



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE CASTANHAL  
FACULDADE DE EDUCAÇÃO FÍSICA**

**EWELLIN THAMIRES ALENCAR LEITE**

**EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO EM PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E  
HISTOLÓGICOS DE RATOS SUBMETIDOS A TENOTOMIA DO TENDÃO  
CALCÂNEO**

**CASTANHAL- PARÁ  
2018**

**EWELLIN THAMIRES ALENCAR LEITE**

**EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO EM PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E  
HISTOLÓGICOS DE RATOS SUBMETIDOS A TENOTOMIA DO TENDÃO  
CALCÂNEO**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado à Universidade Federal do Pará do Campus de Castanhal (UFPA), como requisito parcial para obtenção do grau de Licenciada em Educação Física. Sob a orientação da Prof (a). MSc. Martha de Souza França.

**CASTANHAL- PARÁ  
2018**

**EWELLIN THAMIRES ALENCAR LEITE**

**EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO EM PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E  
HISTOLÓGICOS DE RATOS SUBMETIDOS A TENOTOMIA DO TENDÃO  
CALCÂNEO**

Trabalho de Conclusão de Curso,  
apresentado à Universidade Federal do  
Pará do Campus de Castanhal (UFPA),  
como requisito parcial para obtenção do  
grau de Licenciada em Educação Física.  
Sob a orientação da Prof (a). MSc. Martha  
de Souza França.

**Data de aprovação: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_.**

**Banca Examinadora:**

---

**Orientadora**

**Prof<sup>a</sup>. MSc. Martha de Souza França - UFPA**

---

**Examinador (a)**

**Prof<sup>a</sup>. MSc. Alessandra Mendonça Tomás- UFPA**

---

**Examinador (a) Prof<sup>o</sup>. Dr. Euzébio de Oliveira - UFPA**

## AGRADECIMENTO

Agradecer primeiro à Deus devido ser abençoada todos os dias com a dádiva da vida, as oportunidades à mim dada e em também poder conquistá-las, ainda que nas dificuldades, sempre de cabeça erguida!

Dedico esta conquista que é mais um sonho sendo realizado, principalmente, para eles, aos meus queridos pais, Zilda Leite e Antônio Leite, por sempre estarem me incentivando nos estudos e a alcançar os meus objetivos, ensinam-me a olhar para trás e enxergar as dificuldades como uma motivação para continuar estudando e, também agradeço-lhes por todos os investimentos no decorrer da vida.

Ao meu time favorito (“Alencar & Leite”) que são os meus irmãos Ewerton Leite, Ewerson Leite e Emerson Leite (vulgo, meu maninho) por todas as ajudas que me deram e, principalmente, pelos momentos juntos e felizes.

À minha avó Creuza dos Santos que lhe considero a minha segunda mãe, desde pequena me incentiva e em todos os dias, a estudar para conseguir ter melhores condições financeiras e... Viver! À família e aos meus familiares que sempre estão me apoiando de alguma forma para que eu nem pense em desistir.

Aos meus amigos (BatCasa) Aline Sena e André Luis Castro (Pep Castro) por compartilharmos momentos incríveis.

Ao Grupo de Estudos do Movimento- UFPA (GEM), agradeço imensamente a esses seres dançantes pelas trocas de conhecimentos e as melhores experiências vividas.

Aos amigos da turma Joice Ribeiro, Jhuliane Costa, Cleane Rodrigues, Nívea Nascimento e ao amigo Emerson Ferreira (Baby), por toda a parceria e momentos alegres que vivenciamos e espero continuar.

Grata por todas as amizades que conquistei no campus. Não poderia deixar de agradecer a turma 2015.1 (Zium) que me recebeu muito bem quando retornei ao campus depois de passar uma curta temporada em intercâmbio pelo programa da universidade.

Obrigada Universidade Federal da Bahia (UFBA) por aceitar-me nesses cinco meses como intercambista e permitir que eu adquirisse os conhecimentos que foram pra além do curso de educação física. Grata também pelas amizades feitas por lá.

“Obrigadão” por fazer parte dessa família, a famosa turma 2014.2 (vulgo Mangueirão), também é a melhor do Campus, normal! Agradeço por esses quatro

anos de trocas de conhecimentos, confraternizações, estudos, zoeiras, obstáculos enfrentados... Pessoas maravilhosas que valem a pena manter as amizades.

Agradeço imensamente à equipe do Laboratório de Neurofarmacologia Experimental do Instituto de Ciências Biológicas (LNE- ICB) da UFPA, especialmente, Analú Maciel, Diego Rodrigues, Thalita Moura e Tatiana Nascimento, que contribuíram compartilhando os conhecimentos e ajudando-me nos experimentos, obrigada prof<sup>o</sup>. Dr. Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva por permitir que eu pudesse desenvolver esse trabalho de conclusão de curso nesse ambiente.

Agradeço a Deus por ter me presenteado com essa mega irmã, embora, sejamos de pais diferentes. Eliane Maciel sou eternamente grata por compartilharmos experiências maravilhosas e um tanto divertidas que vão pra além da nossa universidade, sempre me ajudando, nossas conversas, seus conselhos... Minha "co-orientadora" e também minha amigona do coração!!!

Prof<sup>o</sup>. Msc. Martha Souza, a minha orientadora e que eu também considero a melhor professora do curso, admiro-te pela sua expertise, por conseguir dominar as diversas áreas que vão pra além da nossa graduação. Sou eternamente grata pela amizade construída e espero mantê-la, essa pessoa generosa e alegre, mesmo com todos os títulos acadêmicos possui uma humildade incrível, grata por compartilharmos experiências maravilhosas, pelas conversas, as caronas, pelas zoeiras... Por aceitar-me como orientanda, e não medir esforços para nos repassar os devidos conhecimentos, apesar das dificuldades enfrentadas (vulgo lactato), conseguimos!!!

E, logicamente, à UFPA/Castanhal, por ter me proporcionado muitas experiências e aprendizados durante esses quatro anos e meio de minha jornada como acadêmica.

“Movimento é uma habilidade que se manifesta desde o útero materno. A educação física faz junto ao movimento um elo biomecânico para expressar sentimentos”.

(PB)

## RESUMO

Tendinopatia é uma lesão que afeta os tendões e é caracterizada por dor crônica, inflamação e até ruptura parcial ou total do tecido acometido. Dentre os tendões comumente afetados tem-se o tendão calcâneo. No processo de reparo deste tecido inúmeras substâncias atuam modulando o processo de cicatrização, a exemplo do lactato e a glicemia. No que se refere as intervenções terapêuticas têm-se discutido o efeito do exercício físico no processo de reparo, e, sabe-se que a prática do mesmo implica na modulação dos níveis dessas substâncias. Nesse contexto o objetivo desse trabalho é avaliar o efeito do exercício físico em parâmetros bioquímicos e histológicos de ratos submetidos a tenotomia do tendão calcâneo. Neste trabalho foram utilizados 12 ratos adultos da linhagem *Wistar* divididos em três grupos: Exercício, Lesão e Lesão+exercício. Os animais foram submetidos a tenotomia do tendão calcâneo e ao protocolo de exercício físico (EF) (nado forçado por 30min). Foram mensurados os níveis de lactato e glicemia antes da lesão e em 7 e 14 dias após a lesão. As análises histológicas foram realizadas em 14 dias após as lesões através da coloração Hematoxilina e Heosina (HE) e da autofluorescência do colágeno. Foi utilizado o Índice Funcional de Aquiles (IFA) para análise funcional antes da lesão e em 7 e 14 dias após a lesão. Para análise estatística utilizamos o teste ANOVA-1 via seguido do pós-teste Tukey, considerando significativo  $p < 0,05$  com dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Os resultados obtidos demonstraram uma menor perda funcional do grupo lesão+exercício em relação ao grupo lesão quando comparado ao grupo exercício. A análise funcional mostrou uma estrutura tecidual semelhante entre o grupo lesão+exercício e o grupo lesão, característico do processo de cicatrização, diferindo do grupo exercício. As análises da autofluorescência do colágeno revelou que o grupo lesão apresentou menor densidade de colágeno quando comparado aos demais grupos experimentais. Os valores de lactato e glicemia não tiveram variações expressivas entre os grupos e dias de análise. Desta forma concluímos que o exercício físico contribui para o processo de reparo do tendão calcâneo apresentando uma menor perda funcional em 7 e 14 dias após a lesão, e, a manutenção da malha colágena analisada em 14 dias pós lesão, apesar de apresentar áreas de degeneração em ambos os grupos que sofreram lesão. E por fim, o protocolo de exercício realizado não demonstrou efeito de variação nos níveis de lactato e glicemia em 7 e 14 dias após a lesão do tendão calcâneo.

**Palavras-Chave:** Exercício físico. Tendinopatia. Índice Funcional de Aquiles. Lactato. Glicemia.

## Abstract

Tendinopathy is an injury that affects the tendons and is characterized by chronic pain, the formation of partial or total of the affected tissue. Regular tendons affect the calcaneus tendon. In the process of diagnosis of this tissue there are active substances modulated in the healing process, an example of lactate and a glycemia. Regarding the therapeutic techniques, it is necessary to discuss the physical effect on the repair process, and, indeed, the practice of the same implement in the modulation of glucose and lactate levels. In the context exercise is more sensitive to physical exercise in biochemical and histological terms of gender submitted to tenotomy of the calcaneus tendon. Twelve adult Wistar rats were divided into three groups: Exercise, Injury and Injury + exercise. The animals were submitted to tenotomy of the calcaneus tendon and to the physical exercise protocol (forced swimming for 30min). The levels of lactate and glycemia before injury occurred 7 and 14 days after injury. A histological analysis was performed 14 days after the automatic coloring of the light and the autofluorescence of the collagen. Functional function was used for the functional analysis of the lesion at 7 and 14 days after injury. The analysis was performed using the ANOVA-1 test followed by the Tukey post-test, considering a significant  $p < 0.05$  with data expressed as mean  $\pm$  standard deviation. The results showed a lower functional loss of the lesion + exercise group compared to the group Injury when compared to Exercise group. Functional analysis was performed in a structured way between the lesion + exercise group and the lesion group, characteristic of the healing process, differing from the exercise group. The analysis of autofluorescence coloring of which the group is less in the density groups of experiment. Lactate and glycemia values were not expressed between groups and days of analysis. In this way, we concluded the physical exercise to repair the calcaneus tendon in less functional time 7 and 14 days after the injury, and the maintenance of the collagen mesh in 14 days post-injury, despite presenting areas of degeneration in both groups that suffered injury. And by physical exercise protocol did not show effect of variation in the levels of lactate and glycemia in 7 and 14 days after the injury of the calcaneal tendon.

**Keywords:** Physical exercise. Tendinopathy. IFA. Lactate. Glycemia.

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODO</b> .....	12
2.1	Animais.....	12
2.2.	Tenotomia Cirúrgica.....	12
2.3.	Delineamento Experimental.....	13
2.4.	Protocolo de Exercício Físico.....	13
2.5.	Mensuração de Glicemia e Lactato.....	14
2.6	Análise Histológica.....	15
2.6.1	Corte Histológico.....	15
2.6.2	Coloração Hematoxilina e Eosina.....	15
2.6.3	Autofluorescência do Colágeno.....	15
2.7	Avaliação do Índice Funcional de Aquiles.....	16
2.8	Análise Estatística.....	17
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	18
3.1	Massa Corporal.....	18
3.2	Índice Funcional de Aquiles.....	18
3.3	Avaliação da Glicemia.....	19
3.4	Avaliação do Lactato.....	20
3.5	Análises Histológicas .....	20
<b>4.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	24
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	27
<b>6.</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	28

## 1 INTRODUÇÃO

Tendinopatia é uma lesão que afeta os tendões, e é caracterizada por dor crônica, inflamação e até ruptura parcial ou total do tecido acometido, que por sua vez afeta a biomecânica e dificulta a eficiência da mobilidade no local (PUDDU, 1998; GABEL, 1999; COOCK et. al., 2002; MAFFULLI, 2008; RILEY, 2008; RAFAEL, 2011).

Dentre os tendões comumente afetados tem-se o tendão calcâneo, considerado o maior e mais forte tendão do corpo, responsável pela extensão do pé e desta forma, envolvido diretamente na marcha do indivíduo. Neste contexto, o crescente número de lesão neste tendão tem sido atribuído em partes pelo aumento de pessoas adeptas à prática do exercício físico, atividades recreativas e, principalmente, ligadas à competição de elite que corresponde a 50% dos casos registrados (KADER, 2002; KUJALA, SARNA, KAPRIO, 2005; LIAN, ENGBRETSSEN, BAHR, 2005; MAFFULLI, 2008; PAAVOLA et. al., 2009).

A causa da tendinopatia pode ocorrer por diversos fatores que são classificados entre intrínsecos e extrínsecos. Nos fatores intrínsecos apresenta-se uma dificuldade de diagnóstico etiológico, nesse caso, ainda está sendo estudada sob diversas hipóteses, a exemplo das condições de estresse oxidativo, presença de mediadores, desordens hereditárias, hipóxia e entre outros (O'BRIEN, 1997; SHARMA, 2006; MAFFULLI, 2006; MOS et al, 2007; MAFFULLI, 2008; MAGRA, 2008).

Os fatores extrínsecos, são considerados mais fáceis de diagnosticar pois as causas da doença são, geralmente associadas com a idade, uso excessivo do tendão e/ou obesidade. Alguns tipos de intervenções do meio externo podem favorecer o surgimento da lesão, a exemplo da hiperextensão do tecido além da sua capacidade permitida, uma super pronação do tornozelo que sobrecarregue o tendão calcâneo e entre outros (MAFFULLI, 2006, SHARMA, 2006; REES, 2009; FRANCESCHI, 2014).

Após a lesão do tendão, iniciam três fases subsequentes de reparo (inflamatória, proliferativa e remodelagem) que ocorrem por cerca de 1 semana cada uma delas, e nestes períodos inúmeras substâncias atuam modulando o processo de reparo, entre elas, o lactato (SOUZA, 2015). Difundido na literatura mais fortemente como um substrato energético e por conseguinte como marcador

bioquímico de fadiga muscular, é descrito na literatura também por grande influência como mediador no processo de reparo, regeneração e angiogênese em lesões (BOTTEON, 2012; MAFFULLI, 2017).

Em lesões tissulares foi percebido que a alteração do processo circulatório decorrente de um tecido danificado resulta em uma resposta inflamatória e hipóxia, com isso, ocorre um aumento nos níveis de concentração de lactato que podem estimular os fibroblastos a produzirem colágeno (BOTTEON, 2012). Desta forma, o estado de produção mais intensa do lactato pode continuar até que o processo de cicatrização esteja restaurado com os novos vasos maduros e bordas da lesão fundidas (HUNT, 1978).

Considera-se também que o lactato tem papel importante na cicatrização da tendinopatia, pois ele é capaz de estimular os fatores de crescimento, a exemplo do fator de transformação do crescimento (TGF- $\beta$ ), que estimula a síntese do colágeno, os índices de deposição de matriz e modifica também participa da cicatrização nos tendões (BORBA, 1999; KLEIN, 2001).

De acordo com pesquisas realizadas, identificou-se que além da utilização do lactato para o processo de regeneração, a glicose também é identificada como participante deste processo. A glicose é um substrato pertencente ao grupo do carboidrato simples que tem por função fornecer energia para a maioria das células do organismo e por meio deste processo, contribui para diversas funções do corpo, e, na lesão do tendão é reportado uma atividade metabólica elevada quanto a captação de glicose em tendões calcâneo rompidos até um ano após a correção cirúrgica (UNESCO, 2013; KORNTNER, 2017).

Seu efeito na processo de recuperação da lesão do tendão é divergente quanto ao seu papel benéfico, pois ao mesmo tempo que tem um efeito favorável sobre a proliferação celular e deposição de matriz extracelular dentro do tecido recém-formado, afetam significativamente na rigidez e espessura dos tendões de ratos em processo de cicatrização, em nível funcional e molecular (KORNTNER, 2017).

Dentre as intervenções terapêuticas têm-se discutido na literatura o efeito do exercício físico no processo de reparo das lesões dos tendões, e, sabe-se que a prática do mesmo implica em algumas alterações nos parâmetros fisiológicos em busca de manter a homeostasia orgânica, dentre os quais, é apontado o aumento dos níveis de glicose e lactato (AFONSO, 2003).

Nesse contexto o objetivo desse trabalho é avaliar o efeito do exercício físico em parâmetros bioquímicos e histológicos de ratos submetido a tenotomia do tendão calcâneo.

## **2. MATERIAL E MÉTODO**

### **2.1 Animais**

Para o desenvolvimento deste estudo foram utilizados n=12 ratos adultos da linhagem *Wistar (Rattus norvegicus albinus)* com massa corporal na faixa de 220 a 300g, provenientes do biotério central pertencente ao Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará (ICB-UFPA). Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, quatro ratos por gaiola à temperatura ambiente de 31°C e obedecendo o fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro, com ração e água a vontade.

Como controle do experimento a massa corporal dos animais foram mensuradas ao longo do experimento. O projeto desenvolvido obteve aprovação pelo comitê de ética da instituição sob o parecer (CEUA nº 2066070716).

### **2.2 Tenotomia Cirúrgica**

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. 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.

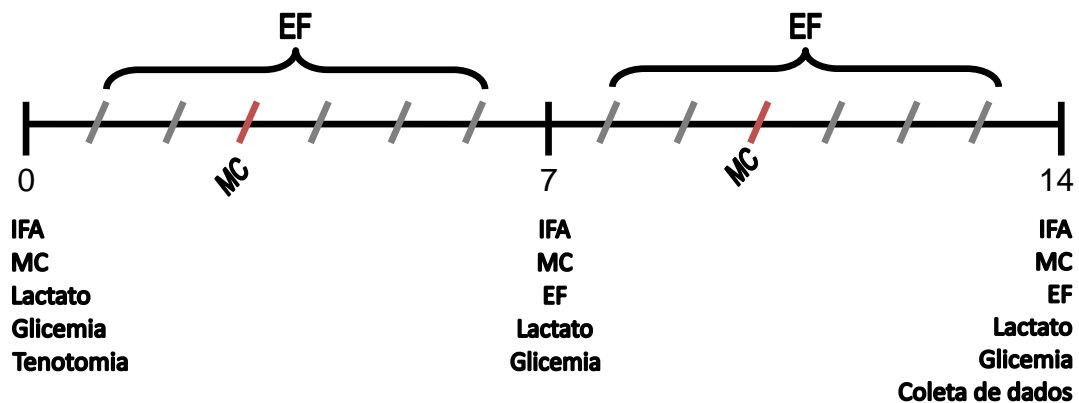
Após a dissecação foi realizada a sutura de Kessler (MURRELL et al, 1992), ocorrida antes da ruptura devido ao diminuto tamanho do tendão. Em seguida, o mesmo foi seccionado totalmente por cisalhamento transversal. Posteriormente, o tendão e a pele foram suturados com fio de poliamida monofilamento não 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.

### 2.3 Delineamento Experimental

Essa pesquisa contou com 3 grupos experimentais; o primeiro grupo foi submetido ao exercício físico (EF) (exercício; n=4); o segundo grupo realizou-se a ruptura no tendão de calcâneo (lesão; n=4); e o terceiro grupo também foi submetido a ruptura no tendão e ao exercício físico (lesão+exercício; n=4).

Com isso, os dias 0, 3, 7, 10 e 14 foram destinados para realizar as coletas de dados. Antes da tenotomia cirúrgica, houve a coleta da concentração de glicemia, lactato e também foi realizado Índice Funcional de Aquiles. No 7º e 14º dia da pesquisa foram novamente realizados esses mesmos processos de coletas de dados, sendo este último dia destinado também para o sacrifício dos animais para coleta do material biológico. A mensuração da massa corporal (MC) dos animais foram realizadas nos dias 0, 3, 7, 10 e 14 ( figura 1).



**FIGURA 1:** Delineamento experimental dos 14 dias. As aferições realizadas no dia 0 considerou-se como dados para o grupo controle. No dia 7 e 14 do delineamento novas análises foram coletadas para comparações. E os dias 3 e 10 marcados em vermelho destinou-se também para aferição da massa corporal (MC) realização do exercício físico (EF). Os demais dias com marcações na cor cinza foram feitos os exercícios físicos.

### 2.4 Protocolo de Exercício Físico

O protocolo de exercício físico consistiu no nado forçado modificado de Kuphal, Fibuch and Taylor (2007). Inicialmente foi realizado um processo de

adaptação ao meio aquático dos grupos exercício e lesão+exercício durante 6 dias de forma progressiva como mostra o quadro 1.

**QUADRO 1:** Quadro representativo do período de adaptação ao meio aquático dos animais.

Dia	Tempo de Exercício
1	5'
2	10'
3	15'
4	20' (10' + 2'descanso + 10')
5	25' (12'30" + 2'descanso + 12'30")
6	30' (15' + 2'descanso + 15')

Ao final da realização do processo de adaptação foi dado um dia de descanso para o animal e no dia subsequente dado início ao protocolo de 30 minutos de nado com intervalo de 2 minutos na metade do tempo.

O nado foi realizado em um aparato cilíndrico (53cm de profundidade e 98cm de diâmetro), contendo 170 litros de água (mantidos a temperatura de 31 °C). Foi adicionado 1 mL de xampu neutro (Johnson & Johnson®) para reduzir a tensão superficial e evitar a flutuação. Após o nado os animais foram secados delicadamente com um pano.

## 2.5 Mensuração de Glicemia e Lactato

Para a obtenção da concentração sanguínea, utilizamos o protocolo proposto por Gage et al (2012). A coleta de sangue como uma forma para a verificação da glicose e lactato foram feitas antes da lesão e em 7 e 14 dias após a cirurgia por meio de punção da veia caudal dos animais e imediatamente colocadas em tiras-teste apropriadas de acordo com cada monitor usado para a quantificação da glicemia (Accu- Chek® Active Roche) e lactato (Accutrend® Plus-Roche).

As concentrações foram mensuradas no período da tarde e no dia da coleta os animais não realizavam o protocolo de nado forçado.

## **2.6 Análise Histológica**

### **2.6.1 Corte Histológico**

Para a coleta dos tendões os animais foram perfundidos com salina (400 ml) + EDTA a 0,1 % e paraformaldeído a 4% (300 ml), após dissecados foram pós-fixados com paraformaldeído a 4% por 24h.

Após lavagem com tampão fosfato 0,1M, pH 7,4, esses tendões foram armazenados e mantidos em tampão fosfato a 4°C até o momento do corte histológico. Os tecidos foram crioprottegidos em soluções crescente de sacarose (10%, 20% e 30%) em temperatura ambiente e posteriormente mantidos na solução a 30% até o momento da criomicrotomia.

Para o corte os tendões foram embebido em Tissue Tek® (Sakura Finetek, Inc., Califórnia, USA) e posteriormente cortados a uma espessura de 20 µm com orientação longitudinal em criostato (Leica, CM3050 S) ajustado para -24°C. Após a realização dos cortes foram transferidos para lâminas histológicas sendo armazenadas a uma temperatura de -20°C.

### **2.6.2 Coloração Hematoxilina e Eosina**

Para avaliação da organização tecidual utilizamos hematoxilina e eosina para visualização do núcleo e matriz respectivamente. Essas lâminas foram inicialmente imersas em água destilada mantendo-as por 5 minutos, depois em hematoxilina de Harris por 30 segundos, lavadas em água destilada corrente novamente seguido de imersão em eosina por mais 30 segundos e por fim lavadas em água destilada corrente. Após esses processos, as lâminas foram imersas por 30 segundos em álcool 70% e então 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 qualitativa.

### **2.6.3 Autofluorescência do Colágeno**

Para avaliar o processo de cicatrização, três cortes longitudinais foram coletados e organizados em secções referentes às porções ventral, proximal e distal do tendão para que posteriormente as análises sejam feitas em microscópio de fluorescência (Nikon, Eclipse E800 Yokohama, Japan).

Por meio das lâminas é possível identificar a organização do colágeno no tecido 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.

## **2.7 Avaliação do Índice Funcional de Aquiles**

Para avaliação funcional da marcha do animal foi utilizado o Índice Funcional de Aquiles (IFA) proposto por Murrell et al (1992). As análises foram realizadas em momento anterior a lesão e também em 7 e 14 dias pós lesão.

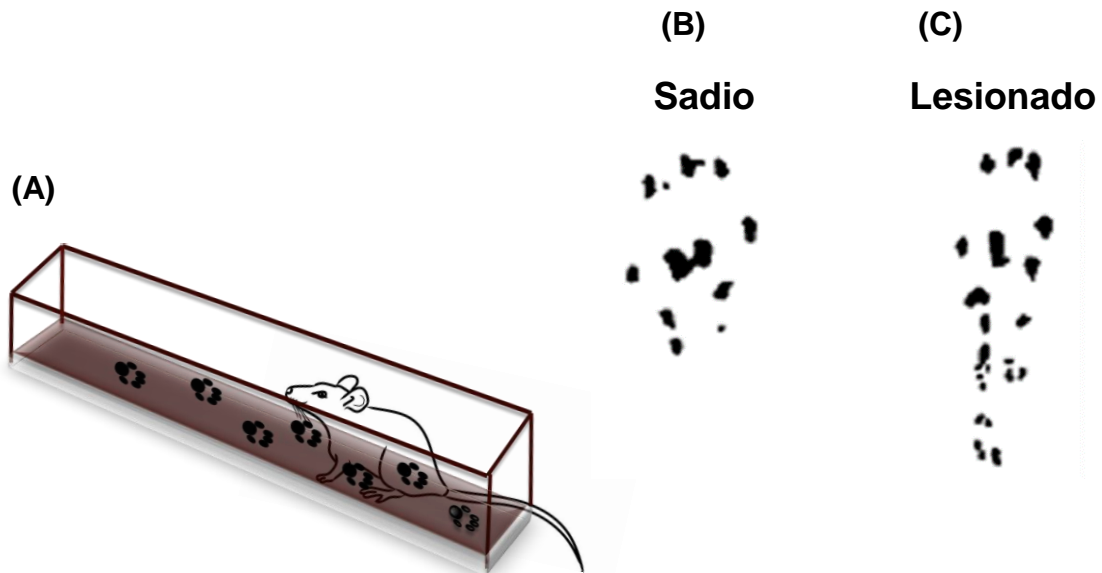
Os animais tiveram suas patas traseiras pintadas com tinta atóxica e em seguida colocados em uma passarela com 10 cm de largura por 60 cm de comprimento com um papel no fundo para que caminhassem em cima e, dessa forma, as pegadas dos mesmos foram impressas no papel (Figura: 2). Em seguida as impressões das patas foram digitalizadas para posterior análise 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:

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

Conforme os elementos da equação, o máximo comprimento da pegada é definido como o fator de comprimento da pegada (PLF) e obtido por PLF esquerda – PLF direita / PLF 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 direita – TSF

esquerda / TSF esquerda e a distância entre o segundo e o quarto dedo é o fator teste intermediário (ITF), calculado por  $\text{ITF direita} - \text{ITF esquerda} / \text{ITF esquerda}$ . Esses fatores, previamente obtidos foram calculados e usados para a equação do IFA.



**FIGURA 2:** Aparato e pegadas no IFA. Na esquerda (A): passarela para caminhada do animal. A direita um demonstrativo da diferença da pegada entre o animal sadio (B) e lesionado (C).

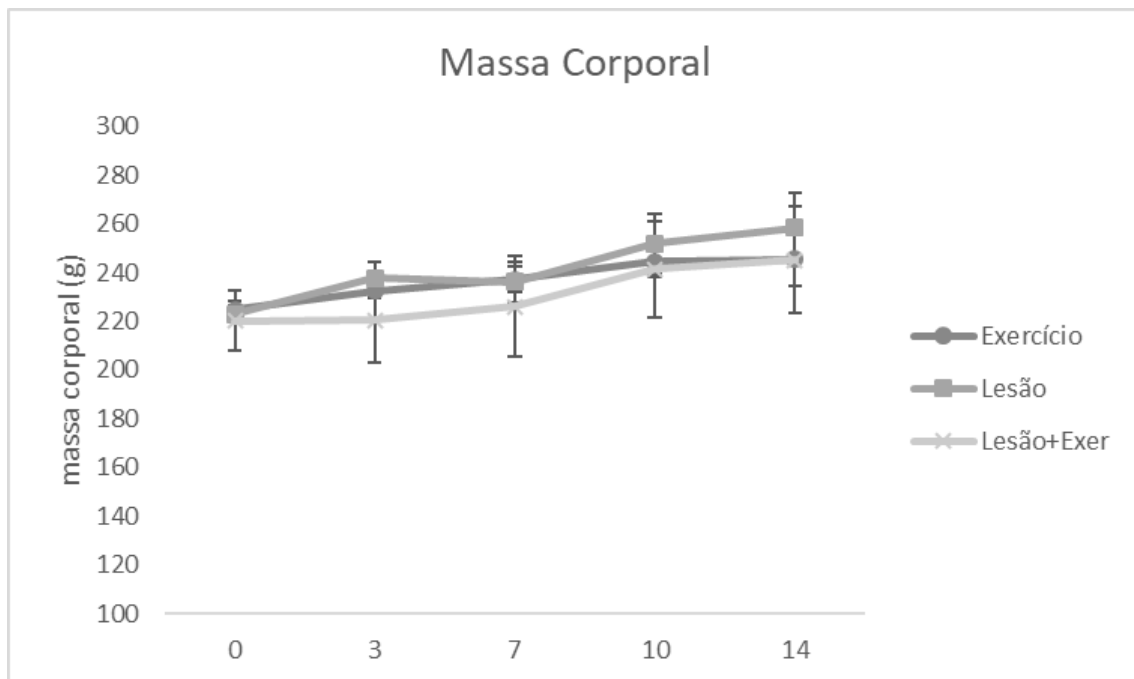
## 2.8 Análise Estatística

Foi usado para a avaliação estatística deste experimento o programa BioEstat 5.3, onde os dados foram analisados por meio do teste de variância (ANOVA) de um critério e, posteriormente, utilizado o pós teste Tukey para comparações múltiplas. Foram considerados valores significativos  $p < 0,05$ . Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Massa Corporal

Os experimentos contaram com a massa corporal de 220 g e a 300 g dos grupos experimentais. No decorrer dos experimentos, é perceptível que não houve variações expressivas da massa corporal desses animais, ou seja, a intervenção experimental não influenciou significativamente na faixa de massa corporal (figura:3).



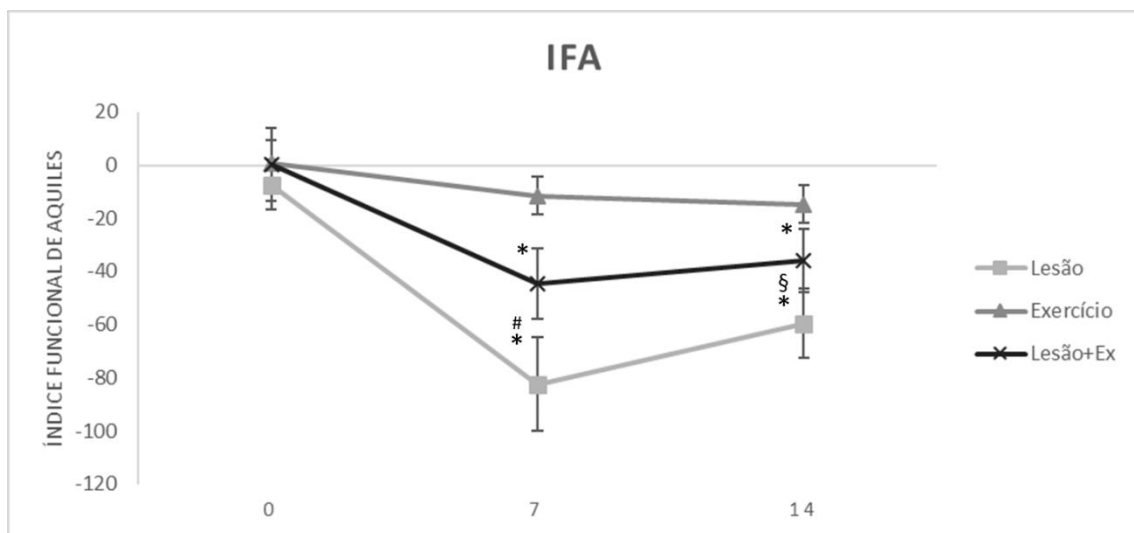
**FIGURA 3:** Análise da massa corporal dos grupos experimentais avaliados no dia 0, 3, 7, 10 e 14.

#### 3.2 Índice Funcional de Aquiles

Os resultados do índice funcional de Aquiles (IFA) permitem conferir os níveis de recuperação funcional do tendão lesionado (Figura: 4). O resultado da análise feita antes da lesão (dia 0) demonstram não haver diferença estatística entre os grupos com valores próximos de zero no grupo lesão ( $-7,33 \pm 9$ ), exercício

( $0,76 \pm 8,43$ ) e lesão+exercício ( $0,36 \pm 14$ ), indicando a funcionalidade normal esperada. Em 7 dias após a lesão é visto o decaimento da funcionalidade no grupo lesão ( $-82,49 \pm 18$ ) e lesão+exercício ( $-44,63 \pm 13,09$ ) quando comparado ao grupo exercício ( $-11,50 \pm 7,04$ ), apresentando diferença estatística entre os grupos ( $p \leq 0,01$ ), desta forma, é possível identificar que o grupo que sofreu lesão e praticou exercício teve um menor decaimento quando comparado ao grupo que não praticou o exercício físico.

Em 14 dias após a tenotomia o grupo lesão ( $-59,51 \pm 12,93$ ) tendeu a uma melhora porém ainda apresentou diferença estatística entre o grupo exercício ( $p \leq 0,01$ ) e o grupo lesão+exercício ( $p \leq 0,05$ ). O grupo lesão+exercício ( $-36,05 \pm 11,89$ ) também apresentou uma melhora, porém ainda apresentou diferença estatística entre o grupo exercício ( $-14,64 \pm 7,11$ ).



**FIGURA 4:** Avaliação do Índice Funcional de Aquiles dos grupos experimentais. As análises foram feitas em 0, 7 e 14 dias pós lesão. Os valores são expressos em média  $\pm$  DP,  $n=6$  (ANOVA-Tukey. \* $p \leq 0,01$  em relação ao grupo controle. #  $p \leq 0,01$  em relação ao grupo exercício. §  $p \leq 0,05$  em relação ao grupo exercício).

### 3.3 Avaliação da Glicemia

Para a avaliação da glicemia, utilizou-se como base os valores bioquímicos padrões do estudo de Santos (2010). Os valores obtidos nos dias de análise demonstrou não haver variações expressivas da glicemia entre os grupos experimentais mantidos na faixa de 85,5 - 105,5 mg/dl (tabela 1).

<b>GLICEMIA (mg/dl)</b>			
<b>Dia</b>	<b>0</b>	<b>7</b>	<b>14</b>
<b>Exercício</b>	85,5	97	89,25
<b>Lesão</b>	105,50	98,25	92
<b>Lesão+Exer</b>	91,25	92,67	86,75

**TABELA 1:** Valores referentes as análises glicêmicas representados em (mg/dl) realizada nos dias 0, 7 e 14.

### 3.4 Avaliação do Lactato

Para avaliação das concentrações do lactato, utilizou-se como base o estudo de Aguiar (2010). O resultado dos níveis de lactato antes da lesão mostram um valor maior (4,73 e 4,45mmol/L) em comparação ao grupo lesão (3,1 mmol/L) que não realizou exercício. Em 7 dias após a lesão vemos valores próximos entre os grupos exercício (2,33 mmol/L), lesão (2,18 mmol/L) e lesão+exercício (2,13 mmol/L).

Da mesma forma, em 14 dias após a lesão identificamos níveis de lactato próximos entre os grupo exercício (2,93 mmol/L), lesão (2,8 mmol/L) e lesão+exercício (2,53 mmol/L) (tabela 2).

<b>LACTATO (mmo/L)</b>			
<b>Dia</b>	<b>0</b>	<b>7</b>	<b>14</b>
<b>Exercício</b>	4,73	2,33	2,93
<b>Lesão</b>	3,1	2,18	2,8
<b>Lesão + Exercício</b>	4,45	2,13	2,53

**TABELA 2:** Análises de concentrações dos níveis de lactato coletadas no dia 0, 7 e 14 após lesão.

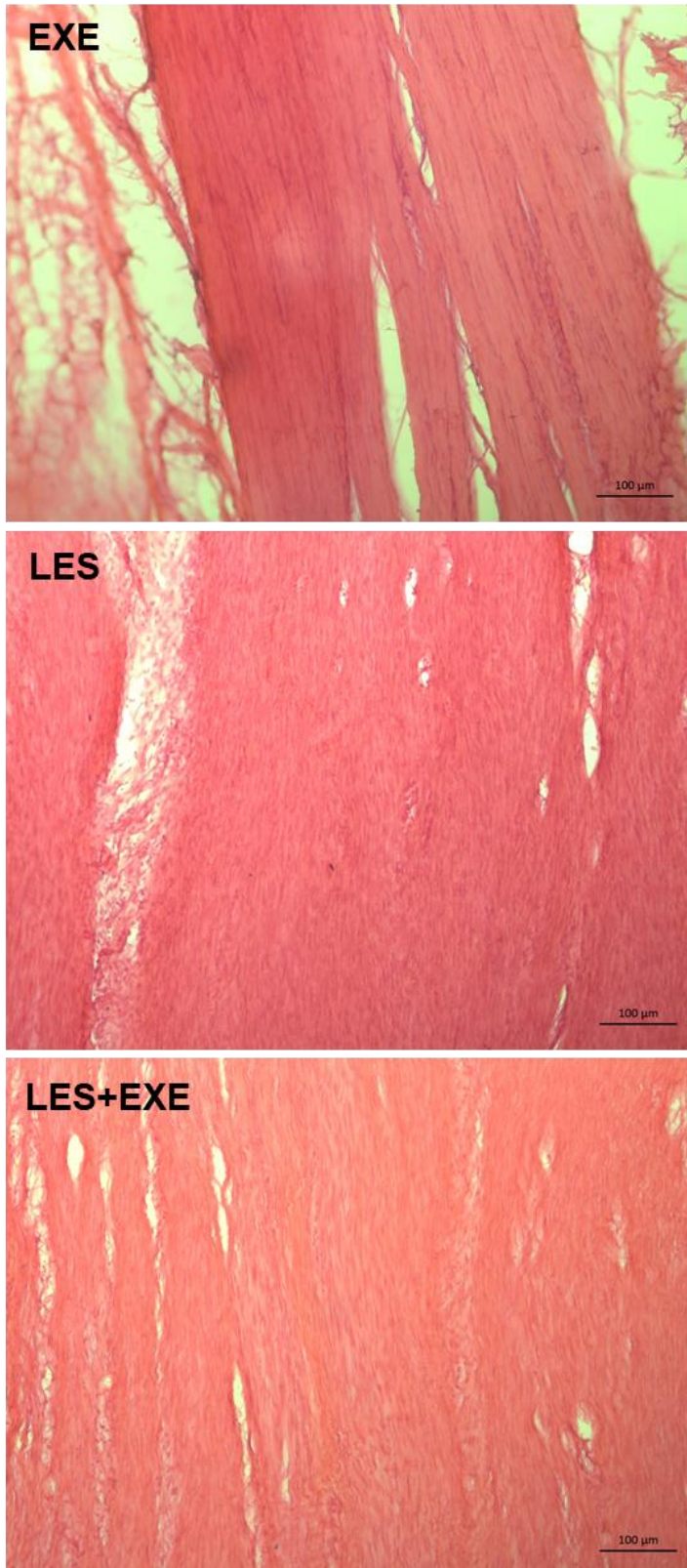
### 3.5 Análises Histológicas

Com o intuito de identificar as alterações ocorridas nos tendões dos grupos experimentais em 14 dias pós lesão, avaliamos sob microscopia de fluorescência os cortes histológicos pela autofluorescência do colágeno e em microscopia de luz por marcação com HE (Figura: 5 e 6). Das amostras histológicas marcadas com HE, podemos observar que o grupo exercício apresenta o tecido com fibras de colágeno organizadas dispostas em sentido longitudinal e com poucas células de formato fusiforme. No grupo lesão já indentificamos uma maior densidade de células com formato arredondado, regiões de degeneração, áreas de desorganização da matriz porém apresentando áreas que estão tendendo a organização das fibras de colágeno. O grupo lesão+exercício apresentou características semelhantes ao grupo lesão, onde identifica-se pontos de degeneração tecidual, pontos de organização na matriz, e uma grande densidade de células quando comparado ao grupo exercício (figura 5).

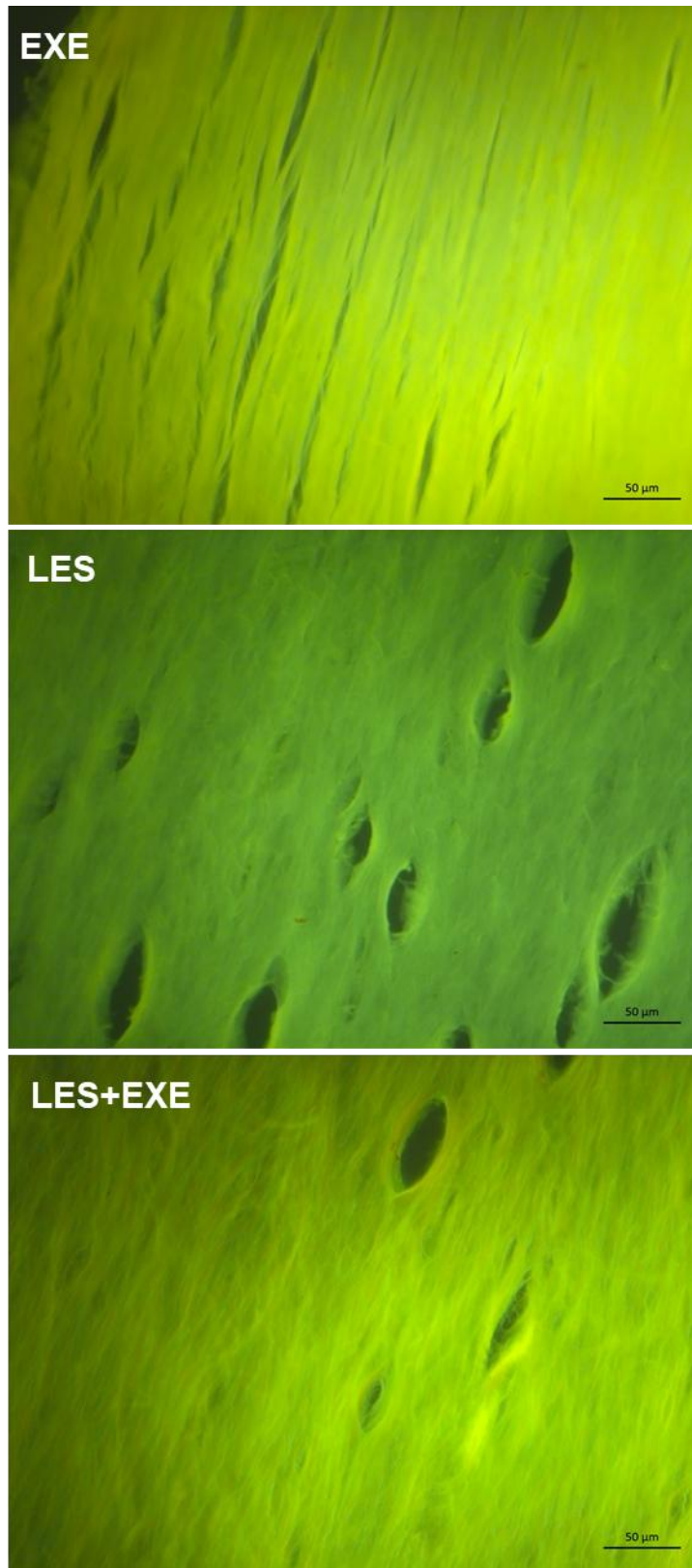
Nas fotomicrografias da autofluorescência do colágeno, observamos que o grupo exercício apresentou as fibras de colágeno organizadas e densas de acordo com a intensidade da fluorescência, demonstrando predomínio de colágeno no tecido. No grupo lesão, é perceptível uma menor intensidade de fluorescência inferindo uma menor quantidade de colágeno, além de pontos de degeneração representados pela coloração preta vistas na imagem.

O grupo lesão+exercício apresentou maior intensidade de fluorescência semelhante ao grupo exercício, porém com pontos de degeneração semelhantes ao encontrado no grupo lesão (figura 6).

As imagens histológicas estão apresentadas consecutivamente em grupo exercício (EXE), lesão (LES) e lesão+exercício (LES + EXE).



**FIGURA 5:** Estrutura do tendão em 14 dias. Marcação em HE. Objetiva de 20X, barra de escala 100µm.



**FIGURA 6:** Estrutura do colágeno em 14 dias. Autofluorescência do colágeno em verde. Objetiva de 10 X, barra da escala 50µm.

## 4 DISCUSSÃO

A lesões nos tendões são frequentes em pessoas que possuem uma rotina de exercício físico intensa. Esse tipo de alteração no tendão podem afetar a estrutura deste tecido bem como a funcionalidade, comprometendo as atividades de vida diária e/ou rotina intensa de treinamento de um atleta, representando uma perda na rotina de atleta devido as questões financeiras e a diminuição da funcionabilidade mecânica, uma vez que, a pausa do treinamento pode afetar consideravelmente o desempenho (KADER, 2002; KUJALA, SARNA, KAPRIO, 2005; LIAN, ENGBRETSSEN, BAHR, 2005; MAFFULLI 2008; PAAVOLA et. al., 2009).

Com isso, buscou-se verificar se o exercício físico teria considerável influência positiva bioquímica, histológica e funcional no processo de reparo de tendão de Aquiles, para isso, avaliamos primeiramente a marcha dos animais por meio do Índice Funcional de Aquiles (IFA). O IFA é um teste bastante conhecido no meio científico e utilizado devido a sua confiabilidade e eficiência quanto a tempo de regeneração e em poder identificar as alterações ocorridas nas propriedades biomecânicas (MURREL, 1992; MORAES et al, 2013; SOUZA, 2015).

Em nosso trabalho, observamos que o exercício teve um efeito positivo frente a lesão do tendão calcâneo, mostrando 7 dias após a lesão que seu efeito foi benéfico ao apresentar uma menor perda funcional quando comparado ao grupo que sofreu lesão mas que não praticou exercício físico. Este resultado, corrobora o que se discute na literatura quanto a importância da reabilitação precoce por meio do uso do movimento, sendo descrito que, o uso de cargas fisiológicas são importantes para garantirem a homeostase do tendão, sob a justificativa de que a estimulação mecânica contribui para o processo de cicatrização como resultado da mecanotransdução, dada pela transmissão e conversão de um estímulo mecânico em resposta biológica através de diversos mecanismos, resultando como exemplo aumento da liberação de fatores de crescimento e aumento da síntese de colágeno (HEINEMEIER et al, 2007; OLIVEIRA et al, 2012; HUISMAN et al, 2014; MOUSAVIZADEH et al, 2014).

A perda funcional decorrente da lesão é descrita por estar relacionada a alterações na morfologia deste tecido, caracterizado por uma matriz constituída por 65 a 80% de colágeno, dos quais, 95% é de colágeno tipo I, que após a lesão apresenta uma perda significativa deste quantitativo, comprometendo sua capacidade tensiva, uma vez que, é o colágeno que garante a resistência necessária para suportar a carga mecânica que este tecido é submetido atribuída a sua função (RILEY, 2004). E, como já citado que a submissão a cargas mecânicas no processo de reparo estimulam a síntese de colágeno, nesse estudo, nos resultados da autofluorescência do colágeno pode-se observar este efeito, onde a grupo lesão+exercício apresentou maior densidade na malha colágena semelhante ao grupo que não sofreu lesão, em contrapartida o grupo lesão demonstrou menor densidade de colágeno, característico à lesão (BANK et al, 1999).

O tecido sadio apresenta fibras de colágeno organizadas, dispostas no sentido longitudinal do tecido com um número pequeno de células com formato fusiforme, porém, em quadro de lesão é visto uma desorganização da matriz e aumento excessivo da quantidade de células que então passam a apresentar um formato arredondado (SHARMA, MAFULLI, 2006).

Em nossos resultados podemos observar esta estrutura do tecido sadio no grupo exercício e as alterações nessas estruturas quando lesionado representados nas fotomicrografias da marcação por HE nos grupos lesão e lesão+exercício. Nesse grupos é possível identificar áreas de desorganização, porém em maior área podemos identificar uma tendência a reorganização das fibras colágenas. Em ambos os grupos que sofreram lesão vemos que 14 dias após a lesão apresentam pontos de degeneração característico desta fase de reparo, denominado de fase proliferativa, fase esta atribuída a intensa proliferação celular responsáveis pela síntese da nova matriz que se dará na fase subsequente de remodelagem. Com isto, apontamos que o exercício não influenciou nestes processos específicos (BRING, 2007).

No que se refere as concentrações bioquímicas do lactato, foram identificados níveis aumentados no primeiro dia de análise (antes da lesão) nos grupo que foram submetidos ao protocolo de exercício físico quando comparado ao grupo que não foi submetido ao exercício físico, enquadrando nosso protocolo em

exercício de alta intensidade. Estes valores estão de acordo com a literatura que aponta o valor de 3mmol/L como valor máximo de lactato em estado estável sem acúmulo contínuo de lactato no sangue. Em contrapartida valores acima deste valor representam um acúmulo de lactato no sangue como visto neste trabalho nos grupos exercício e lesão+exercício (FERREIRA et al, 2007; AGUIAR et al, 2010).

Diante disto, esperava-se que estes valores aumentados de lactato pudessem atuar no processo de reparo do tendão, uma vez descrito, que esses níveis se mantêm aumentados por uma a duas horas após exercício, entretanto, os valores obtidos em 7 e 14 dias após a lesão mostraram-se abaixo do valor máximo referente ao estado estável (JÚNIOR 2010). Neste contexto, Martins et al (2016) observou efeito semelhante em estudo feito com camundongos descrevendo que com a repetição do exercício o lactato tende a diminuir, indicando aumento induzido pelo exercício no metabolismo oxidativo muscular (FERREIRA et al, 2007). Desta forma, apesar da relação direta do lactato com a síntese de colágeno, neste estudo não foi possível atribuir tal melhora identificada nas micrografias da autofluorescência ao lactato.

No estudo, percebe-se que os valores glicêmicos não foram alterados de forma crônica com a prática do exercício físico, visto que, os valores permaneceram na faixa de valores padrão e não significativamente como esperado. Nos exercício com intensidades altas a glicemia pode sofrer aumentos de sete a dez vezes em relação aos valores em repouso, e, o consumo da glicose aumenta com a elevação da intensidade do exercício (BARBOSA, NAVARRO, 2009).

Porém, os valores obtidos neste estudo da glicemia juntamente com o indicativo de exercício não intenso atribuído aos valores de lactato, corrobora a literatura pela indicação de que um esforço leve a moderado não provoca acúmulo de glicose livre, pois toda a glicose captada está sendo consumida pelo exercício (BARBOSA, NAVARRO, 2009). Sendo assim, considera-se a impossibilidade de afirmar que a glicemia modulou o processo de cicatrização do tendão calcâneo neste estudo.

## **5 CONCLUSÃO**

Concluimos com este estudo que o protocolo de exercício realizado não demonstrou efeito significativo estatisticamente de variação nos níveis de lactato e glicemia em 7 e 14 dias após a lesão do tendão calcâneo, entretanto, contribui para o processo de reparo do tendão calcâneo apresentando uma menor perda funcional em 7 e 14 dias após a lesão, e, a manutenção da malha colágena analisada em 14 dias pós lesão.

## REFERENCIAS

AGUIAR JR, A. S. et al. High-intensity physical exercise disrupts implicit memory in mice: involvement of the striatal glutathione antioxidant system and intracellular signaling. **Neuroscience**, v. 171, n. 4, p. 1216-1227, 2010.

AFONSO, Márcia et al. Respostas metabólicas agudas ao exercício físico moderado em ratos wistar. **Motriz**, v. 9, n. 2, p. 87-92, 2003.

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.

BARBOSA, Diogo Dutra; NAVARRO, Francisco. Variação da curva glicêmica nos diferentes trabalhos com pesos, reforço muscular e hipertrofia. **RBPFEEX-Revista Brasileira de Prescrição e Fisiologia do Exercício**, v. 3, n. 17, 2009.

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.

BOTTEON, P. de T. L. Lactato na medicina veterinária—atualização conceitual. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 34, n. 4, p. 283-287, 2012.

BORBA, Victória Zeghbi C.; LAZARETTI-CASTRO, Marise. Osteoporose induzida por glicocorticóide. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 43, n. 6, p. 452-456, 1999.

DE MORAES BERTUZZI, R. C. et. al. Metabolismo do lactato: uma revisão sobre a bioenergética e a fadiga muscular. **Rev Bras Cineantropom Desempenho Hum**, v. 11, n. 2, p. 226-234, 2009.

FERREIRA, Julio CB et al. Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 34, n. 8, p. 760-765, 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.

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.

GLADDEN, L. B. Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium. **The Journal of physiology**, v. 558, n. 1, p. 5-30, 2004.

HUNT, T. K. et. al. Anaerobic metabolism and wound healing: an hypothesis for the initiation and cessation of collagen synthesis in wounds. **The American Journal of Surgery**, v. 135, n. 3, p. 328-332, 1978.

KADER, D., et al. "Achilles tendinopathy: some aspects of basic science and clinical management." **British journal of sports medicine** 36.4 (2002): 239-249.

KORNTNER, Stefanie et al. A high-glucose diet affects Achilles tendon healing in rats. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 780, 2017.

KUJALA, Urho M., Seppo Sarna, and Jaakko Kaprio. "Cumulative incidence of achilles tendon rupture and tendinopathy in male former elite athletes." **Clinical Journal of Sport Medicine** 15.3 (2005): 133-135.

KUPHAL, K. E., FIBUCH, E. E., TAYLOR, and B. K. "Extended swimming exercise reduces inflammatory and peripheral neuropathic pain in rodents." **The Journal of Pain**, v.8.12 (2007): 989-997.

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

MARTINS, Daniel F. et al. High-intensity swimming exercise decreases glutamate-induced nociception by activation of G-protein-coupled receptors inhibiting phosphorylated protein kinase A. **Molecular neurobiology**, v. 54, n. 7, p. 5620-5631, 2016.

, M.D.; VAN EL, B; DEGROOT, J; JAHR, H; VAN SCHIE , H. T. M.; VAN ARKEL , E. R.; TOL MOS, 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**.

MORAES, Suellen AS et al. Local NO synthase inhibition produces histological and functional recovery in Achilles tendon of rats after tenotomy. **Cell and tissue research**, v. 353, n. 3, p. 457-463, 2013.

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

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

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

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

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

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

SOUZA, M. C. de et al. O tratamento com ácido ascórbico acelera o processo de reparo do tendão calcâneo em modelo de lesão tendínea em ratos. 2015.