORPE, 2013).

Especificamente nos tendões, há uma crescente linha de pesquisa sugerindo que a matriz não colágena desempenha papel importante no tecido tendíneo, apontando que adaptações a esta matriz pode conferir as propriedades específicas requeridas pelos tendões com diferentes funções. A matriz extracelular também inclui uma proteína fibrosa denominada elastina, que representa cerca de 1 a 10% da massa seca do tendão e forma parte da fibra elástica que garante elasticidade ao tecido tendinoso. Possui a capacidade de estender até 100% de seu comprimento original, além disso, é altamente resistente a fadiga. Muito pouco é encontrado de elastina na cicatrização de lesões (AARON; GOSLINE, 1981; GOSLINE *et al*, 2002; KOROL *et al*, 2007; SAMIRIC, 2009; THORPE, 2013).

Os tendões são pouco vascularizados, conseqüentemente são pouco oxigenados; recebem sangue através dos vasos do perímio, na inserção periosteal, e no tecido circunvizinho por meio de vasos no epitendão ou na superfície do tendão (paratendão). A carga mecânica e idade são fatores que diminuem ainda mais o fluxo sanguíneo (O'BRIEN, 1997; SHARMA; MAFFULLI, 2006).

A inervação do tendão se origina de troncos nervosos que alvejam tecido muscular, cutâneo e peritendíneo. As terminações nervosas das fibras mielinizadas funcionalmente são mecanorreceptores, especializados em detectar mudanças na pressão ou tensão, denominados órgão tendinoso de golgi. Já as fibras não mielinizadas agem como nociceptores que detectam e transmitem informação de dor. A dor aparece classicamente com um aumento na carga de treinamento ou, em atletas de elite, sustentada por altas cargas de treinamento. Parece mais prevalente nos esportes que têm uma grande componente de corrida, mas ocorre em todos os esportes e em todos os níveis de participação. Ocasionalmente, é encontrada em indivíduos inativos. (ACKERMANN *et al*, 2001; COOK, 2002; SHARMA; MAFFULLI, 2006).

O uso excessivo do tendão justifica o fato de essa doença acometer em sua maioria atletas por se submeterem a grandes tensões. Toda tensão produzida nos músculos é transmitido pelos tendões até os ossos com a finalidade de gerar o movimento articular. Para isso, o tendão é dotado de uma grande resistência a cargas mecânicas e ainda têm a capacidade de absorver grandes choques e proteger os músculos de possíveis estiramentos (KANNUS, 2000; VIDAL, 2003; SHARMA; MAFFULLI, 2006; RILEY, 2008).

A forma e maneira como esses tendões são ligados ao osso variam de tendões largos e planos para cilindros, em forma de leque ou então em forma de fita. Dentre todos, o tendão calcâneo apresenta uma alta incidência de lesões e nesse contexto nos propomos a investigá-lo (KANNUS, 2000).

Dois terços dos atletas com desordens no tendão calcâneo têm suposta causa atribuída às falhas de alinhamento e biomecânica, em particular, a hiperpronação do pé. O tendão calcâneo é o único tendão dos músculos sóleo e gastrocnêmio. Ele, por sua vez, se insere no calcâneo e por isso é denominado também como tendão calcâneo (figura 1). É o maior e mais resistente tendão do corpo humano, responsável pela extensão do pé (COOK, 2002; SHARMA; MAFFULLI, 2006).

Ele é um tendão fundamental na marcha do indivíduo por isso, é frequentemente solicitado. Portanto, quando lesionado, representa uma grande perda no que se refere à necessidade do indivíduo se deslocar para exercer suas atividades habituais. O processo de reparo após a lesão implica em alterações bioquímicas, histológicas e funcionais que demandam semanas e são fundamentais para a recuperação desse tecido.

2.3. FISIOPATOLOGIA DA LESÃO TENDÍNEA

O processo de reparo inicia logo após a ocorrência da lesão no tendão na presença de vários mediadores que chegam ao local especificamente para atuar na reconstituição do tecido, como enzimas, metaloproteinases (MMPs), neurotransmissores, neuropeptídeos, fatores de crescimento entre outros (ABATE *et al*, 2009; ANDERSSON *et al*, 2011; FARCIC, 2011; MORAES *et al*, 2013; RILEY, 2008).

Durante a regeneração do tendão ocorre um intenso crescimento de fibras nervosas entre as fibras colágenas, um dos efeitos desse crescimento culmina na expressão temporal de neuropeptídeos sensoriais, sugerindo que estes têm um papel importante na regulação do reparo e homeostase (BRING, 2007; MURRELL, 2008).

O reparo consiste em três fases consecutivas, porém nos períodos de transição se sobrepõe. São elas: fase inflamatória, proliferativa e de remodelamento (figura 5). Na fase inflamatória (0 a 2 semanas), monócitos e macrófagos se introduzem no local da lesão, e na presença de fagócitos ocorre necrose, há um aumento de permeabilidade vascular e dessa forma liberação de fatores vasoativos e quimiotáticos que, por sua vez, caracterizam a segunda fase, a proliferativa (2 a 4 semanas), apresentando angiogênese, proliferação de tenócitos e recrutamento de mais células inflamatórias. As concentrações de glicosaminoglicanos e conteúdo de água nesse estágio permanecem elevados e ocorre síntese de colágeno tipo III (SHARMA; MAFFULLI, 2006; BRING, 2007; RILEY, 2008).

A fase de remodelamento (4 a 10 semanas) é iniciada com o objetivo de redimensionar e reformular o tecido de cicatrização. Nesse estágio, glicosaminoglicanos são sintetizados, ocorre um decréscimo de celularidade e as células apresentam uma forma mais alongada entre os feixes de colágeno, que por sua vez, encontram organizados no eixo longitudinal do tendão. Uma boa força tensiva será alcançada em um período de quatro meses a um ano porém, acredita-se que a função biomecânica e a morfologia jamais atingirão a capacidade e estrutura de um tendão normal (JOZSA; KANNUS, 1997; SHARMA; MAFFULLI, 2006; BRING, 2007).

A maior problemática da cicatrização desse tecido em relação a outros é que ele não possui uma boa capacidade de reparo devido sua baixa vascularização, oxigenação e nutrição. Todo o processo dura meses e esse grande período gera outro problema, pois geralmente o membro é imobilizado, podendo acarretar inúmeras complicações que

podem retardar o processo de recuperação, a exemplo da diminuição da expressão de receptores de neuropeptídios sensoriais que são reportados por promover a angiogênese e reparo do tecido pela estimulação da proliferação de células endoteliais e fibroblastos (BRING, 2008; FARCIC, 2011).

A exemplo da imobilização, existem ainda inúmeras controvérsias e opiniões a respeito da doença, demonstrando a necessidade de mais estudos que possam elucidar os questionamentos a respeito dos mecanismos de causa e reparo que permeiam a tendinopatia. Possibilitando, dessa forma, subsequentes estudos de tratamentos a fim de proporcionar uma reabilitação rápida e eficiente. (BRING, 2008)

O estudo da tendinopatia em ratos tem sido amplamente utilizado e tem representado um modelo eficaz por mostrar compatibilidades bioquímica, histológica e funcional com o tendão humano. A figura 6 ilustra a estrutura do tendão calcâneo de rato demonstrando a semelhança anatômica com o tendão calcâneo de humanos mostrado na figura 1 (ALFREDSON *et al*, 2003; DAHL, 2007; SCOTT,2007; BRING, 2007; 2008; 2012).

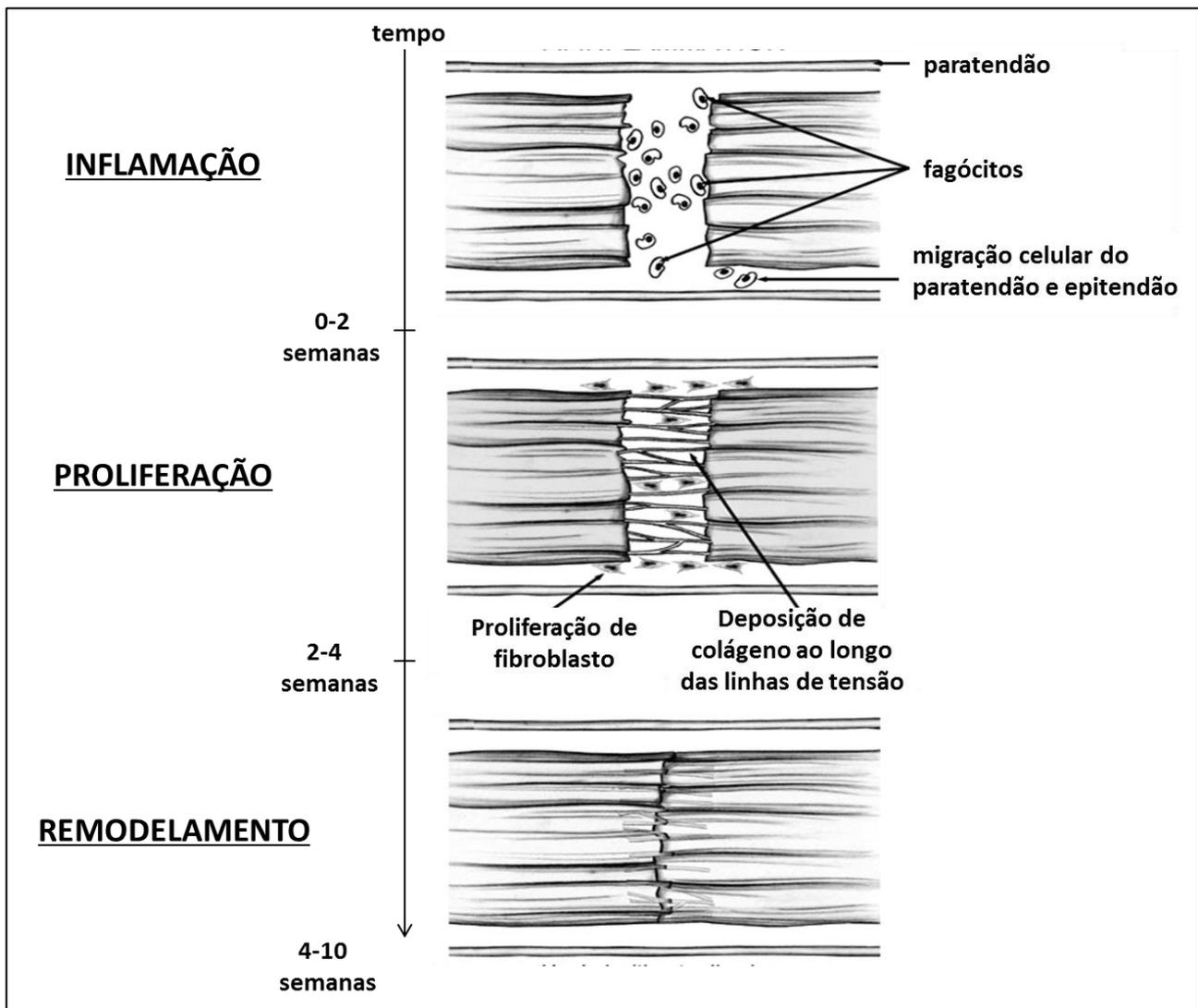


Figura 5: Fases de reparo do tendão. Indicação do período em que ocorre cada fase e algumas características referentes às mesmas. Modificado de www.msdlatinamerica.com acesso em 25 de outubro de 2014.

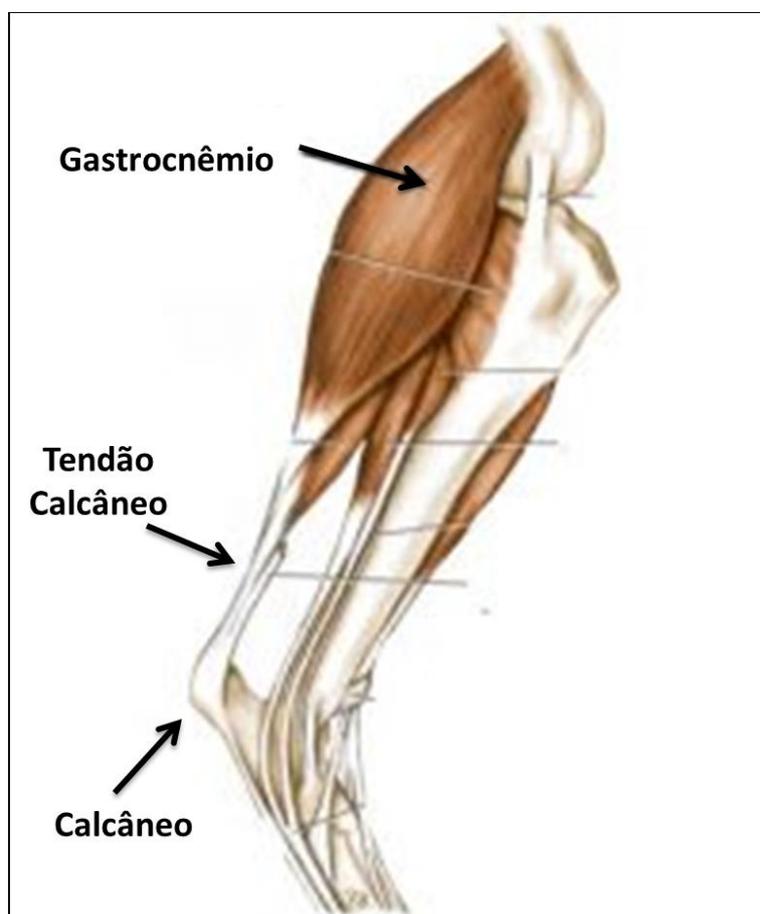


Figura 6: Estrutura anatômica do tendão calcâneo de rato. Fonte: modificado de www.cram.com. acesso em 24 de outubro de 2014.

Os direcionamentos de tais estudos têm se voltado para os processos desencadeados a partir da lesão. Dentre esses processos envolvidos na injúria, o estresse oxidativo, embora represente um fenômeno característico, pouco tem sido investigado ou mesmo considerado como um possível alvo terapêutico das intervenções voltadas para a recuperação do tecido.

2.4 DEFESA ANTIOXIDANTE E AS LESÕES TENDÍNEAS

Na lesão tendínea, poucos estudos têm sido feito referente aos danos causados ao tecido sob a influência das espécies reativas de oxigênio (EROs) e de hidrogênio (ERNs). Nosso grupo de pesquisa foi o primeiro a demonstrar que a inibição nitrérgica local é benéfica para a regeneração do tendão lesionado (MORAES *et al*, 2011). Tal resultado aponta para o fato de que o estresse oxidativo, juntamente com o nitrosilativo, pode ser o ponto central de vulnerabilidade. Os efeitos das EROs e ERNs, são bloqueados fisiologicamente por mecanismos de defesa conhecidos como sistemas antioxidantes, que envolvem enzimas e proteínas não-enzimáticas atuando em diferentes níveis de proteção impedindo a formação ou sequestrando os radicais livres na tentativa de retomar o funcionamento normal do organismo (FERREIRA *et al*, 2007).

De modo geral, esses mecanismos são capazes de interceptar os radicais livres impedindo o ataque sobre lipídeos, aminoácidos, ácidos graxos poliinsaturados e DNA, dessa forma, protegem reparando as lesões (BARREIROS *et al*, 2006).

Eles são divididos em duas classes: o sistema não enzimático, composto principalmente por β -caroteno (pro vitamina A), ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E) e grupamentos sulfidríla (SH); e o sistema enzimático, com a catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPX), glutathiona redutase (GR) e superóxido desmutase (SOD) como as principais enzimas. (POWERS *et al*, 1994; FERREIRA *et al*, 2007).

Os antioxidantes são ainda classificados como endógenos ou exógenos, nos quais, os endógenos podem ter sua expressão aumentada em resposta à própria geração de radicais livres aumentando a síntese de enzimas como a SOD, CAT e GPX (BIANCHI *et al*, 1999).

Os antioxidantes exógenos podem ser obtido na dieta como as vitaminas C, E e A, os flavonóides e carotenóides encontrados nos alimentos naturais ou mesmo em sintéticos empregados nas indústrias de alimentos, bebidas e também na medicina sendo, importantes na interceptação dos radicais livres (SIES; STAHL, 1995; BIANCHI *et al*, 1999).

Deste modo, a intervenção com moléculas que atuam tanto na síntese de colágeno quanto como antioxidantes representam importantes candidatos como estratégia terapêutica farmacológica local para recuperação tendínea. Tais propriedades podem ser atribuídas ao ácido ascórbico.

2.5 O ÁCIDO ASCÓRBICO

A vitamina C (ácido ascórbico) é um micronutriente essencial usado como um co-fator de inúmeras enzimas biossintéticas. Geralmente é consumida em grandes doses pelos seres humanos, através de produtos naturais, é absorvida de forma rápida e eficiente por um processo dependente de energia. O consumo de doses altas pode levar ao aumento da concentração dessa vitamina nos tecidos e no plasma sanguíneo (BIANCHI *et al*, 1999; CHEN *et al*, 2008).

Ensaio biológicos com animais que sofreram intervenções terapêuticas demonstraram os benefícios do ácido ascórbico (AA) devido seu efeito protetor contra os danos causados pela exposição às radiações e medicamentos (AMARA-MOKRANE *et al*, 1996; BIANCHI, 1999; CHEN, 2008).

Estudos recentes mostraram diversas funções do AA, além daquelas já descritas nos processos de cicatrização de feridas. Ele atua como antioxidante, sendo capaz de captar o oxigênio livre decorrente do metabolismo celular, fenômeno que causaria dano celular. É provável que o ácido ascórbico também esteja envolvido na manutenção da integridade intracelular, em respostas imunológicas (DEL-RIO, 1996).

O ácido ascórbico tem sido utilizado para reduzir os índices oxidativos após isquemia/reperfusão. Paradoxalmente, também tem sido associado com efeitos pró-oxidante, e é conhecido pela sua capacidade de reduzir metais a formas que reagem com o oxigênio para formar iniciadores da peroxidação lipídica. In vitro, Sakagami *et al*

(1997) mostraram que o AA induziu a morte celular de uma série de linhagens de células (PARK *et al*, 2008)

No tecido tendíneo, Omeroglu (2009) demonstrou que a suplementação parenteral de altas doses de ácido ascórbico (150mg), aplicada uma vez a cada dois dias, acelerou a cicatrização do tendão calcâneo de ratos saudáveis. Esse resultado foi atribuído ao aumento da angiogênese na fase inicial e da síntese de colágeno tipo I durante todo o processo de reparação, no entanto, mais parâmetros são necessários para elucidar o efeito do ácido ascórbico no tendão a exemplo da organização tecidual e parâmetros funcionais do tratamento.

Um estudo realizado por Chen (2008) abordou a respeito da quantidade de ácido ascórbico absorvida pelo organismo de acordo com as vias de administração, e os resultados apontaram que, se administrado via oral os níveis de concentração no plasma e tecido são menores que 0,2mM, diferente da via parenteral que concentrou níveis maiores que 0,2mM. As concentrações plasmáticas máximas de ácido ascórbico se aproximou de 30mM em humanos, semelhantes às concentrações observadas em camundongos que receberam ácido ascórbico parenteral

De modo geral, as pesquisas indicam um papel importante do ácido ascórbico na síntese do colágeno e especificamente na tendinopatia, entretanto, mais pesquisas são necessárias sobre estes tratamentos, a fim de fortalecer a base de evidências e determinar um tratamento eficaz. De fato, a prevenção é o melhor caminho, com treinamento adequado e atenção aos fatores que podem reduzir a incidência da lesão. Entretanto, já ocorrida a lesão o ponto de partida é a análise minuciosa da causa da lesão para que não corra o risco de uma nova lesão (REES, 2009)

Tratamentos como anti-inflamatórios, injeções de corticosteroides, ultrassom e laser terapêutico, técnicas de terapia manual, e alguns tratamentos emergentes como treinos excêntricos, terapias por onda de choque extracorpórea, e injeções de heparina, dextrose, apotrinina, glicosaminoglicanos polissulfato e injeção de células autólogas compõe a vasta gama de tratamentos atualmente em uso para o tratamento da tendinopatia (REES, 2006; 2009).

As pesquisas sustentam a afirmativa de que o tendão uma vez lesionado, jamais retorna ao seu estado normal, mesmo após a aplicação dos tratamentos, no entanto, ainda há muito que se compreender a respeito dos mecanismos fisiológicos que mediam a tendinopatia. Em consequência, novas estratégias são necessárias na elaboração das

intervenções de tratamento (MOS *et al*, 2007; RILEY, 2008; LONGO; MAFFULLI, 2009).

Diante do exposto, o presente trabalho propõe a investigação da tendinopatia a partir dos efeitos do estresse oxidativo, sugerindo tratamento com antioxidante ácido ascórbico frente à hipótese de que o mesmo poderia contribuir positivamente para o reparo da lesão tendínea.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do tratamento local com ácido ascórbico no reparo tecidual e funcional em modelo de lesão total de tendão calcâneo de ratos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito do tratamento com ácido ascórbico na organização tecidual em 14 e 21 dias após ruptura total do tendão calcâneo
- Analisar a orientação das fibras colágenas padrão e de reparo do tecido tendíneo tratado com AA, no 14º e 21º dia pós-injúria.
- Caracterizar o padrão do número de células no tendão sadio e após 14 e 21 dias de lesão, pela contagem das células (tenócitos).
- Verificar o efeito do tratamento com ácido ascórbico no desempenho funcional da marcha dos animais em 7, 14 e 21 dias pós-lesão.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados 18 ratos jovem adultos da linhagem *Wistar* (*Rattus norvegicus albinus*), com massa corporal na faixa de 213 ± 20 g provenientes do biotério central pertencente ao Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará (ICB-UFPA). Os animais permaneceram em gaiolas de polipropileno padrão, mantidas em ambiente controlado com ciclo claro/escuro de 12 horas, além de receberem água e ração *ad libitum*. Este projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa com animais de experimentação da UFPA (CEPAE-UFPA) sob o parecer 161-13.

4.2 CIRURGIA

Os animais foram anestesiados com ketamina 10% (80mg/kg) e cloridrato de xilazina a 2% (12mg/kg) com aplicação intraperitoneal. A pele sobre a região dorsal da tíbia do membro posterior direito foi tricotomizada manualmente.

Posteriormente à assepsia local, realizou-se uma incisão longitudinal de cerca de 0,5 cm na pele acima da inserção calcânea para ter acesso ao tendão do tríceps sural e isolá-lo. Após a dissecação foi realizada a sutura de Kessler (MURRELL *et al*, 1992), ocorrida antes da ruptura devido ao diminuto tamanho do tendão. Em seguida, o mesmo foi seccionado totalmente por cisalhamento transversal. Posteriormente, o tendão e a pele foram suturados com fio de poliamida monofilamento não absorvível número 4.0, e submetida novamente à assepsia local.

Após a lesão não houve nenhuma restrição ou imobilização do segmento, apenas higienização diária com solução fisiológica até a cicatrização da pele.

4.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Esta pesquisa propôs três grupos experimentais; o primeiro foi constituído de animais considerados sadios (controle; n=6). O segundo grupo foi submetido à ruptura e recebeu solução salina 0,9% (veículo; n=6). O terceiro foi sujeito à lesão experimental e recebeu tratamento *in loco* com o ácido ascórbico (Sigma-Aldrich, São Paulo, BRA) diluído para concentração de 30mM em solução salina (ácido ascórbico, n=6).

O volume de 40µl de cada solução foi administrado na região peritendínea com uma seringa calibre 26G a cada dois dias a partir do 2º dia pós-lesão, estendendo-se até o 11º ou 20º dia. No 14º ou 21º dia, os ratos foram sedados e mortos por guilhotina.

Os animais foram avaliados quanto ao ganho de massa corporal e padrão de marcha, enquanto as amostras de tendão foram pesadas e usadas para análise histológica. Ressaltamos que a pesagem ocorreu uma vez por semana até o dia do sacrifício para posterior análise comparativa com o grupo controle. O tendão contralateral desses animais foi utilizado para controle.

4.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA

4.4.1 Cortes histológicos

Os tendões destinados ao corte em criostato foram fixados em paraformaldeído 4% por 12 horas e em seguida lavados em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4, por 3 vezes consecutivas de 5 minutos cada. As amostras foram armazenadas e mantidas em tampão fosfato a 4°C. Antes da execução dos cortes, o tecido passou por processo de crioproteção em soluções crescentes de sacarose (10%, 20% e 30%) em temperatura ambiente e depois mantidos na solução a 30% até o momento da criomicrotomia.

Após a crioproteção, o material foi embebido em Tissue Tek® (Sakura Finetek, Inc., Califórnia, USA) para ser cortado em 20 µm de espessura com orientação longitudinal em criostato (Leica, CM3050 S) ajustado para -24°C.

Os cortes foram transferidos para lâminas histológicas previamente gelatinizadas. As lâminas, com no máximo 6 cortes, foram criteriosamente organizadas e numeradas, sendo mantidas congeladas a -20°C em caixas até o momento do uso.

4.4.2 Coloração com hematoxilina e eosina

Para avaliar a organização tecidual, utilizamos a técnica de coloração por hematoxilina e eosina. Para essa coloração as lâminas foram inicialmente imersas em água destilada mantendo-as por 5 minutos. Após esse período, as lâminas foram imersas em hematoxilina de Harris por 30 segundos e lavadas em água destilada corrente posteriormente.

Em seguida, as lâminas foram imersas em eosina por mais 30 segundos e então lavadas em água destilada em água destilada corrente. Após esse último passo, as lâminas foram imersas em álcool 70% e por fim montadas em Permount®(Fisher Scientific, New Jersey, USA).

Um microscópio de luz (Nikon, Eclipse E800 Yokohama, Japan) com câmera digital (Nikon, DXM 1200, Japan) acoplada foi usado para análise histológica e captura de imagens, as quais foram armazenadas para posterior análise semi-quantitativa e qualitativa.

4.4.3 Autofluorescência do colágeno

Para avaliar a progressão da cicatrização, três cortes longitudinais foram coletados e organizados em secções referentes às porções ventral, proximal e distal do tendão para em seguida serem analisadas em microscópio de fluorescência (Nikon, Eclipse E800 Yokohama, Japan)

As lâminas possibilitam identificar a organização do colágeno no tecido por duas principais referências, a orientação das células no eixo do tendão e a própria organização em paralelo das fibras colágenas pela autofluorescência do colágeno

utilizando o filtro de barreira 420/530 para fluorescência verde. Para uma melhor diferenciação as secções foram coradas com eosina por 30 segundos. Desse modo, três fotomicrografias de cada região (proximal, medial e distal) foram sistematicamente capturadas através de câmera digital acoplada ao microscópio, utilizando objetiva de 20x e expressas convencionalmente em micrometros.

4.4.4 Contagem de células

A análise do tecido consistiu no uso de secções obtidas pelo criostato, como mencionado acima, as quais foram lavadas em água destilada por 5 minutos, permeabilizadas em temperatura ambiente com Triton X-100 0,1% por 10 minutos e tratadas com DAPI (1:10.000) por 1 minuto e meio para marcação do núcleo. A seguir, as secções foram lavadas 3 vezes com água destilada para posteriormente serem montadas com N-propilgalato.

Um microscópio de fluorescência (Nikon, Eclipse E800 Yokohama, Japan) foi usado para análise da ocorrência da marcação, com excitação de luz ultravioleta(358nm), detectado através de um filtro azul/ciano. Três áreas randômicas de cada corte de modo independente, no total de três cortes de cada animal, foram avaliadas por fotomicrografias, utilizando objetiva de 20x, obtidas através de um sistema de câmera digital para posterior análise duplo-cego com auxílio do programa Image J®.

4.5 AVALIAÇÃO DO ÍNDICE FUNCIONAL DE AQUILES (IFA)

O teste funcional realizado foi o Índice Funcional de Aquiles (IFA), proposto por Murrel *et al* (1992). Esse teste foi conduzido em todos os animais no período pré-operatório, assim como na fase pós-operatória em 7, 14 e 21 dias.

Os animais foram testados em uma passarela de 10 cm de largura por 60 cm de comprimento forrado com um papel branco. Depois de terem suas patas traseiras pintadas com tinta atóxica, os animais foram colocados no aparato para caminhar em

linha reta, deixando no papel as pegadas impressas. Este foi codificado pelo número do animal e estocado para digitalização e mensuração por um único avaliador com auxílio do programa Image J®. As medidas foram tomadas a partir da segunda passada de marcha do animal e o índice calculado de acordo com a equação:

$$\mathbf{IFA = 74(PLF) + 161(TSF) + 48(ITF) - 5.}$$

Conforme os elementos da equação, o máximo comprimento da pegada é definido como o fator de comprimento da pegada (PLF), e obtido por $PLF_{\text{esquerda}} - PLF_{\text{direita}} / PLF_{\text{direita}}$. A distância entre o primeiro e o quinto dedo é chamado de fator de espalhamento dos dedos do pé (TSF), e obtido por $TSF_{\text{direita}} - TSF_{\text{esquerda}} / TSF_{\text{esquerda}}$ e a distância entre o segundo e o quarto dedo é o fator teste intermediário (ITF), calculado por $ITF_{\text{direita}} - ITF_{\text{esquerda}} / ITF_{\text{esquerda}}$. Esses fatores, previamente obtidos foram calculados e usados para a equação do IFA.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O programa estatístico usado na avaliação destes experimentos foi o BioEstat 5.0, onde os dados foram analisados utilizando o teste de análise de variância (ANOVA) de um critério, seguida pelo teste tukey para comparações múltiplas. Os valores de $p < 0,05$ serão considerados significativos. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão.

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DO NÚMERO DE CÉLULAS NO TENDÃO CALCÂNEO DE RATOS

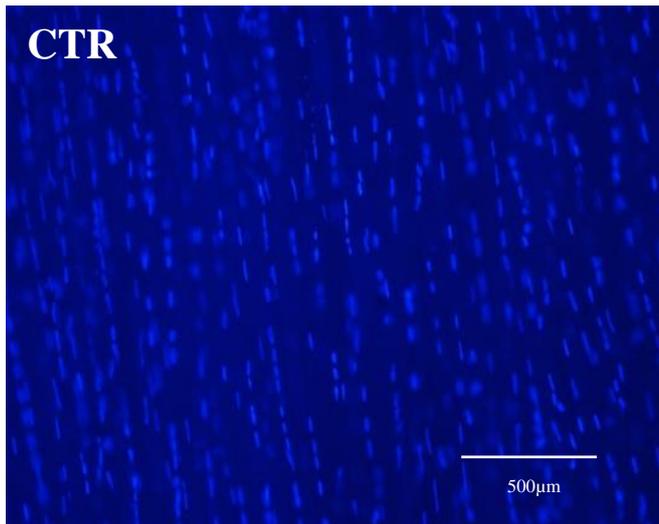
O modelo de lesão tendínea e o tratamento com ácido ascórbico não alteraram o ganho de massa corpórea (dados não mostrados).

Com o intuito de investigar se o tratamento com ácido ascórbico influencia na fase de proliferação celular no processo de reparo do tendão, analisamos a quantidade de células por campo do tecido tendíneo nos dias 14 e 21 após a lesão (Figura 7).

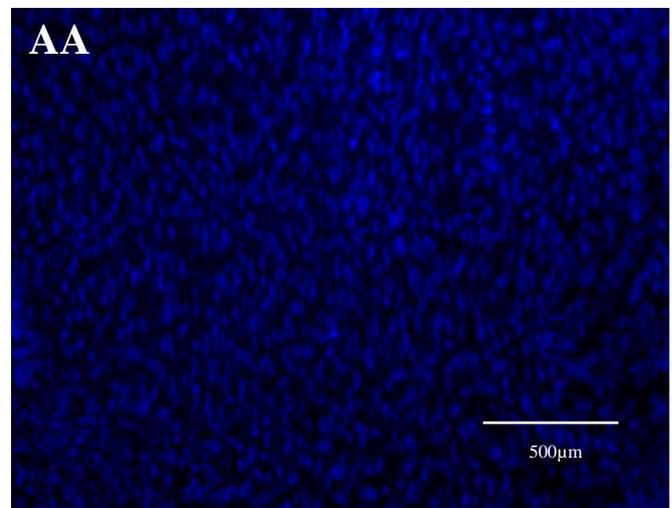
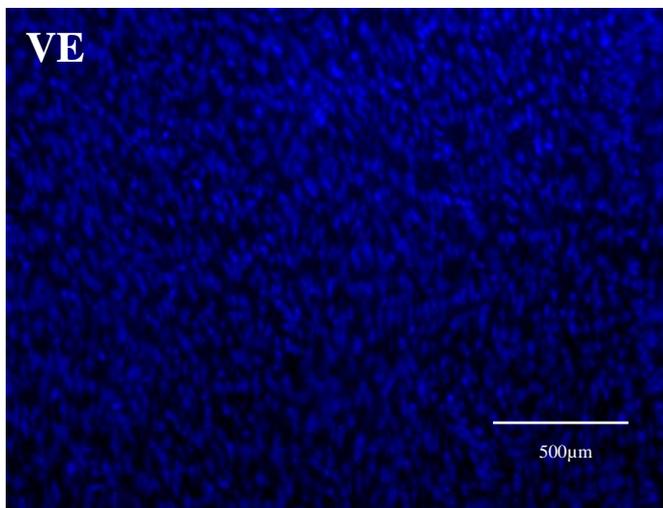
As análises feitas no 14º dia após a lesão apresentou diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle ($292 \pm 37,8$, $p < 0,01$) em relação os grupos tratados com ácido ascórbico ($1290 \pm 29,6$) e solução salina ($1315,3 \pm 57,0$) demonstram um processo comum a essa lesão, o aumento da densidade celular. No entanto, a quantidade de células comparada entre os grupos AA e VE não demonstraram diferenças significativas.

No 21º pós-lesão dia o número de células do grupo VE ($916,6 \pm 30,4$) e AA ($762,8 \pm 30,0$), mantiveram-se maior que no grupo controle ($292 \pm 37,8$), porém a comparação entre eles apresentaram diferenças valores estatisticamente significativos ($p < 0,01$).

Por fim, estes resultados indicam que em 21 dias após a lesão tendínea o número de células tende a ser menor quando administrado ácido ascórbico no local (Figura 8).



14 DIAS



21 DIAS

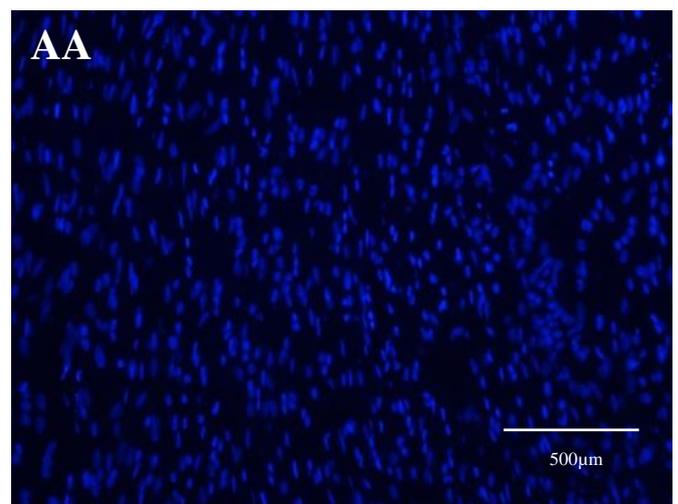
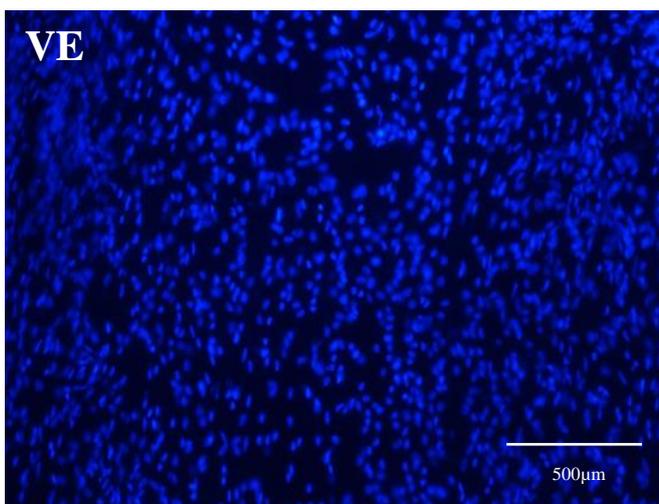


Figura7 – Efeito do tratamento com AA na número de células em 14 e 21 dias pós-lesão. Grupo controle (CTR), ácido ascórbico (30 mM) (AA) e veículo (Salina 0,9%) (VE). Marcação em DAPI. Objetiva de 20x, barra da escala 500µm, n= 3.

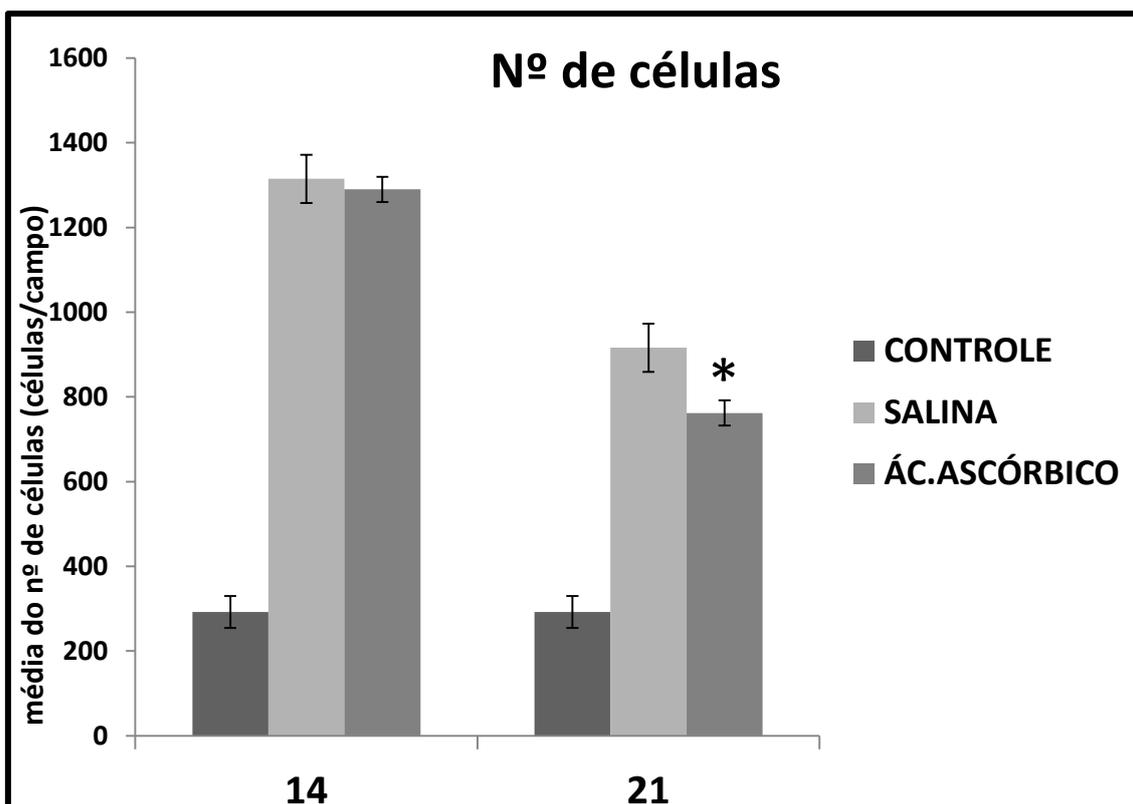
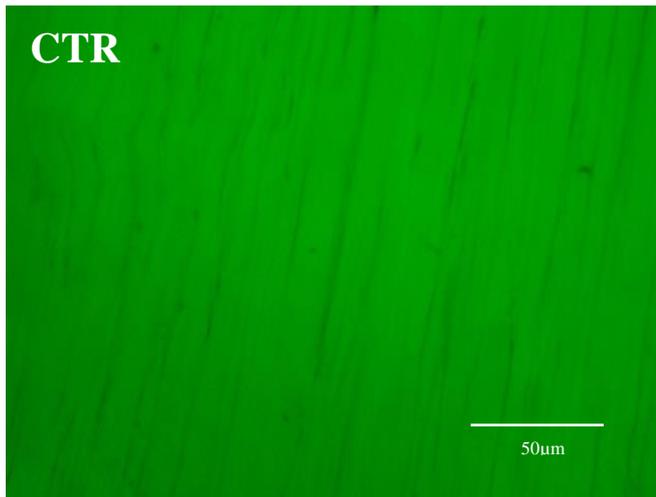


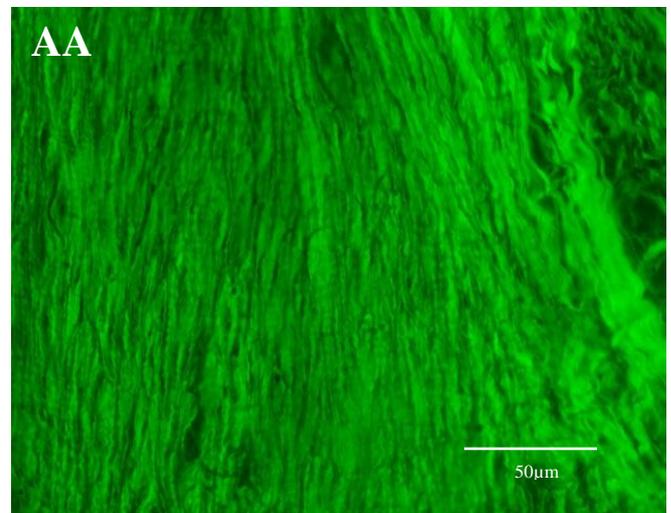
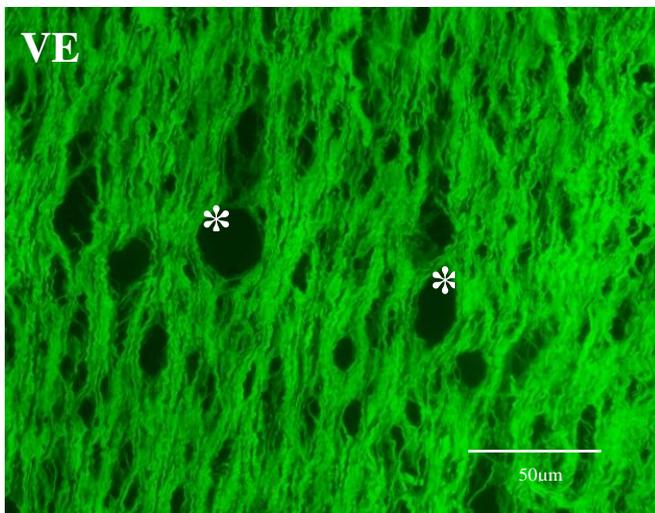
Figura 8 – Papel do tratamento com AA no número de células por campo nos dias 14 e 21 pós lesão. Os valores mostram Média \pm SEM, n=3 (ANOVA-Tukey. * p< 0,01 vs Salina).

5.2 EFEITO DO TRATAMENTO COM ÁCIDO ASCÓRBICO NA ORGANIZAÇÃO TECIDUAL APÓS A LESÃO

Com o intuito de avaliar se o tratamento com ácido ascórbico influenciava na estrutura e organização tecidual após 14 e 21 dias de lesão, avaliamos sob microscopia de fluorescência os cortes histológicos pela autofluorescência do colágeno e em microscopia de luz por marcação com HE. Os resultados demonstrados na figura 9 apontam que o grupo tratado com AA no dia 14 apresenta a matriz mais preservada em relação ao grupo veículo que demonstra bastante perda de matriz; no 21º dia ambos os grupos tendem a melhorar sua estrutura, no entanto o grupo AA demonstra melhor regeneração da matriz extracelular. As marcações com HE (figura 10) revelam que o grupo tratado com AA é constituído por um tecido com maior densidade celular em relação ao grupo controle (CTR), tal qual o grupo veículo (VE), porém notamos que, a organização tecidual tende a melhorar de 14 para 21 dias em ambos os grupos lesionados, no entanto se diferem na estrutura dos núcleos de modo que se observam mais células organizadas no grupo AA do que no grupo VE, além de núcleos mais alongados, diferindo do grupo veículo que demonstram núcleos mais arredondados.



14 DIAS



21 DIAS

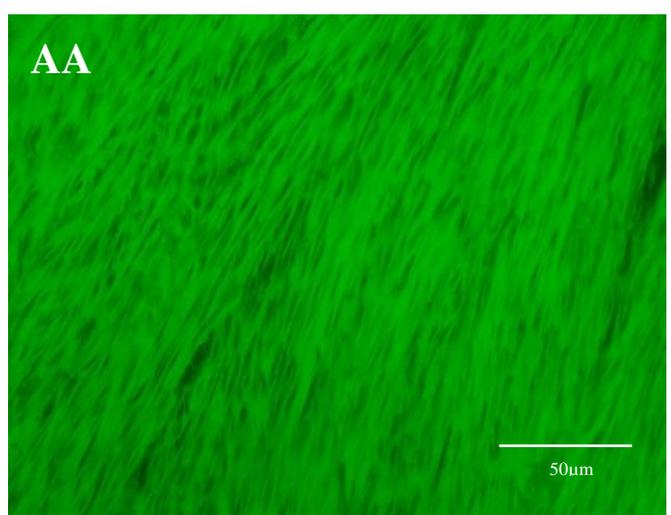
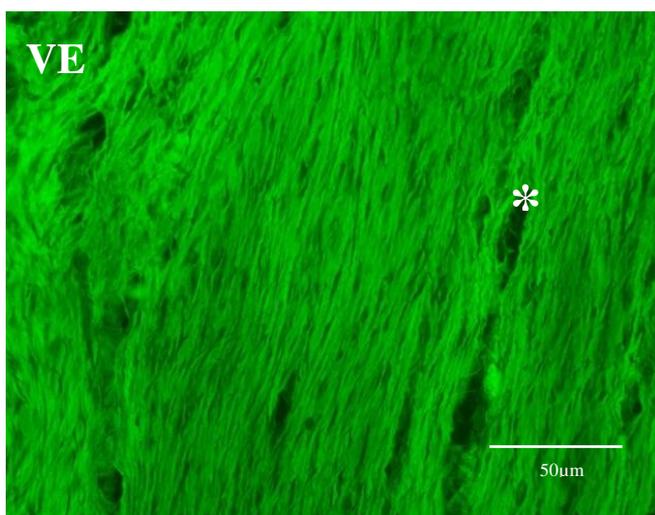
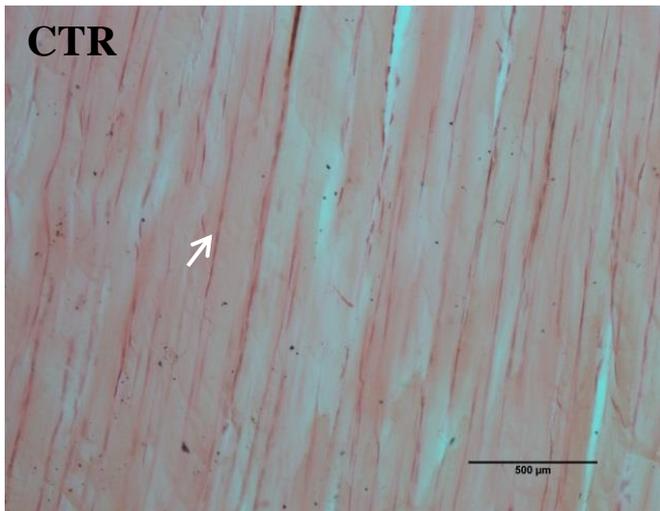
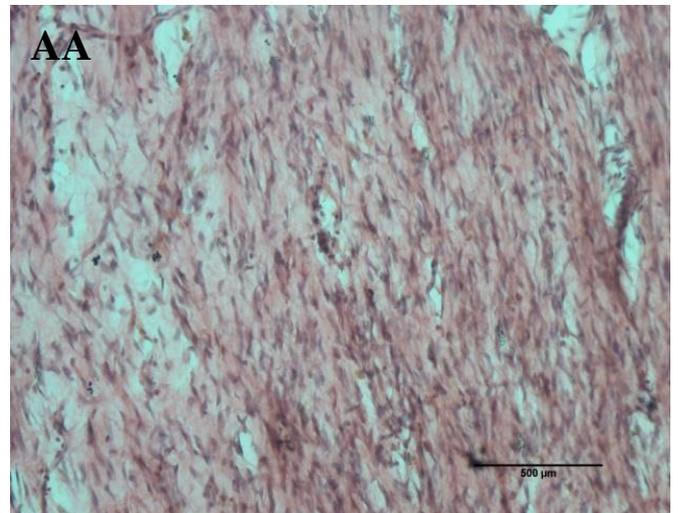
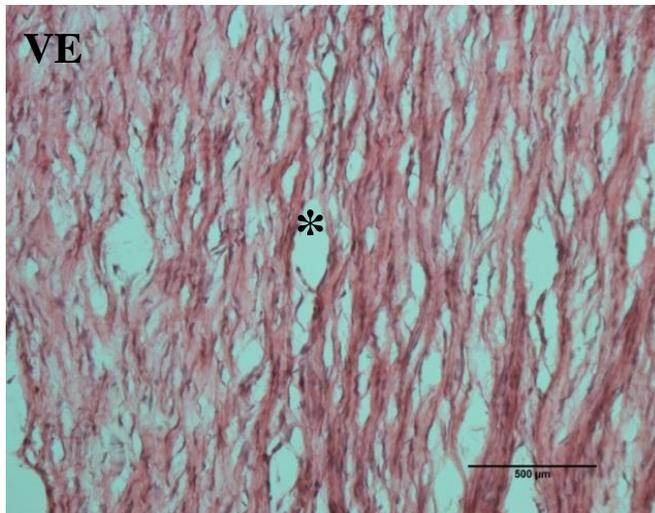


Figura 9 - Papel do AA na estrutura do colágeno em 14 dias e 21 dias pós-lesão. Grupo controle (CTR), ácido ascórbico (30 mM) (AA) e veículo (Salina 0,9%) (VE). Autofluorescência do colágeno em verde. Objetiva de 40x, barra da escala 50µm, n= 3. Asteriscos indicam perda de matriz colágena. Coloração acinzentada nas imagens de autofluorescência indica a densidade celular.



14 DIAS



21 DIAS

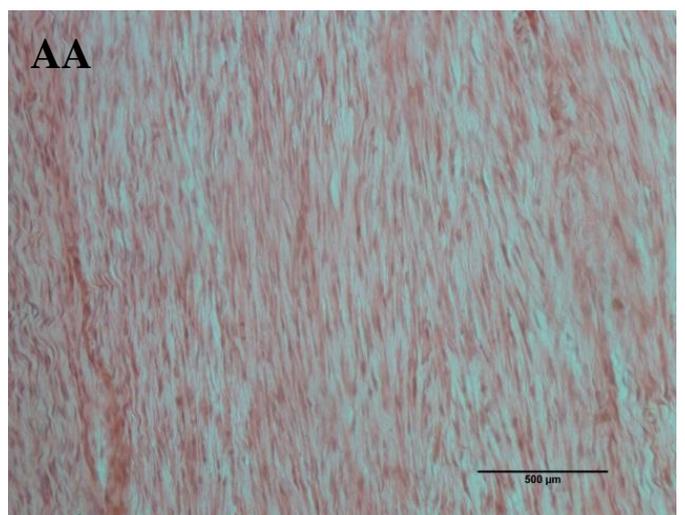
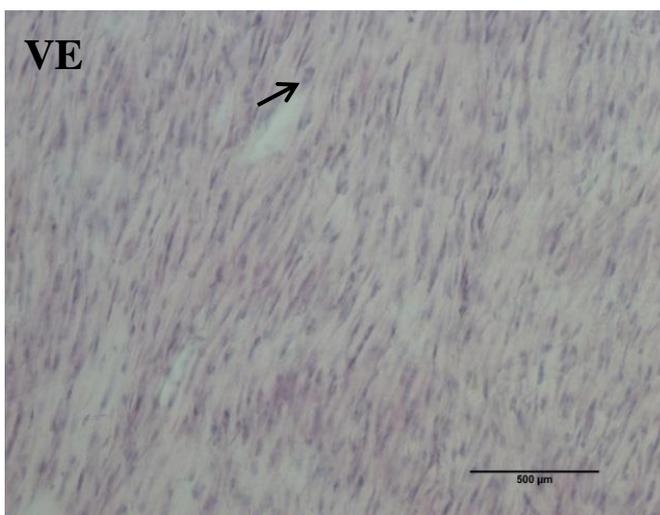


Figura10 – Efeito do tratamento com AA na organização tecidual em 14 e 21 dias pós-lesão. Grupo controle (CTR), ácido ascórbico (30 mM) (AA) e veículo (Salina 0,9%) (VE). Marcação em HE. Objetiva de 20x, barra da escala 500μm, n= 3. Asteriscos indicam perda de matriz extracelular. Seta branca indica a orientação das células e seu formato fusiforme. Seta preta indica células arredondadas.

5.3 ANÁLISE DO ÍNDICE FUNCIONAL DE AQUILES DE RATOS TRATADOS COM ÁCIDO ASCÓRBICO.

Para avaliar se o tratamento com ácido ascórbico influenciou no desempenho funcional da pata posterior após lesão do tendão calcâneo, utilizamos o índice funcional de Aquiles (IFA). A avaliação da resposta funcional permite inferir a efetividade prática da recuperação do tendão lesionado. Primeiramente, o índice funcional de Aquiles padrão foi obtido do grupo controle, avaliado paralelamente aos animais experimentais. Desse modo, os valores encontrado para esse grupo não apresentaram diferença estatística entre os dias zero (-3.59 ± 11.47), 7 (-2.70 ± 12.49), 14 (-3.61 ± 10.46) e 21 (1.68 ± 11.87 ; $p=0,8213$). Para os grupos veículo (2.41 ± 22.3) e ácido ascórbico (-8.07 ± 19.8) o IFA referente ao dia zero foi similar ao grupo controle, não havendo diferença entre os grupos ($p=0,9872$).

Quando a análise foi feita para o 7º dia após a lesão, observamos significativa redução do valor do índice para VE (-89.22 ± 23.93) e AA (-65.49 ± 16.54) quando referidos ao controle (-2.70 ± 12.49 , $p < 0,01$).

Na avaliação funcional do 14º dia ainda é notável a diferença dos grupos VE (-74.22 ± 11.94) e AA (-44.24 ± 10.72) em relação ao grupo controle (-3.61 ± 10.46 , $p < 0,01$). No entanto, nessa fase, o grupo AA apresentou uma melhora significativa em relação ao grupo VE ($p < 0,05$).

No 21º dia o desempenho funcional do grupo VE (-41.04 ± 13.42) e AA (-31.19 ± 17.67), mantiveram-se abaixo do controle (-1.68 ± 11.87 , $p < 0,01$) apesar de assumirem valores do IFA mais positivos em relação ao dia 14.

De modo geral isso indica que, os animais cujo antioxidante foi administrado a recuperação mostrou-se precoce (dia 14) em 21 dias o padrão de marcha estava ainda insatisfatório no grupo veículo, enquanto que, nos animais cujo antioxidante foi administrado a recuperação mostrou-se precoce (dia 14) (figura 11).

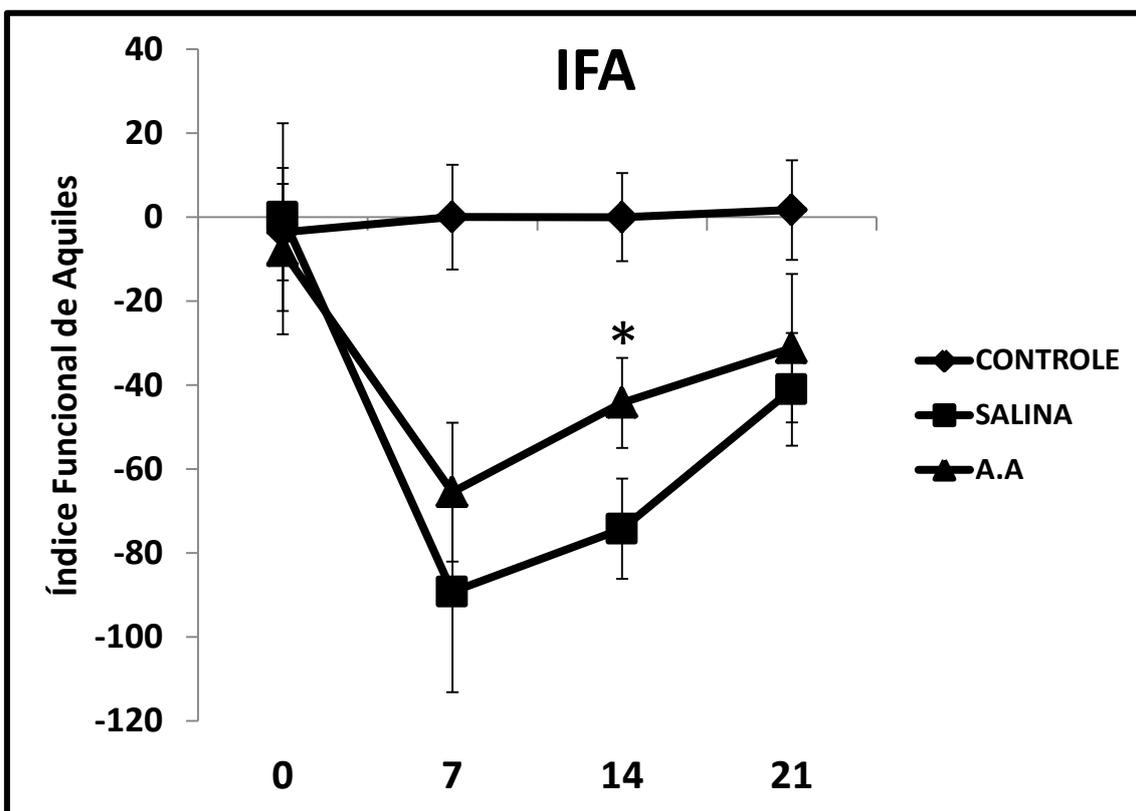


Figura 11 - Papel do AA na recuperação funcional da marcha. O índice funcional de Aquiles foi avaliado em animais controle ou com ruptura do tendão e posterior tratamento com ácido ascórbico (30 mM) e com veículo (Salina 0,9%). As análises foram feitas em 7, 14 e 21 dias após a lesão. Os dados indicam que o tratamento com AA gerou progressiva melhora funcional comparado aos demais grupos. Os valores são expressos em média \pm DP, n=6 (ANOVA-Tukey. * $p < 0,05$ vs veículo).

6 DISCUSSÃO

Embora poucos estudos tenham abordado a influência do estresse oxidativo nos processos de reparo em lesões tendíneas, estudos revelam que a ação das espécies reativas de oxigênio (EROs) representam um importante evento associado à lesão, (MEIER *et al*, 1999, LEWIS, SANDFORD, 2009; LIN *et al*, 2001).

No presente estudo, procuramos avaliar o uso do antioxidante ácido ascórbico (AA) como possível tratamento no combate aos danos causados pelo estresse oxidativo associado à ruptura total do tecido visto que reconhecidamente, este composto apresenta tanto atividade antioxidante quanto participa ativamente da síntese do colágeno (MURAD, 1981; SHELDON, 1985; ENGLARD, SEIFTER, 1986; CANTY, KADLER, 2002; DU *et al*, 2012).

Na literatura poucos estudos utilizam o tratamento com AA *in vivo* para tratamento de lesão em tendão. De fato, um único estudo realizado por Omeroglu *et al* (2009) mostrou que o uso sistêmico de altas doses de AA podem acelerar o processo de reparo do tendão calcâneo de ratos, contudo, também é bem descrito na literatura que a utilização de altas doses de AA pode resultar em um ação pró-oxidante o que limitaria o seu uso em tratamentos sistêmicos. Destacamos diversos trabalhos que mostram que a ingestão de altas doses pode causar distúrbios do trato alimentar (náuseas, azia e diarreia) (TEMPLE *et al*, 2004; BLOCK *et al*, 2008). Além disso, pode atuar paradoxalmente como pró-oxidante, reduzindo metais que reagem com oxigênio formando iniciadores de peroxidação lipídica (PRAT; TURRENS, 1990).

Análises de dosagem e de biodistribuição do ácido ascórbico em roedores mostram que a administração oral de ácido ascórbico produz concentrações que não excedem 0,2mM no plasma e fluidos extracelulares. Portanto, concentrações farmacológicas de ácido ascórbico maiores que 0,2mM em fluidos corporais podem ser alcançadas somente por rotas parenteral (i.v., i.p.) (PADAYATTY *et al*, 2004).

No entanto, dados consistentes sustentam a hipótese de que as concentrações farmacológicas de ácido ascórbico administrado por via intravenosa ou intraperitoneal servem como um pró-fármaco para a entrega seletiva de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) para o espaço extracelular, sugerindo então seu uso no tratamento de células cancerígenas, uma vez que, por ser uma espécie reativa de oxigênio poderá causar danos diretos ao DNA e mitocôndrias ou então morte celular pela diminuição de ATP (PADAYATTY *et al*, 2004; CHEN *et al*, 2007; DU *et al*, 2012).

Chen *et al* (2008) investigaram dados farmacocinéticos em seres humanos que receberam doses crescentes de ácido ascórbico via intravenosa como parte de um protocolo de tratamento exploratória. As concentrações plasmáticas máximas de ácido ascórbico aproximaram de 30 mM, semelhantes às concentrações observadas em ratos que receberam ácido ascórbico parentérica.

Dentro desse contexto, torna-se justificável a administração local, garantindo a concentração desejada (30 mM) no local da lesão evitando possíveis danos celulares em outras regiões sistêmicas à lesão.

Mostramos em nosso trabalho que o tratamento com AA acelerou o processo de reorganização da matriz colágena. No 14º dia pós-ruptura as fibras já tendem à organização nos animais tratados com AA. Esse mesmo período ainda corresponde a fase de proliferação. Podemos corroborar esse fato também ao observar o grupo não tratado, onde ainda há bastante desorganização. Em 21 dias após a injúria, o quadro visto no grupo que recebeu tratamento com AA é de um tecido mais organizado, cujas células apresentam característica mais fusiforme em relação ao grupo veículo (fig.10/dia 21-VE e AA).

Estudo prévio demonstrou melhor padrão de organização tecidual em 21 dias semelhante aos obtidos neste trabalho, por meio da inibição nitrérgica (MORAES *et al*, 2013). Dessa forma, concluímos que o efeito do tratamento com AA acelera o processo de organização das fibras de colágeno após lesão do tendão calcâneo de ratos. De fato, nossos dados estão de acordo com os resultados da literatura que mostram a importância do AA como um cofator enzimático essencial para síntese de colágeno (MURRAD, 1981; SHELDON, 1985). Da mesma forma que a reconhecida participação nitrérgica cuja ação local parece estar associada ao bloqueio da síntese de colágeno, pode também representar um alvo do tratamento local com AA.

Juntamente com a desorganização das fibras de colágeno, há um decréscimo do conteúdo de colágeno após a injúria (RILEY *et al*, 1994; BANK *et al*, 1999). Em nossos resultados podemos observar pelas imagens da autofluorescência do colágeno essa perda de matriz colágena em determinadas regiões no tecido tendíneo (fig.9/14 e 21dias-VE). Esse processo de degeneração ocorre pela ativação e aumento na expressão de MMPs no tecido, bem como desequilíbrio com os inibidores de metaloproteases, comum a esse tipo de processo patológico. A colagenase I (MMP-1) é uma das poucas enzimas capazes de clivar as fibras de colágeno tipo 1, representa parte do processo de

remodelagem tecidual (NAGASSE, WOESSNER, 1999; RILEY *et al*, 2002; PERCHES *et al*, 2012).

Estudos referente à degeneração de tendão investigaram o efeito do estresse oxidativo a partir da supressão de antioxidantes enzimáticos GSHPx, Catalase (RADAK *et al*, 2002) e SOD (MORIKAWA *et al*, 2014) e concluíram que a degeneração do tendão pode ocorrer em resposta ao estresse oxidativo intracelular. Logo, o uso de antioxidantes no processo de reparo de lesão tendínea, apesar de pouco estudado, reúne dados que já sugerem efeitos positivos quanto à inibição dos danos oxidativos (SIMONIN *et al*, 2000; LEWIS, SANDFORD, 2009; PARK *et al*, 2010; KIM *et al*, 2014).

Em nosso trabalho observamos que o tendão que sofreu ruptura e foi tratado com ácido ascórbico apresentou fibras de colágeno mais íntegra nos dias 14 e 21 em relação ao grupo que recebeu apenas solução veículo, que por sua vez, mesmo 21 dias após a lesão não apresentou uma melhora satisfatória que pudesse ser comparada a boa recuperação vista em 14 dias do grupo tratado (figura 9).

Semelhante as condições de reparo visto em nossos trabalho, Lima *et al* (2009) mostrou o efeito cicatrizante de AA na pele de ratos em 14 dias após lesão, sugerindo que o tratamento promove ambiente e condições favoráveis para a reparação tecidual abreviando o tempo de cicatrização. O ácido ascórbico é um co-fator de lisil e prolil hidroxilase, duas enzimas essenciais na biosíntese de colágeno, o que pode justificar a melhor integridade do tecido tendíneo visto em nossos resultados

O aumento na síntese de colágeno visto em nossos resultados reproduz *in vivo* o que foi demonstrado *in vitro* por Russell e Manske (1991), onde a adição de ácido ascórbico no meio de cultura a cada 48h pelo período de 1, 2 ou 3 semanas manteve de forma otimizada a cultura de tendão flexor profundo de coelhos, e a partir dos resultados foi sugerido que níveis de ácido ascórbico em excesso são necessários para otimizar a manutenção da cultura de tendão. Logo, a adição de AA no local da lesão feita em nossa pesquisa de forma constante (a cada 48h), semelhante à administração feita em cultura de células, pode ter beneficiado o processo de síntese de colágeno.

Um aumento significativo do número de células após a lesão é visto em nosso trabalho em 14 dias após a injúria (figura 7 e 8) e corrobora com a literatura que define a fase proliferativa como parte do processo de reparo, ocorrendo por volta da segunda semana (SHARMA; MAFFULLI, 2006; BRING, 2007; RILEY, 2008). Este fenômeno é esperado, pois as células são responsáveis pela síntese de moléculas da matriz

extracelular, entre elas o colágeno, fundamental para a reconstrução do tecido. Sendo assim, faz-se necessário maior número de células, para que consequentemente ocorra mais síntese (O'BRIEN, 1997; COOK *et al*, 2002; FRANCHI *et al*, 2007).

Os dados comparativos da quantidade de células não apresentaram diferença estatística no 14º dia após a lesão (figura 8). Em análise paralela as fotomicrografias obtidas (figura 9) sugerimos que, nesse período, ambos os grupos necessitam de síntese intensa de colágeno em resposta a degradação da matriz, observada em ambos os grupos, logo, um maior número de células é necessário para essa demanda de reconstituição da matriz colágena.

No dia 21 após a injúria o grupo tratado com AA apresentou um menor número de células marcadas quando comparado com o grupo veículo ($p < 0,01$). Nesse período o grupo que utilizou AA como tratamento apresenta matriz íntegra, diferente do que se vê no grupo não tratado. Supõe-se então, que a diminuição no número de células marcadas do grupo tratado se deu em decorrência do tratamento, que acelerou o processo de restauração do tecido. Durante essa fase ocorre o declínio de metabolismo dos tenócitos e posterior morte programada, eliminando células desnecessárias por mecanismos ainda pouco conhecidos, devolvendo ao tendão a característica de poucas células, como observado no grupo controle (figura 8) (SHARMA, MAFFULLI; 2006; ALBERTS *et al*, 2010).

O efeito do tratamento com AA em parâmetros funcionais na lesão tendínea não possui dados na literatura. Contudo, buscamos agregar às nossas análises o efeito do AA na marcha dos ratos considerando que, as limitações de movimento decorrentes da lesão do tendão calcâneo geram déficits funcionais significativos que podem interferir nas atividades da vida diária dos indivíduos atingidos (PADANILAM, 2009).

Além do mais, a disfunção após cicatrização é comumente apontada e representa um grande problema por apresentar rigidez, incapacidade e dor (RILEY, 2004b; XU; MURRELL, 2008).

Dada à importância funcional do tendão de Aquiles, interessou-nos esclarecer se as melhoras histológicas relacionadas ao tratamento com AA se estenderam aos parâmetros funcionais. Utilizamos para isso o IFA (índice funcional de Aquiles), um teste bastante usado pela confiabilidade e sensibilidade ao tempo de reparo, com excelente correlação com as propriedades mecânicas (MURRELL, 1992; BEST *et al*, 1993).

Os nossos resultados com o IFA apontaram um ganho funcional significativo em 14 dias após ruptura associado ao tratamento com AA se comparado ao grupo veículo ($p < 0,05$). Sugerimos que a contribuição do AA está antecipa a melhora da função, uma vez que em 21 dias após injúria os grupos experimentais não se diferiram.

Os resultados funcionais utilizando índice funcional de Aquiles (IFA) somado às melhoras teciduais visto em nosso trabalho podem ser comparados aos encontrados em outros trabalhos que também mostraram correlação entre a função do tendão e a organização da matriz (KRIVIC *et al*, 2006; 2008; MORAES *et al*, 2013), angiogênese (KRIVIC *et al*, 2006), resistência à tração e força (NG *et al*, 2003; 2004).

O reparo da lesão tendínea é um processo complexo que requer acontecimentos celulares e bioquímicos locais que são ativados por uma série de mediadores, tais como, citocinas, fatores de crescimento e atividades enzimáticas. Em nosso estudo foi mostrado que o uso local de ácido ascórbico influenciou neste processo contribuindo para uma melhor organização tecidual e funcional na recuperação de lesão do tendão calcâneo de ratos submetidos a tenotomia.

Nessa perspectiva, estudos posteriores são necessários para investigar outros parâmetros envolvidos no processo de reparo da lesão tendínea referentes ao efeito de antioxidantes, bem como os fatores bioquímicos que possam elucidar os efeitos funcionais e morfológicos do ácido ascórbico apontados em nosso trabalho.

7 CONCLUSÃO

- O tratamento com ácido ascórbico promoveu redução no número de células em 21 dias após a ruptura do tendão.
- A administração local de ácido ascórbico implicou em uma estrutura tecidual mais conservada em 14 dias após a lesão
- O uso de ácido ascórbico na lesão tendínea apresentou melhor organização das fibras colágenas.
- O tratamento com ácido ascórbico promoveu melhora no desempenho funcional em 14 dias após a lesão.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARON B.B. & GOSLINE J.M. Elastin as a random-network elastomer: a mechanical and optical analysis of single elastin fibers. **Biopolymers** 20, 1247–1260, 1981.

ABATE, M.; GRAVARE-SILBERNAGEL, K.; SILJEHOLM, C.; DI IORIO, A.; DE AMICIS, D.; SALINI, V; WERNER, S; PAGANELLI, R. Pathogenesis of tendinopathies: inflammation or degeneration? **Arthritis Res Ther.** 11: 235-250, 2009.

ACKERMANN PW, LI J, FINN A, AHMED M, KREICBERGS A. Autonomic innervation of tendons, ligaments and joint capsules. A morphologic and quantitative study in the rat. **J Orthop Res**, 2001.

ALBERTS, B; JOHNSON, J; LEWIS, J; RAFF, M; ROBERTS, K; WALTER, P. **Biologia Molecular da célula**; tradução Ana Letícia Vanz...[*et al.*]-5. ed. – Dados eletrônicos.- Porto Alegre: Artmed, 2010.

ALFREDSON H, OHBERG L, FORSGREN S. Is vasculo-neural ingrowth the cause of pain in chronic Achilles tendinosis? An investigation using ultrasonography and colour Doppler, immunohistochemistry, and diagnostic injections. **Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.** 2003.

AMARA-MOKRANE, Y.A., LEHUCHER-MICHEL, M.P., BALANSARD, G., DUMÉNIL, G., BOTTA, A. Protective effects of a-hederin, chlorophyllin and ascorbic acid towards the induction of micronuclei by doxorubicin in cultured human lymphocytes. **Mutagenesis, Oxford**, v.11, n.2, p.161-167, 1996.

ANDERSSON *et al.* Substance P Is a Mechanoresponsive, Autocrine Regulator of Human Tenocyte Proliferation. **Br J Sports Med**; 45:399–406, 2011.

BANK RA, TEKOPPELE JM, OOSTINGH G, HAZLEMAN BL, RILEY GP. Lysylhydroxylation and non-reducible crosslinking of human supraspinatus tendon collagen: changes with age and in chronic rotator cuff tendinitis. **Ann Rheum Dis.** Jan;58(1):35-41, 1999.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Sociedade Brasileira de Química**, v. 29, n. 1, p. 113-23, 2006.

BEST, T.M, COLLINS, A, LILLY, E.G, SEABER, A.V, GOLDNER, R, MURRELL, G.A.. Achilles tendon healing: a correlation between functional and mechanical performance in the rat. *J Orthop Res*;11:897–906. 1993.

BIANCHI M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev. nutr., campinas*, 12(2): 123-130, 1999.

BIRCH, H.L. Tendon matrix composition and turnover in relation to functional requirements. *Int. J. Exp. Pathol.* 88, 241–248, 2007.

BLOCK KI, KOCH AC, MEAD MN, TOTHY PK, NEWMAN RA, GYLLENHAAL C. Impact of antioxidant supplementation on chemotherapeutic toxicity: a systematic review of the evidence from randomized controlled trials. *Int J Cancer*; 123:1227–39. 2, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. Área Técnica da Saúde do Trabalhador. **Diagnóstico, tratamento, reabilitação e fisiopatologia das LER/DORT / Ministério da Saúde, Departamento de Ações Programáticas e Estratégicas. Área Técnica de Saúde do Trabalhador**; elaboração Maria Maeno *et al.* Brasília: Ministério da Saúde, 2001.

BRING, D. K-I; KREICBERGS, A.; RENSTROM Per A. F. H; ACKERMANN, P. W. Physical Activity Modulates Nerve Plasticity and Stimulates Repair after Achilles Tendon Rupture. *Journal of Orthopaedic Research.* 25: 164-72, 2007.

BRING, D K.-I; RENO C; RENSTROM, P; SALO, P; HART, D. A; ACKERMAN, P. W. Joint Immobilization Reduces the Expression of Sensory Neuropeptide Receptors and Impairs Healing after Tendon Rupture in a Rat Model. *J Orthop Res* 27:274–280, 2008.

BRING, D K.-I; PAULSON, K.; RENSTROM, P; SALO, P; HART, D. A; ACKERMAN, P. W. Residual substance P levels after capsaicin treatment correlate with tendon repair. *Wound Rep Reg* 20 50–60, 2012.

CANTY, E, G; KADLER K, E. Collagen fibril biosynthesis in tendon: a review and recent insights. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 133 979–985. 2002.

CANTY, E, G; KADLER, K,E. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *J Cell Sci.* Apr 1;118(Pt 7):1341-53, 2005.

CHEN Q; ESPEY, M.G; SUN, A.Y; LEE, J.H; KRISHNA, M.C; SHACTER, E; CHOYKES, P.L; POOPUT, C; KIRK, K.L; BUETTNER, G.R; LEVINE, M. Ascorbate in pharmacologic concentrations selectively generates ascorbate radical and hydrogen peroxide in extracellular fluid in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:8749–8754, 2007.

CHEN, Q; ESPEY, M.G.; SUN, A. Y.; POOPUT, Chaya;KIRK, K. L.; KRISHNA, M. C; KHOSH. D. B.; DRISKO. J.; LEVINE, M. Pharmacologic doses of ascorbate act as a prooxidant and decrease growth of aggressive tumor xenografts in mice. **PNAS**. vol. 105, no. 32, 2008.

COOK, J. L; KHAN, K, M; PURDAM, C. Achilles tendinopathy. **Manual Therapy** 7(3), 121-130, 2002.

DAHL, J; LI, J; BRING, DANIEL K.-I; PER RENSTROM; ACKERMANN, PAUL W. Intermittent Pneumatic Compression Enhances Neurovascular Ingrowth and Tissue Proliferation during Connective Tissue Healing: A Study in the Rat. **Journal of orthopaedic research** 25:1185–1192, 2007.

DE MOS, M.; VAN EL, B.; DE GROOT, J.; JAHR, H.; VAN SCHIE , H. T. M.; VAN ARKEL, E. R.; TOL, H.; HEIJBOER , R.; VAN OSCH , G. J. V. M.; VERHAAR , J. A. N. Achilles Tendinosis. Changes in Biochemical Composition and Collagen Turnover Rate. **The American Journal of Sports Medicine**. Vol. 35, No. 9, 2007.

DEL-RIO, J.V., BECK, D.E.; OPELKA, F, G. Chronic perioperative steroids and colonic anastomotic healing in rats. **J Surg Res**; 66:138-42, 1996.

FARCIC, THIAGO SAIKALI. **Efeitos de diferentes tempos de aplicação do ultrassom terapêutico no tratamento de tendão de ratos no processo de reparação tecidual**. Dissertação de mestrado. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2011.

FERREIRA, I. F. R; ABREU, R. M. V. Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos. **Bioanálise** / ano IV, n.2 Jul/Dez, 2007.

FRANCESCHI F, PAPALIA R, PACIOTTI M, FRANCESCHETTI E, DI MARTINO A, MAFFULLI N, DENARO V. Obesity as a risk factor for tendinopathy: a systematic review. **Int J Endocrinol**. 2014:670262. Epub 2014 Aug 19, 2014.

FRANCHI, M; TRIRÈ, A; QUARANTA, M; ORSINI, E; OTTANI, V. Collagen Structure of Tendon Relates to Function. **The Scientific World Journal**, 7, 404–420, 2007.

FREBERG, U. Tendinopathy-tendinitis or tendinosis? The question is still open. **Scan J Med Sci Sports**. 14;270-2, 2004

GABEL GT. Acute and chronic tendinopathies at the elbow. **Curr Opin Rheumatol**. 1999.

GIBBON, W W; COOPER, J R; RADCLIFFE, G S. Sonographic incidence of tendon microtears in athletes with chronic Achilles tendinosis. **Br J Sports Med**; 33:129–130, 1999.

GODBOUT, Charles; ANG, Oliver; FRENETTE, Jérôme. Early voluntary exercise does not promote healing in a rat model of Achilles tendon injury. **Journal of Applied Physiology**. 101: 1720-1726, 2006

GOSLINE J, LILLIE M, CARRINGTON E, GUERETTE P, Neuropeptides in tendinopathy, SAVAGE K. Elastic proteins: biological roles and mechanical properties. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. Feb 28;357(1418):121-32**, 2002.

JÓZSA L, KANNUS P. Histopathological findings in spontaneous tendon ruptures. **Scand J Med Sci Sports**. Apr;7(2):113-8, 1997.

KANNUS P. Structure of the tendon connective tissue. **Scand. J. Med. Sci. Sports** 10, 312–320, 2000.

KINSELLA, M. G; BRESSLER, S. L.; WIGHT, T. N. The Regulated Synthesis of Versican, Decorin, and Biglycan: Extracellular Matrix Proteoglycans That Influence Cellular Phenotype. **Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression**, 14(3):203–234, 2004.

KOROL, R. M; FINLAY, H, M; JOSSEAU, M, J; LUCAS, A, R; CANHAM, P, B. Fluorescence spectroscopy and birefringence of molecular changes in maturing rat tail tendon. **Journal of Biomedical Optics** 12(2), 024011, 2007.

KRIVIC, A.; ANIC, T.; SEIWERTH, S.; HULJEV, D.; SIKIRIC, P. Achilles Detachment in Rat and Stable Gastric Pentadecapeptide BPC 157: Promoted Tendon-to

Bone Healing and Opposed Corticosteroid Aggravation. **J Orthop Res.** 24: 982–989, 2006.

KRIVIC, A; MAJEROVIC, M; JELIC, I; SEIWERTH, S; SIKIRIC, P. Modulation of early functional recovery of Achilles tendon to bone unit after transection by BPC 157 and methylprednisolone. **Inflammation Research.** Volume 57, Issue 5, pp 205-210, 2008.

LIN, J; WANG, M; WEI, A; ZHU, W; DIWAN, A; MURRELL, GA. Temporal expression of nitric oxide synthase isoforms in healing Achilles tendon. **J Orthop Res.** 19(1): 136-42, 2001.

LONGO, UG; RONGA, M; MAFFULLI, N. Achilles Tendinopathy. **Sports Med Arthrosc Rer.** 17: 112–126, 2009.

LONGO UG, LOPPINI M, MARGIOTTI K, SALVATORE G, BERTON A, KHAN WS, MAFFULLI N, DENARO V. Unravelling the Genetic Susceptibility to Develop Ligament and Tendon Injuries. **Curr Stem Cell Res Ther**, 2014.

MAFFULLI, N.; LONGO, U.G.; FRANCESCHI, F.; RABITTI, C.; DENARO, V. Movin and Bonar Scores Assess the Same Characteristics of Tendon Histology. **Clin Orthop Relat Res.** 466: 1605–1611, 2008.

MAGRA M, MAFFULLI N. Genetic aspects of tendinopathy. **J Sci Med Sport.** 2008.

MARTOS, T, A; DELGADO-MARTINEZ, A, D; VEGA, M, V; CARRASCAL, M, T; MUNUERA-MARTINEZ, L. Effect of vitamin C fracture healing in elderly Osteogenic Disorder Shionogi rats. **J Bone Joint Surg [Br];**89-B:402-7, 2007.

MAVROGENIS S, JOHANNESSEN E, JENSEN P, SINDBERG C. The effect of essential fatty acids and antioxidants combined with physiotherapy treatment in recreational athletes with chronic tendon disorders. A randomised, double-blind, placebo-controlled study. **Phys Ther Sport** ;5:194–9, 2004.

MORAES, A.S; OLIVEIRA, K.R.M; LÓPEZ, M.E.C; DINIZ, D.L.W; HERCULANO, A.M. Local NO synthase inhibition produces Histological and functional recovery in achilles tendon of rats after tenotomy. **Cell tissue Res;** 353.457-463, 2013.

MORIKAWA,D; ITOIGAWA,Y; NOJIRI, H; SANO, H; ITOI, E; SAIJO, Y; KANEKO, K; SHIMIZU, T. Contribution of oxidative stress to the degeneration of

rotator cuff enthuses. *Journal of shoulder and elbow surgery*. Vol. 23, Issue 5, pages 28-635, 2014

MOS , M.D.; VAN EL, B; DEGROOT, J; JAHR, H; VAN SCHIE , H. T. M.; VAN ARKEL , E. R.; TOL, H; HEIJBOER, R; VAN OSCH, G. J. V. M.; VERHAAR, J. A. N.. Achilles Tendinosis Changes in Biochemical Composition and Collagen Turnover Rate. **The American Journal of Sports Medicine**, Vol. 35, No. 9, 2007

MURRELL, GA; TANG, DG; APPELYARD, RC; DEL SOLDATO, P; WANG, M. Addition of nitric oxide through nitric oxide-paracetamol enhances healing rat Achilles tendon. **Clin Orthop Relat Res** 466: 1618–24, 2008.

MURRELL, GAC; LILLY, EG; DAVIES, H; BEST, TM; GOLDNER, RD; SEABER, AV. The Achilles Functional Index. **J Orthop Res**. 10(3): 398-404, 1992.

NG, C.O.Y.; NG, G.Y.F.; SEE, E.K.N.; LEUNG, M.C.P. Therapeutic ultrasound strength of achilles tendon repair in rats. **Ultrasound in Med & Biol**. 29: 1501–1506, 2003.

NG, G.Y.F.; NG, C.O.Y.; SEE, E.K.N. Comparison of therapeutic ultrasound and exercises for augmenting tendon healing in rats. **Ultrasound in Med & Biol**. Nov;30(11):1539-43, 2004.

O'BRIEN M. Structure and metabolism of tendons. **Scand J Med Sci Sports** 7: 55-61, 1997.

ÖHBERG L, LORENTZON R, ALFREDSON H. Neovascularisation in Achilles tendons with painful tendinosis but not in normal tendons: an ultrasound investigation. **Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc**. 2001.

OMEROGLU, S.; PEKER, T.; TURKIZKAN, N.; OMEROGU, H. High-dose vitamin C supplementation accelerates the Achilles tendon healing in healthy rats. **Arch Orthop Trauma Surg**, 2009.

OTTANI, V; RASPANTI, M.; RUGGERI, A. Collagen structure and functional implications. **Micron** 32, 251–260, 2001.

PADANILAM, T.G. Chronic Achilles Tendon Ruptures. **Foot Ankle Clin N Am**. 14: 711–728, 2009.

PADAYATTY, S.J; SUN HE; WANG, Y; RIORDAN, H.D; HEWITT, S.M; KATZ, A; WESLEY, R.A; LEVINE, M. Vitamin C pharmacokinetics: Implications for oral and intravenous use. *Ann Intern Med* 140:533–537. 2004

PARK, S.W.; LEE, S.M. Antioxidant and prooxidant properties of ascorbic acid on hepatic dysfunction induced by cold ischemia/reperfusion. **European Journal of Pharmacology** 580, 2008.

PHILLIPS CL, YEOWELL HN. Vitamin C, collagen biosynthesis, and aging. In: **Packer L, Fuchs J**, eds. Vitamin C in health and disease. New York: Marcel Dekker Inc, 205–30, 1997.

POWER, S. K.; CRISWELL, D.; LAWLER, J.; JII, LL.; MARTIM, D.; HERB, R. A.; *et al.* Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. **American Journal of Physiological**, v. 266, p. R375-R380, 1994.

PRAT, A.G., TURRENS, J.F. Ascorbate-and hemoglobin-dependent brain chemiluminescence. *Free Radic. Biol. Med.* 8, 319–325, 1990.

RADAK Z, TAKAHASHI R, KUMIYAMA A, NAKAMOTO, H; OHNO, H; OOKAWARA, T; GOTO, S. Effect of aging and late onset dietary restriction on antioxidant enzymes and proteasome activities, and protein carbonylation of rat skeletal muscle and tendon. **Exp Gerontol**; 37:1423–30, 2002.

REES, J. D.; WILSON, A. M.; WOLMAN, R. L. Current concepts in the management of tendon disorders. **Rheumatology**; 45:508–521, 2006.

REES, J, D; MAFFULLI, N; COOK, J. Management of Tendinopathy. **Am J Sports Med** 37: 1855, 2009

RILEY, G, P; CURRY, V; DEGROOT, J; VAN EL, B; VERZIIL, N; HAZLEMAN, B, L.; BANK, R, A. Matrix metalloproteinase activities and their relationship with collagen remodelling in tendon pathology. **Matrix Biology** 21 185–195, 2002.

RILEY, G.P. Tendon and ligament biochemistry and pathology. In **Soft Tissue Rheumatology**, 20–53 (Eds Hazleman BL *et al.*) Oxford: Oxford University Press, 2004.

RILEY, G. The pathogenesis of tendinopathy. A molecular perspective. **Rheumatology**. 43: 131–142, 2004b.

RILEY, G. Tendinopathy – from basic science to treatment. **Nature clinical practice rheumatology**, vol 4 no 2, 2008.

RUSSELL, J.E; MANSKE, P.R. Ascorbic acid requirement for optimal flexor tendon repair in vitro. **Journal of orthopaedic research**. Vol.9, issue 5, pages 714-719, 1991.

SAKAGAMI, H.; SATOH, K. Modulating factors of radical intensity and cytotoxic activity of ascorbate. **Anticancer Res**. 17, 3513–3520, 1997.

SAMIRIC, T; PARKINSON; ILIC, M, Z.; COOK, J; FELLER , J. A.; HANDLEY, C, J.. Changes in the composition of the extracellular matrix in patellar tendinopathy. **Matrix Biology** 28 230–236, 2009.

SCHAEFER, L; IOZZO , R, V. Biological Functions of the Small Leucine-rich Proteoglycans: From Genetics to Signal Transduction. **J. Biol. Chem**. 283:21305-21309, 2008

SCOTT, A. COOK, J. L.; HART, D. A.; WALKER, D. C.; DURONIO, V.; KHAN, K, M. Tenocyte Responses to Mechanical Loading In Vivo – A Role for Local Insulin-Like Growth Factor 1 Signaling in Early Tendinosis in Rats. **Arthritis & Rheumatism**. Vol. 56, No. 3, 2007.

SEE, E.; NG, G.; NG, C.; FUNG, D. Running exercises improve the strength of a partially ruptured Achilles tendon. **Br J Sports Med**. 38: 597–600, 2004.

SHARMA, P. MAFFULLI, N. Biology of tendon injury: healing, modeling and remodeling, **Journal Musculoskelet Neuronal Interact**; 6(2):181-190, 2006.

SIES, H., STAHL, W. Vitamins E and C, b-carotene, and other carotenoids as antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.62, n.6, p.1315-1321, 1995.

SIMONIN, M.A; POTTIE, P.G; MINN, A; GILLET, P; NETTER, P; TERLAIN. B. Pefloxacin-Induced Achilles Tendon Toxicity in Rodents: Biochemical Changes in Proteoglycan Synthesis and Oxidative Damage to Collagen **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 0066-4804/00/04.0010, p. 867–872, 2000.

SMITH, R. K., ZUNINO, L., WEBBON, P., AND HEINEGÅRD, D. **MatrixBiol**. 16, 255–271, 1997.

SOSLOWSKY LJ, THOMOPOULOS S, TUN S, FLANAGAN CL, KEEFER CC, MASTAW J, CARPENTER JE. Neer Award 1999. Overuse activity injures the supraspinatus tendon in an animal model: a histologic and biomechanical study. **J Shoulder Elbow Surg.** 9:79–84, 2000.

STOLINSKI, C. Disposition of collagen fibrils in human tendons. **J. Anat.** 186, pp. 577-583, 1995.

TEMPLE BR. Vitamin toxicity. In: Dart RC, editor. **Medical toxicology.** Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. p. 1017–24, 2004.

THORPE, C, T; BIRCH, H. L; Clegg, P. D; SCREEN , H. R.C. The role of the non-collagenous matrix in tendon function. **Int. J. Exp. Path.** 94, 248–259, 2013.

VIDAL, B. C. Image analysis of tendon helical superstructure using interference and polarized light microscopy. **Micron** 34 423–432, 2003.

XU, Y; MURRELL, GAC. The basic science of tendinopathy. **Clin Orthop Relat Res.** 466: 1528–1538, 2008.

YOON JH, HALPER J. Tendon proteoglycans: biochemistry and function. **J Musculoskelet Neuronal Interact** 5:22–34, 2005.



PARECER 161-13

Projetos: EFEITO DO TRATAMENTO COM ÁCIDO ASCÓRBICO NO REPARO DA LESÃO TENDÍNEA EM RATOS

Coordenador: Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano

Área Temática: Neurociências **Vigência:** 04/2013 a 05/2015

Nº no CEPAE-UFPA: 161-13

O projeto acima identificado foi avaliado pelo Comitê de Ética Em Pesquisa Com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE). O tema eleito para a investigação e de alto teor científico justificando a utilização do modelo animal proposto. Os procedimentos experimentais utilizados seguem as normas locais e internacionais para tratamento e manipulação de animais de experimentação. Portanto, o CEPAE, através de seu presidente, no uso das atribuições delegadas pela portaria Nº 3988/2011 do Reitor da Universidade Federal do Pará, resolve **APROVAR** a utilização de animais de experimentação (N=72, ratos Wistar) nas atividades do projeto em questão, no período de vigência estabelecido.

As atividades experimentais fora do período de vigência devem receber nova autorização deste comitê.

Belém, 02 de abril de 2013.

Wallace Gomes Leal
Prof. Dr. Wallace Gomes Leal
Presidente do CEPAE-UFPA