



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

MARCOS DOS SANTOS DE ALMEIDA

**“O EFEITO DA ELETROACUPUNTURA NOS PONTOS
ZUSANLI (E-36) E CHENGSHAN (B-57) SOBRE O
PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DO TENDÃO CALCÂNEO
DE RATOS APÓS TENOTOMIA PARCIAL: UMA ANÁLISE
BIOQUÍMICA E MORFOLÓGICA”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Marcos dos Santos
de Almeida
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Biologia Celular e
Estrutural, na área de Anatomia.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Edson Rosa Pimentel".

Orientador: Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel

Campinas, 2011

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

AL64e

Almeida, Marcos dos Santos de
O efeito da eletroacupuntura nos pontos Zusanli (E-36) e Chengshan (B-57) sobre o processo de cicatrização do tendão calcâneo de ratos após tenotomia parcial: uma análise bioquímica e morfológica / Marcos dos Santos de Almeida. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Edson Rosa Pimentel.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Eletroacupuntura. 2. Colágeno. 3. Matriz extracelular. 4. Cicatrização tendínea. I. Pimentel, Edson Rosa, 1949-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(scs/ib)

Título em inglês: The effect of electroacupuncture at acupoints Zusanli (ST-36) and Chengshan (UB-57) on the healing process of Achilles tendon of rats after partial tenotomy: a biochemical and morphological analysis.

Palavras-chave em inglês: Electroacupuncture; Collagen; Extracellular matrix; Tendon healing.

Área de concentração: Anatomia.

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Edson Rosa Pimentel, Nivaldo Antônio Parizotto, Tatiana Carla Tomiosso.

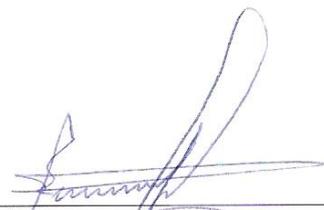
Data da defesa: 25/02/2011.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 25 de Fevereiro de 2011.

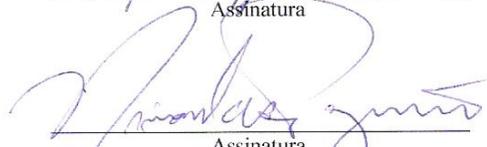
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel (Orientador)



Assinatura

Profa. Dra. Nivaldo Antonio Parizotto



Assinatura

Profa. Dra. Tatiana Carla Tomiosso



Assinatura

Profa. Dra. Silvia Borges Pimentel de Oliveira

Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Augusto Marretto Esquisatto

Assinatura

Em qualquer departamento da vida é necessário amar para entender e construir. Se forçamos a posse disto ou daquilo, tão somente reteremos a sombra ou a casca daquilo ou disto, porquanto, escoada a energia que mantém o processo de violência, perdemos de imediato o domínio da posição que intentamos assegurar.

A força tiraniza.

O amor reina.

(Emmanuel)

Dedicatória

Aos meus pais, Mauro e Maria Regina, pela presença e pelo apoio.

Aos professores, pela sabedoria.

À Lívia, pela força e pelo companheirismo

Aos amigos, pelo prazer da convivência.

Agradecimentos

A Deus, acima de tudo, por ser fonte eterna, perfeita e imutável de amor e sabedoria.

Aos espíritos amigos, pela proteção, inspiração e energia para superar os momentos de tormenta.

Ao Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel, pela sua amizade, pelos ensinamentos e pela sua constante dedicação aos seus alunos e ao seu laboratório.

À Profa. Dra. Laurecir Gomes pelas sugestões e pelo incentivo para as conquistas no mundo acadêmico e científico.

À Profa. Dra Heidi pela permissão para o uso de seu laboratório e pela convivência agradável no dia a dia.

Ao Prof. Dr. Benedito de Campos Vidal pelas análises feitas no meu material e por transmitir seu grande conhecimento em microscopia de polarização.

Ao técnico Francisco Ângelo Mallatesta pela paciência e dedicação em ensinar, as quais foram imprescindíveis para o desenvolvimento deste trabalho.

À secretária do programa de pós-graduação Lílian Panagio, pela dedicação, competência, simpatia, boa vontade e paciência ao longo de nossa convivência.

Aos amigos do laboratório de Matriz Extracelular, Andrea, Flávia e Cristiano, primeiramente pela amizade e também pelo fundamental apoio que me cederam na nossa convivência diária tanto dentro quanto fora da Universidade.

Aos demais amigos do departamento, Marcos, Fabrícia, Karina, Juliana, Pedro, Rodrigo e Cidinha pelo acolhimento, pelos conhecimentos e pela ótima convivência.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural e a CAPES/PROEX pela Bolsa e auxílio financeiro.

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
INTRODUÇÃO.....	10
1. A estrutura do tendão.....	10
1.1. As bainhas conjuntivas tendíneas.....	10
1.2. As inserções tendíneas.....	11
2. A composição do tendão.....	12
2.1. O Colágeno.....	12
2.2. Os proteoglicanos.....	13
2.3. As proteínas não colagênicas.....	14
2.4. As células.....	14
3. A epidemiologia das lesões do tendão calcâneo.....	15
4. A etiologia das lesões no tendão calcâneo.....	16
5. O processo de cicatrização do tendão.....	17
5.1. A fase inflamatória.....	17
5.2. A fase proliferativa.....	18
5.3. A fase de remodelamento.....	19
5.4. As metaloproteases.....	20
6. A eletroacupuntura.....	20
OBJETIVOS.....	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24
RESULTADOS:.....	31
Artigo: O efeito da Eletroacupuntura no processo de reparo de tendões parcialmente transeccionados.....	32
CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	63
ANEXO 1.....	65

RESUMO

A eletroacupuntura (EA) tem sido utilizada amplamente para o tratamento de uma variedade de doenças inflamatórias e para o alívio da dor. No entanto, não há relatos na literatura sobre o efeito da EA na composição e organização da matriz extracelular (MEC) de tendões em processo de cicatrização. **Objetivo:** Investigar através de análises bioquímicas e morfológicas, o efeito da EA durante o pico de síntese dos componentes da MEC, 15 dias após transecção parcial do tendão calcâneo de ratos. **Materiais e Métodos:** Ratos Wistar machos com 60 dias de idade foram divididos em 3 grupos: Não tenotomizados (G1), tenotomizados (G2) e tenotomizados e submetidos a EA (G3). Agulhas de acupuntura (AC) foram inseridas nos pontos E-36 e B-57 e uma corrente elétrica com onda farádica bipolar assimétrica na frequência de 2 Hz e intensidade de 2-4 Volts foi aplicada nas agulhas por 20 minutos, 3 vezes por semana em dias alternados, em um total de 6 sessões. Análises bioquímicas foram feitas através da SDS-PAGE, dosagem de proteínas não colagênicas (PNCs), glicosaminoglicanos (GAGs) e hidroxiprolina. Análise da metaloproteinase-2 (MMP-2) foi realizada por zimografia. Para análise morfológica em microscopia de luz comum, os cortes foram corados com hematoxilina-eosina (HE) e azul de toluidina (AT). Para análise em microscopia de polarização os cortes foram corados com Ponceau SS e a birrefringência foi avaliada em termos de valor de média de cinza em pixels utilizando um analisador de imagem. **Resultados:** EA nos pontos utilizados não alterou a concentração de PNCs, GAGs ou a atividade enzimática da MMP-2 nos tendões transecionados. Já a concentração de hidroxiprolina foi significativamente aumentada nestes tendões quando tratados com EA. Na análise morfológica nos cortes corados com HE e AT, aparentemente não houve alterações na composição nem na organização da MEC. No entanto, na análise da birrefringência houve uma maior reorganização das fibras de colágeno no grupo tratado com EA. **Conclusão:** Nossos resultados indicam que a EA pode oferecer benefícios terapêuticos para o tratamento de lesões tendíneas através do aumento do conteúdo do colágeno e da reorganização molecular de suas fibras.

ABSTRACT

Electroacupuncture (EA) has been used to treat a variety of inflammatory diseases and pain relief. Therefore, there are no reports in the literature about the effect of EA on the composition and organization of the extracellular matrix (ECM) of tendons in the healing process. **Objective:** To investigate by morphological and biochemical analysis, the effect of EA during the peak of synthesis of ECM components, 15 days after partial transection of the Achilles tendon of rats. **Methods:** Male Wistar rats with 60 days old were divided into three groups: no tenotomized (G1), tenotomized (G2) and tenotomized and submitted to EA (G3). Acupuncture (AC) needles were inserted in the E-36 and B-57 points and an electrical current with asymmetrical bipolar faradic wave at frequency of 2 Hz and intensity of 2-4 Volts was applied to the needles for 20 minutes, 3 times per week on alternate days, for a total of 6 sessions. Biochemical analyses were done by SDS-PAGE, dosage of non collagenous proteins (NCPs), glycosaminoglycans (GAGs) and hydroxyproline. Analysis of metalloproteinase-2 (MMP-2) was carried out by zymography. For morphological analyses, the sections were stained with hematoxylin-eosin (HE) and toluidine blue. For polarization microscopy analysis the sections were stained with Ponceau SS and birefringence was evaluated in terms of gray average values in pixels using an image analyzer. **Results:** EA at points used did not alter the concentration of NCPs, GAGs or the enzymatic activity of MMP-2 in transected tendons. However, the concentration of hydroxyproline was significantly increased when these tendons were treated with EA. In the morphological analysis, apparently there were no changes in the composition and organization of the ECM. However, analysis of the birefringence showed higher reorganization of collagen fibers in the group treated with EA. **Conclusion:** Our results indicate that EA may offer therapeutic benefits for treatment of tendon injuries by increasing the content of collagen and the molecular reorganization of its fibers.

INTRODUÇÃO

1. A estrutura do tendão

Os tendões são estruturas mecanicamente responsáveis por transmitir a força gerada nos músculos ao osso, permitindo desta forma a locomoção e a estabilidade articular (WANG, 2006). O tendão calcâneo (também chamado tendão de Aquiles) é o maior e mais forte do corpo humano, sendo formado pela porção tendínea dos músculos gastrocnêmicos e sóleo (JARVINEN et al., 2005). O tendão calcâneo, assim como outros tendões, possui níveis estruturais hierárquicos de complexidade crescente começando com o tropocolágeno, uma cadeia polipeptídica em tripla hélice, a qual se une em fibrilas; fibras (feixes primários); fascículos (feixes secundários); feixes terciários e o tendão propriamente dito (SHARMA; MAFFULLI, 2006). Moléculas de tropocolágeno solúvel formam pontes cruzadas para criar moléculas de colágeno insolúvel as quais se agregam para formar fibrilas de colágeno. Já a fibra de colágeno, é a menor unidade do tendão que pode ser testada mecanicamente e visível na microscopia de luz (JÓZSA et al., 1991).

1.1. As bainhas conjuntivas tendíneas

O epitendão é uma fina bainha de tecido conjuntivo frouxo contendo o suprimento vascular, linfático e nervoso do tendão. Cobre todo o tendão e se estende para o seu interior entre os feixes terciários, recebendo então o nome de endotendão, o qual é uma fina camada reticular de tecido conjuntivo envolvendo cada fibra tendínea (KASTELIC et al., 1978).

Além das duas bainhas citadas, os tendões também são envolvidos por uma terceira camada de tecido conjuntivo chamada de paratendão. O epitendão e o paratendão compõem o chamado peritendão, o qual reduz o atrito com o tecido adjacente (SCHATZKER; BRANEMARK, 1969). O espaço entre essas duas camadas contém líquido rico em mucopolissacarídeos que fornece a lubrificação, evita a fricção e protege o tendão reduzindo o atrito (KJAER et al., 2003).

1.2. As inserções tendíneas

Tendões, na sua grande maioria, conectam ossos e músculos em suas extremidades. Existem também tendões conectando um ventre muscular a outro como é o caso das interseções tendíneas do músculo reto abdominal (LATARJET; LIARD, 1996). A junção do tendão com o osso é chamada de entese e esta pode suportar forças de tração, compressão e cisalhamento, sendo estimado que as forças de tensão neste sítio podem ser quatro vezes maior do que no corpo do tendão (McGONAGLE et al., 2003). A junção mio-tendínea transfere a força muscular para o tendão, onde a rede de colágeno do perimísio (bainha conjuntiva que envolve o músculo) forma a base da ligação mecânica entre o tendão e a fibra muscular através de placas juncionais perimisiais especializadas (PASSERIEUX et al., 2006; PASSERIEUX et al., 2007). Nesta junção, as fibrilas colágenas do tendão estão inseridas em recessos profundos formados pelos miofibroblastos, o que permite que as forças de tração geradas pelas proteínas contráteis das fibras musculares sejam transmitidas às fibras de colágeno do tendão (MICHNA, 1983; TIDBALL, 1991). Essa estrutura também reduz a tensão no tendão durante a contração

muscular, porém, é o ponto mais fraco da unidade músculo-tendínea (JÄRVINEN et al., 1991; GARRETT, 1990).

2. A composição do tendão

Os tendões são constituídos de colágeno, proteoglicanos, proteínas não colagênicas, água e células.

2.1. O Colágeno

Os tendões são ricos em colágeno, com o componente mais abundante do tendão sendo o colágeno tipo I, o qual constitui cerca de 60% da massa seca do tendão e cerca de 95% do colágeno total (EVANS, BARBENEL, 1975; RILEY et al., 1994). Os restantes 5% consistem em colágenos do tipo III e V. Em tendões normais, o colágeno tipo III está localizado principalmente no endotendão e epitendão, formando fibrilas pequenas e menos organizadas (LAPIERE et al., 1977; DUANCE et al., 1977). O colágeno tipo V é intercalado dentro da estrutura das fibrilas do colágeno tipo I e regula o crescimento da fibrila (BIRK et al., 1990). Outros colágenos incluindo os tipos II, VI, IX, X e XI, estão presentes em quantidades vestigiais nos tendões (FUKUTA et al., 1998). Esses colágenos são encontrados principalmente no local de inserção óssea de fibrocartilagem, onde eles reforçam a conexão através da redução da concentração de tensões na interface tecidual (WAGGETT et al., 1998). A unidade estrutural básica do colágeno é o tropocolágeno, que é uma proteína longa e fina produzida dentro da célula e secretada na matriz extracelular

(MEC) como procolágeno. O modelo de Trelstad e Birk (1986), demonstra que somente o procolágeno não clivado é transferido do compartimento intracelular para o extracelular, onde a morfogênese do colágeno é concluída. Os colágenos na matriz estão ligados entre si por ligações cruzadas que aumentam o módulo de elasticidade (módulo de Young) do tendão e diminui a sua tensão na ruptura (THOMPSON; CZERNUSZKA, 1995).

2.2. Os proteoglicanos

Os proteoglicanos (PGs) são formados por glicosaminoglicanos (GAGs) os quais são polissacarídeos sulfatados que possuem uma seqüência de repetição dissacarídica característica. Com exceção do ácido hialurônico, as cadeias de GAGs são geralmente ligadas covalentemente a um resíduo de serina de uma proteína através de um tetrassacarídeo específico sendo o complexo resultante chamado de PG (MAGNUS et al., 1994). O conteúdo de PGs varia de acordo com o sitio do tendão e depende das condições de carga mecânica (região de tensão ou de compressão) do tendão (BERESSON et al., 1996). Por exemplo, em regiões de compressão do tendão flexor digital profundo de bovinos, o conteúdo de PGs é de 3,5% do peso seco do tendão (VOGEL; KOOB, 1989). Em contraste, na região de tensão deste mesmo tendão, a quantidade de PGs representa cerca de 0,2 a 0,5% do peso seco do tendão (KOOB; VOGEL, 1987).

Os PGs desempenham funções diversas nos tecidos por causa da variabilidade da proteína central e dos diferentes tipos de GAGs (IOZZO; MURDOCH, 1996). Decorin e fibromodulin são exemplos de pequenos PGs que participam da regulação da fibrilogênese

do colágeno (HEDBOM; HEINEGARD, 1989), desempenhando uma importante função nas propriedades estruturais e funcionais dos tecidos (VOGEL; FISHER, 1986).

2.3. As proteínas não colagênicas

Existem várias proteínas não colagênicas (PNCs) presentes na MEC do tendão sendo a tenascina-C e a fibronectina algumas delas. A tenascina-C contribui para a estabilidade mecânica da MEC através da sua interação com as fibrilas de colágeno (ELEFTERIOU et al., 2001). A fibronectina está localizada na superfície dos colágenos, e sua síntese aumenta para facilitar a cicatrização de feridas. Além desses componentes, os tendões contêm elastina, que compõe cerca de 2% do peso seco do tendão (JÓZSA et al., 1989). As fibras elásticas, que compreendem a elastina e proteínas microfibrilares, podem contribuir para a recuperação da configuração ondulada das fibras colágenas após o alongamento (BUTLER et al., 1978).

2.4. As células

Embora células endoteliais, sinoviais e condrócitos estejam presentes nos tendões, os fibroblastos (tenoblastos e tenócitos) são o tipo celular dominante, os quais se alinham em fileiras entre os feixes de fibras colágenas. Tenoblastos são células tendíneas imaturas em forma de fuso, contendo abundantes organelas citoplasmáticas, refletindo sua alta atividade metabólica. Essas células se tornam alongados com o passar do tempo e passam a ser chamados de tenócitos. Juntos, tenoblastos e tenócitos correspondem de 90% a 95% dos

elementos celulares do tendão (ABATE et al., 2009). Os tenoblastos e tenócitos são responsáveis pela síntese de proteínas da MEC (por exemplo, colágenos, fibronectina e PGs), produzindo uma matriz de colágeno organizada e remodelando-a durante a cicatrização do tendão. Estas células comunicam-se através de junções do tipo *gap* com conexinas 32 e 43 (McNEILLY et al., 1996).

3. Epidemiologia da lesão do tendão calcâneo

No que diz respeito à incidência de lesões tendíneas em geral, houve um aumento substancial durante as últimas décadas. Estima-se que estas lesões somem 30% a 50% de todas as lesões relacionadas aos esportes (JÄRVINEN et al., 2005). As lesões dos tendões são comuns e responsáveis por uma elevada proporção de encaminhamentos para reumatologistas e cirurgiões ortopédicos (BAMJI et al., 1990). Os tendões mais freqüentemente envolvidos são os do manguito rotador (tendão do músculo supra-espinhal em particular), do músculo bíceps braquial no ombro, dos músculos extensores e flexores do punho no antebraço, o tendão patelar no joelho, o tendão calcâneo na perna e o tendão do tibial posterior do tornozelo e pé (ABATE et al., 2009; RILEY, 2008).

Com o aumento das atividades atléticas recreativas e organizadas ao longo das últimas duas décadas, a incidência de lesões do tendão calcâneo tem aumentado dramaticamente sendo que estas lesões têm sido divididas em lesões por uso excessivo (lesão crônica) e rupturas espontâneas (JÄRVINEN et al., 2005; JÄRVINEN et al., 2001; KANNUS, NATRI, 1997; MAZZONE, MCCUE, 2002). Nas primeiras, o termo utilizado

para descrever as lesões é tendinopatia e sua etiologia está intimamente relacionada ao esporte e ao exercício excessivo (JÄRVINEN et al., 2005).

4. Etiologia das lesões no tendão calcâneo

Geralmente, as lesões do tendão calcâneo surgem de duas diferentes origens: Primeira - alguns sintomas são causados exclusivamente pela lesão ou degeneração do tendão calcâneo (sem qualquer doença sistêmica predisponente) as quais são induzidas pelo uso excessivo; segunda - por vezes, uma doença sistêmica, como a artrite reumatóide, se manifesta com sintomas no tendão calcâneo (JÄRVINEN et al., 2005). Apenas em torno de 2% de todas as lesões e complicações no tendão calcâneo é o resultado de uma doença sistêmica. A maioria dos problemas tendíneos na população pode ser atribuída ao esporte e ao exercício excessivo (JÄRVINEN et al., 2005; KANNUS, JOZSA, 1991).

Como citado, o uso excessivo é a principal causa de tendinopatia levando a microrupturas e inflamação. A MEC do tendão normal é mantida por um processo contínuo de remodelamento, no entanto, o uso excessivo altera esse processo iniciando a tendinopatia. Outros fatores, chamados de fatores intrínsecos e extrínsecos podem atuar de forma isolada ou em combinação no desenvolvimento da tendinopatia (KANNUS; NATRI, 1997). Alguns dos fatores intrínsecos relacionados à tendinopatia do tendão calcâneo no esporte são: fatores gerais (sexo, idade, sobrepeso, biótipo, grupo sanguíneo, doenças predisponentes e suprimento sanguíneo) e fatores anatômicos nos membros inferiores (mau alinhamento, discrepância no comprimento dos membros inferiores, fraqueza ou desequilíbrio muscular, diminuição da flexibilidade e frouxidão articular). Dentre alguns

fatores extrínsecos podemos citar: drogas (uso de corticosteróides, antibióticos, esteróides anabolizantes) fatores que levam a sobrecarga sobre os membros inferiores (calçados, tipo de movimento e superfície de treinamento), erros de treinamento (alta intensidade, fadiga e erro na execução da técnica) e condições ambientais (temperatura, altitude e equipamento inadequado) (JÄRVINEN et al., 2005). Em caso de trauma agudo, predominam os fatores extrínsecos, enquanto que lesões de uso excessivo geralmente são multifatoriais. Nos distúrbios crônicos do tendão, uma interação entre estes dois tipos de fatores é comum (KANNUS; NATRI, 1997). Sendo assim, pode-se dizer que a etiologia básica da tendinopatia do tendão calcâneo é multifatorial, uma vez que vários fatores extrínsecos e intrínsecos foram identificados predispondo a essas lesões (KANNUS, NATRI, 1997; JÄRVINEN et al., 2001).

5. O processo de cicatrização do tendão

A cicatrização do tendão pode ser dividida em três fases que se sobrepõem: a fase inflamatória, proliferativa e de remodelamento (WOO et al., 1999).

5.1. A fase inflamatória

A fase inflamatória aguda dura entre 3 a 7 dias após a lesão, iniciando-se com hematoma e ativação de plaquetas (ABATE et al., 2009). Na fase inflamatória inicial, que dura cerca de 24 horas, hemácias, plaquetas e células inflamatórias, particularmente neutrófilos, entram no sitio da lesão. Monócitos e macrófagos migram para o local da ferida

para fagocitar materiais necrosados. Nesse meio tempo, essas células liberam substâncias vasoativas e fatores quimiotáticos, que aumentam a permeabilidade vascular, iniciam a angiogênese, estimulam a proliferação de tenócitos, recrutam mais células inflamatórias e fibroblastos para começar a síntese de colágeno e deposição. Os tenócitos gradualmente migram para a lesão e iniciam a síntese de colágeno tipo III (WANG, 2006; SHARMA, MAFFULLI, 2006).

5.2. A fase proliferativa

A fase de reparo ou proliferativa dura entre 5 a 21 dias. Ocorre um pico de síntese de colágeno tipo III nesta fase, o qual persiste durante algumas semanas. Nesta fase os fibroblastos sintetizam colágeno de maneira abundante, que gradualmente aumenta a força mecânica do tendão de modo que cargas podem levar a deformação elástica, a qual permite que a sinalização mecânica comece a influenciar o processo. Nesta fase inicia-se também a fibrilogênese. Inicialmente, há uma montagem das moléculas de colágeno no meio extracelular, em estreita proximidade com os fibroblastos, para formar fibrilas imaturas. Então ocorre uma montagem das fibrilas de extremidade a extremidade (*end to end*) para formar fibrilas longas (crescimento linear). No próximo passo, as fibrilas associam-se lateralmente para gerar fibrilas de grande diâmetro (crescimento lateral). As fibrilas associam-se em fibras, cujas coalescências finalmente formam fibras muito largas, as quais são características dos tendões. A grande área transversa compensa a fraqueza tecidual (ABATE et al., 2009; SHARMA, MAFFULLI, 2006). Outros componentes da MEC, como

PGs, são depositados no local da lesão. Durante esta fase, o teor de água e concentração de GAGs permanecem elevados (WANG, 2006).

5.3. A fase de remodelamento

Após cerca de 6 semanas, começa a fase de remodelamento a qual pode durar acima de uma ano. Esta fase é caracterizada pela diminuição da celularidade e diminuição da síntese de colágeno e de GAGs. Uma grande proporção de colágeno tipo I é sintetizada durante essa fase. Durante este período, o tecido reparado muda para tecido fibroso, que novamente muda para tecido cicatricial após 10 semanas. Durante a fase de remodelamento tardia, ligações covalentes entre as fibras colágenas aumentam, o que resulta em tecido reparado com maior rigidez e força tensil. Além disso, tanto o metabolismo dos tenócitos quanto a vascularização do tendão diminuem (WANG, 2006). A cicatrização do tendão pode ocorrer intrinsecamente, via proliferação dos tenócitos do epitendão e do endotendão, ou extrinsecamente, pela invasão de células da bainha sinovial. Cicatrização intrínseca resulta em melhora biomecânica e menos complicações. Em particular, o mecanismo normal de deslizamento dentro da bainha do tendão é preservado. Na cicatrização extrínseca, o tecido cicatricial resulta na formação de aderências que prejudicam o deslizamento. Diferentes padrões de cicatrização podem predominar em locais específicos. Por exemplo, cicatrização extrínseca tende a prevalecer nas lesões do manguito rotador (SHARMA; MAFFULLI, 2006).

5.4. As metaloproteases

Dentre os elementos que participam do processo de reparo tendíneo, atuando ao longo das fases de cicatrização, estão enzimas como as metaloproteases (MMPs) as quais estão envolvidas no remodelamento da MEC dos tendões (KAROUSOU et al., 2008). A MMP-2 (gelatinase) digere a gelatina a qual é uma forma desnaturada de colágeno (SNOEK-VAN BEURDEN; VON DEN HOFF, 2005). É relatado na literatura que a concentração de MMP-2 está elevada até o vigésimo oitavo dia após a lesão participando tanto da degradação quanto do remodelamento do colágeno (OSHIRO et al., 2003; RILEY et al., 2002). Outras MMPs também participam do processo de reparo tendíneo, sendo que a expressão da MMP-9 e MMP-13 atingem o pico entre os dias 7 e 14, enquanto os níveis das MMP-3 e MMP-14, da mesma forma que a MMP-2, aumentam após a cirurgia e permanecem em níveis elevados até o dia 28 (OSHIRO et al., 2003).

6. Eletroacupuntura

A acupuntura (AC) pode ser definida como a inserção de agulhas na pele e tecidos subjacentes em locais específicos, conhecidos como pontos de AC, para fins terapêuticos ou de prevenção. As agulhas podem ser estimuladas manualmente, com uma corrente elétrica de baixa tensão, a chamada eletroacupuntura (EA), ou aquecendo-as com um incenso de Artemísia, de acordo com a tradição, ou com uma lâmpada de aquecimento, de acordo com a prática moderna. Segundo a medicina tradicional chinesa, existem no corpo humano 12 canais primários, chamados de meridianos, através dos quais o *Qi* (energia

vital) circula, sendo que esses meridianos conectam 360 pontos de AC principais (KAVOUSSI; ROSS, 2007). Os pontos de AC são designados pela letra inicial do meridiano o qual pertence seguido pelo número que denota sua localização no meridiano. Por exemplo, o ponto E-36 é o trigésimo sexto ponto do meridiano do estômago (YAMAMURA, 2001).

Recentemente, tem havido um interesse crescente na pesquisa sobre AC na tentativa de reinterpretar seus conceitos tradicionais de acordo com os conceitos científicos ocidentais. Estudos têm sugerido que os efeitos terapêuticos da AC possam ocorrer através da mecanotransdução, onde o sinal mecânico gerado na MEC pela manipulação da agulha de AC atinge, através do citoesqueleto, o núcleo celular de células tais como os fibroblastos, e outras células situadas dentro do tecido conjuntivo, determinando a síntese de componentes biologicamente ativos (LANGEVIN et al., 2001; LANGEVIN et al., 2006; LANGEVIN et al., 2007). Pesquisas demonstram que tanto a AC quanto a EA possuem efeitos terapêuticos, no entanto esta última técnica possui efeitos mais pronunciados (ULETT et al., 1998; YIM et al., 2007). No que diz respeito ao efeito analgésico da EA, este tem sido obtido tanto em modelos animais quanto em pacientes com dor crônica (AHSIN et al., 2009; LIU et al., 2010). Outros estudos têm demonstrado que tanto a AC quanto a EA, além de uma ação analgésica, possuem ação antiinflamatória e imunomoduladora associadas, através da participação dos sistemas: nervoso autônomo, neuroimune e neuroendócrino (GOLLUB et al., 1999; TIAN et al., 2003; ZHANG et al., 2004; KIM et al., 2006; LEE et al., 2006; KOVOUSSI, ROSS, 2007; KIM et al., 2007; YIM et al., 2007; CABIOGLU, CETIN, 2008; KIM et al., 2008; LAU et al., 2008; WANG et al., 2009). Estes estudos também demonstram que a EA é capaz de inibir mediadores pró

inflamatórios tais como a interleucina 1 β e 6 (IL-1 β e IL-6), o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), a ciclooxigenase 1 e 2 (COX1 e COX2), a isoforma indutiva da óxido nítrico sintase (iNOS) e a prostaglandina E2 (PGE2).

Devido a esses resultados relatados na literatura, a AC é atualmente uma intervenção amplamente aceita para o tratamento de uma variedade de condições, sendo suas aplicações mais difundidas o tratamento de infecções, doenças inflamatórias como a AR, disfunção autonômica, doenças neurológicas como a enxaqueca, dor, doenças cardiovasculares e pulmonares como a asma, abuso de drogas, transtornos psiquiátricos como a depressão e muitas outras doenças (ZIJLSTRA et al., 2003; ERNST, 2006; SUN et al., 2010). No entanto, não há evidência científica sobre o uso da EA no processo de cicatrização tendínea, sendo este, o primeiro estudo neste campo.

OBJETIVOS

Objetivos Gerais

1. Avaliar as alterações bioquímicas e morfológicas na fase proliferativa de cicatrização do tendão calcâneo de ratos, submetidos à tenotomia parcial e tratados com EA;
2. Comparar os resultados entre os diferentes grupos analisados neste estudo.

Objetivos Específicos

Analisar nos diferentes grupos:

1. As alterações no perfil eletroforético do colágeno e de PNCs;
2. As concentrações de PNCs, GAGs e hidroxiprolina;
3. A atividade enzimática da MMP-2;
4. Os aspectos organizacionais, celulares e metacromáticos da MEC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABATE, M. et al. Pathogenesis of tendinopathies: inflammation or degeneration? *Arthritis Res Ther*, v. 11, n. 3, p. 235, 2009.

AHSIN, S. et al. Clinical and endocrinological changes after electro-acupuncture treatment in patients with osteoarthritis of the knee. *Pain*, v. 147, n. 1-3, p. 60-6, 2009.

BAMJI, A. et al. What do rheumatologists do? A pilot audit study. *Br J Rheumatol*, v. 29, n. 4, p. 295-298, 1990.

BERENSON, M. et al. Proteoglycans of human rotator cuff tendons. *J Orthop Res*, v. 14, n. 4, p. 518-525, 1996.

BIRK, D. et al. Collagen fibrillogenesis in vitro: interaction of types I and V collagen regulates fibril diameter. *J Cell Sci*, v. 95 (Pt 4), p. 649-657, 1990.

BIRK, D.; TRELSTAD, R. Extracellular compartments in tendon morphogenesis: collagen fibril, bundle, and macroaggregate formation. *J Cell Biol*, v. 103, n. 1, p. 231-240, 1986.

BUTLER, D. et al. Biomechanics of ligaments and tendons. *Exerc Sport Sci Rev*, v. 6, p. 125-181, 1978.

CABIOĞLU, M.; CETIN, B. Acupuncture and immunomodulation. *Am J Chin Med*, v. 36, n. 1, p. 25-36, 2008.

DUANCE, V. et al. The location of three collagen types in skeletal muscle. *FEBS Lett*, v. 79, n. 2, p. 248-52, 1977.

ELEFTERIOU, F. et al. Binding of tenascin-X to decorin. *FEBS Lett*, v. 495, n. 1-2, p. 44-47, 2001.

ERNST, E. Acupuncture--a critical analysis. *J Intern Med*, v. 259, n. 2, p. 125-137, 2006.

EVANS, J.; BARBENEL, J. Structural and mechanical properties of tendon related to function. *Equine Vet J*, v. 7, n. 1, p. 1-8, 1975.

FUKUTA, S. et al. Identification of types II, IX and X collagens at the insertion site of the bovine achilles tendon. *Matrix Biol*, v. 17, n. 1, p. 65-73, 1998.

GARRETT, W. J. Muscle strain injuries: clinical and basic aspects. *Med Sci Sports Exerc*, v. 22, n. 4, p. 436-443, 1990.

GOLLUB, R. et al. Acupuncture: pain management coupled to immune stimulation. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*, v. 20, n. 9, p. 769-777, 1999.

HEDBOM, E.; HEINEGÅRD, D. Interaction of a 59-kDa connective tissue matrix protein with collagen I and collagen II. *J Biol Chem*, v. 264, n. 12, p. 6898-6905, 1989.

IOZZO, R.; MURDOCH, A. Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. *FASEB J*, v. 10, n. 5, p. 598-614, 1996.

JÄRVINEN, M. et al. How to treat knee ligament injuries? *Ann Chir Gynaecol*, v. 80, n. 2, p. 134-140, 1991.

JÄRVINEN, T. et al. Achilles tendon disorders: etiology and epidemiology. *Foot Ankle Clin*, v. 10, n. 2, p. 255-266, 2005.

_____. Achilles tendon injuries. *Curr Opin Rheumatol*, v. 13, n. 2, p. 150-155, 2001.

JÓZSA, L. et al. Alterations in dry mass content of collagen fibers in degenerative tendinopathy and tendon-rupture. *Matrix*, v. 9, n. 2, p. 140-146, 1989.

JOZSA, L. et al. Three-dimensional ultrastructure of human tendons. *Acta Anat (Basel)*, v. 142, n. 4, p. 306-312, 1991.

KANNUS, P.; JÓZSA, L. Histopathological changes preceding spontaneous rupture of a tendon. A controlled study of 891 patients. *J Bone Joint Surg Am*, v. 73, n. 10, p. 1507-1525, 1991.

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

KAROUSOU, E. et al. Collagens, proteoglycans, MMP-2, MMP-9 and TIMPs in human achilles tendon rupture. *Clin Orthop Relat Res*, v. 466, n. 7, p. 1577-1582, 2008.

KASTELIC, J. et al. The multicomposite structure of tendon. *Connect Tissue Res*, v. 6, n. 1, p. 11-23, 1978.

KAVOUSSI, B.; ROSS, B. The neuroimmune basis of anti-inflammatory acupuncture. *Integr Cancer Ther*, v. 6, n. 3, p. 251-7, 2007.

KIM, H. et al. The anti-inflammatory effects of low- and high-frequency electroacupuncture are mediated by peripheral opioids in a mouse air pouch inflammation model. *J Altern Complement Med*, v. 12, n. 1, p. 39-44, 2006.

_____. Low-frequency electroacupuncture suppresses zymosan-induced peripheral inflammation via activation of sympathetic post-ganglionic neurons. *Brain Res*, v. 1148, p. 69-75, 2007.

_____. Low-frequency electroacupuncture suppresses carrageenan-induced paw inflammation in mice via sympathetic post-ganglionic neurons, while high-frequency EA suppression is mediated by the sympathoadrenal medullary axis. *Brain Res Bull*, v. 75, n. 5, p. 698-705, 2008.

KJAER, M. et al. [Overuse injuries in tendon tissue: insight into adaptation mechanisms]. *Ugeskr Laeger*, v. 165, n. 14, p. 1438-1443, 2003.

KOOB, T.; VOGEL, K. Site-related variations in glycosaminoglycan content and swelling properties of bovine flexor tendon. *J Orthop Res*, v. 5, n. 3, p. 414-424, 1987.

LANGEVIN, H. et al. Mechanical signaling through connective tissue: a mechanism for the therapeutic effect of acupuncture. *FASEB J*, v. 15, n. 12, p. 2275-2282, 2001.

_____. Subcutaneous tissue fibroblast cytoskeletal remodeling induced by acupuncture: evidence for a mechanotransduction-based mechanism. *J Cell Physiol*, v. 207, n. 3, p. 767-774, 2006.

_____. Connective tissue fibroblast response to acupuncture: dose-dependent effect of bidirectional needle rotation. *J Altern Complement Med*, v. 13, n. 3, p. 355-60, 2007.

LAPIERE, C. et al. Interaction between collagen type I and type III in conditioning bundles organization. *Connect Tissue Res*, v. 5, n. 1, p. 21-29, 1977.

LATARJET, M.; RUIZ LIARD, A. *ANATOMIA HUMANA*. 2. ed. São Paulo: Panamericana, 1996.

LAU, W. et al. Electroacupuncture inhibits cyclooxygenase-2 up-regulation in rat spinal cord after spinal nerve ligation. *Neuroscience*, v. 155, n. 2, p. 463-8, 2008.

LEE, J. et al. Electroacupuncture inhibits inflammatory edema and hyperalgesia through regulation of cyclooxygenase synthesis in both peripheral and central nociceptive sites. *Am J Chin Med*, v. 34, n. 6, p. 981-988, 2006.

LIU, J. et al. Effects of repeated electroacupuncture on beta-endorphin and adrenocorticotrophic hormone levels in the hypothalamus and pituitary in rats with chronic pain and ovariectomy. *Chin J Integr Med*, v. 16, n. 4, p. 315-323, 2010.

MAGNUS, J. et al. Proteoglycans, glycosaminoglycans and amyloid deposition. *Baillieres Clin Rheumatol*, v. 8, n. 3, p. 575-597, 1994.

MAZZONE, M.; MCCUE, T. Common conditions of the achilles tendon. *Am Fam Physician*, v. 65, n. 9, p. 1805-1810, 2002.

MCGONAGLE, D. et al. Report on the Second international Enthesitis Workshop. *Arthritis Rheum*, v. 48, n. 4, p. 896-905, 2003.

MCNEILLY, C. et al. Tendon cells in vivo form a three dimensional network of cell processes linked by gap junctions. *J Anat*, v. 189 (Pt 3), p. 593-600, 1996.

MICHNA, H. A peculiar myofibrillar pattern in the murine muscle-tendon junction. *Cell Tissue Res*, v. 233, n. 1, p. 227-231, 1983.

OSHIRO, W. et al. Flexor tendon healing in the rat: a histologic and gene expression study. *J Hand Surg Am*, v. 28, n. 5, p. 814-823, 2003.

PASSERIEUX, E. et al. Structural organization of the perimysium in bovine skeletal muscle: Junctional plates and associated intracellular subdomains. *J Struct Biol*, v. 154, n. 2, p. 206-216, 2006.

_____. Physical continuity of the perimysium from myofibers to tendons: involvement in lateral force transmission in skeletal muscle. *J Struct Biol*, v. 159, n. 1, p. 19-28, 2007.

RILEY, G. et al. Glycosaminoglycans of human rotator cuff tendons: changes with age and in chronic rotator cuff tendinitis. *Ann Rheum Dis*, v. 53, n. 6, p. 367-376, 1994.

_____. Matrix metalloproteinase activities and their relationship with collagen remodelling in tendon pathology. *Matrix Biol*, v. 21, n. 2, p. 185-195, 2002.

RILEY, G. Tendinopathy--from basic science to treatment. *Nat Clin Pract Rheumatol*, v. 4, n. 2, p. 82-89, 2008.

SCHATZKER, J.; BRÅNEMARK, P. Intravital observations on the microvascular anatomy and microcirculation of the tendon. *Acta Orthop Scand Suppl*, v. 126, p. 1-23, 1969.

SHARMA, P.; MAFFULLI, N. Biology of tendon injury: healing, modeling and remodeling. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, v. 6, n. 2, p. 181-190, 2006.

SNOEK-VAN BEURDEN, P.; VON DEN HOFF, J. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Biotechniques*, v. 38, n. 1, p. 73-83, 2005.

SUN, H. et al. [Effect of acupuncture at Baihui (GV 20) and Zusanli (ST 36) on the level of serum inflammatory cytokines in patients with depression]. *Zhongguo Zhen Jiu*, v. 30, n. 3, p. 195-199, 2010.

THOMPSON, J.; CZERNUSZKA, J. The effect of two types of cross-linking on some mechanical properties of collagen. *Biomed Mater Eng*, v. 5, n. 1, p. 37-48, 1995.

TIAN, L. et al. Downregulation of electroacupuncture at ST36 on TNF-alpha in rats with ulcerative colitis. *World J Gastroenterol*, v. 9, n. 5, p. 1028-1033, 2003.

TIDBALL, J. Myotendinous junction injury in relation to junction structure and molecular composition. *Exerc Sport Sci Rev*, v. 19, p. 419-445, 1991.

ULETT, G. et al. Electroacupuncture: mechanisms and clinical application. *Biol Psychiatry*, v. 44, n. 2, p. 129-138, 1998.

VOGEL, K.; FISHER, L. Comparisons of antibody reactivity and enzyme sensitivity between small proteoglycans from bovine tendon, bone, and cartilage. *J Biol Chem*, v. 261, n. 24, p. 11334-11340, 1986.

VOGEL, K.; KOOB, T. Structural specialization in tendons under compression. *Int Rev Cytol*, v. 115, p. 267-293, 1989.

WAGGETT, A. et al. Characterization of collagens and proteoglycans at the insertion of the human Achilles tendon. *Matrix Biol*, v. 16, n. 8, p. 457-470, 1998.

WANG, J. Mechanobiology of tendon. *J Biomech*, v. 39, n. 9, p. 1563-1582, 2006.

WANG, J. et al. Electroacupuncture downregulates TLR2/4 and pro-inflammatory cytokine expression after surgical trauma stress without adrenal glands involvement. *Brain Res Bull*, v. 80, n. 1-2, p. 89-94, 2009.

WOO, S. et al. Tissue engineering of ligament and tendon healing. *Clin Orthop Relat Res*, n. 367 Suppl, p. S312-23, 1999.

YAMAMURA, Y. *Acupuntura Tradicional: A Arte de Inserir*. 2. ed. São Paulo: ROCA, 2001.

YIM, Y. et al. Electro-acupuncture at acupoint ST36 reduces inflammation and regulates immune activity in Collagen-Induced Arthritic Mice. *Evid Based Complement Alternat Med*, v. 4, n. 1, p. 51-57, 2007.

ZHANG, S. et al. Non-opioid-dependent anti-inflammatory effects of low frequency electroacupuncture. *Brain Res Bull*, v. 62, n. 4, p. 327-334, 2004.

ZIJLSTRA, F. et al. Anti-inflammatory actions of acupuncture. *Mediators Inflamm*, v. 12, n. 2, p. 59-69, 2003.

RESULTADOS

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho foi elaborado um artigo científico:

Artigo: O efeito da eletroacupuntura no processo de reparo de tendões parcialmente transeccionados

O EFEITO DA ELETROACUPUNTURA NO PROCESSO DE REPARO DE TENDÕES PARCIALMENTE TRANSECCIONADOS

**Almeida, M.S. ; Aro, A.A. ; Guerra, F.D. ; Vieira, C.P. Quevedo, A. A. F. ; Vidal, B.C.
; Pimentel, E.R.**

Departamento de Anatomia, Biologia Celular, Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia,
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil.

Título curto: Eletroacupuntura na cicatrização tendínea

Palavras-Chaves: Eletroacupuntura, colágeno, matriz extracelular e cicatrização tendínea.

Contato com o autor:

Dr. Edson Rosa Pimentel
Departamento de Anatomia, Biologia Celular, Fisiologia e Biofísica
Instituto de Biologia
CP 6109, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP
13083-863 Campinas, SP, Brasil.
Email: pimentel@unicamp.br
Telefone: (19) 3521-6117
Fax: (19) 3521-6111

RESUMO

A eletroacupuntura (EA) tem sido utilizada amplamente para o tratamento de uma variedade de doenças inflamatórias e para o alívio da dor. No entanto, não há relatos na literatura sobre o efeito da EA na composição e organização da matriz extracelular (MEC) de tendões em processo de cicatrização. **Objetivo:** Investigar através de análises bioquímicas e morfológicas, o efeito da EA durante o pico de síntese dos componentes da MEC, 15 dias após transecção parcial do tendão calcâneo de ratos. **Materiais e Métodos:** Ratos Wistar machos com 60 dias de idade foram divididos em 3 grupos: Não tenotomizados (G1), tenotomizados (G2) e tenotomizados e submetidos a EA (G3). Agulhas de acupuntura (AC) foram inseridas nos pontos E-36 e B-57 e uma corrente elétrica com onda farádica bipolar assimétrica na frequência de 2 Hz e intensidade de 2-4 Volts foi aplicada nas agulhas por 20 minutos, 3 vezes por semana em dias alternados, em um total de 6 sessões. Análises bioquímicas foram feitas através da SDS-PAGE, dosagem de proteínas não colagênicas (PNCs), glicosaminoglicanos (GAGs) e hidroxiprolina. Análise da metaloproteinase-2 (MMP-2) foi realizada por zimografia. Para análise morfológica em microscopia de luz comum, os cortes foram corados com hematoxilina-eosina (HE) e azul de toluidina (AT). Para análise em microscopia de polarização os cortes foram corados com Ponceau SS e a birrefringência foi avaliada em termos de valor de média de cinza em pixels utilizando um analisador de imagem. **Resultados:** EA nos pontos utilizados não alterou a concentração de PNCs, GAGs ou a atividade enzimática da MMP-2 nos tendões transecionados. Já a concentração de hidroxiprolina foi significativamente aumentada nestes tendões quando tratados com EA. Na análise morfológica nos cortes corados com HE e AT, aparentemente não houve alterações na composição nem na organização da MEC. No entanto, na análise da birrefringência houve uma maior reorganização das fibras de colágeno no grupo tratado com EA. **Conclusão:** Nossos resultados indicam que a EA pode oferecer benefícios terapêuticos para o tratamento de lesões tendíneas através do aumento do conteúdo do colágeno e da reorganização molecular de suas fibras.

Palavras-Chaves: Eletroacupuntura, colágeno, matriz extracelular e cicatrização tendínea.

INTRODUÇÃO

A acupuntura (AC) tem sido utilizada no oriente há milhares de anos para o tratamento de várias doenças e atualmente está ganhando reconhecimento como método de medicina alternativa no ocidente (KAPTCHUK, 2002; ZIJLSTRA et al., 2003). A AC pode ser definida como a inserção de agulhas na pele e tecidos subjacentes em locais específicos, conhecidos como pontos de AC, para fins terapêuticos ou de prevenção de doenças. As agulhas podem ser estimuladas manualmente ou com uma corrente elétrica de baixa tensão, a chamada eletroacupuntura (EA) (KAVOUSSI; ROSS, 2007). Vários estudos têm demonstrado uma ação antiinflamatória e imunomoduladora da AC/EA através da participação dos sistemas nervoso autônomo, neuroimune e neuroendócrino (GOLLUB et al., 1999; TIAN et al., 2003; ZHANG et al., 2004; KIM et al., 2006; LEE et al., 2006; KOVOUSSI, ROSS, 2007; KIM et al., 2007; YIM et al., 2007; CABIOGLU, CETIN, 2008; KIM et al., 2008; LAU et al., 2008; WANG et al., 2009), sendo esta técnica utilizada com frequência para o tratamento de uma variedade de condições clínicas inflamatórias (XUE et al., 2002; ZIJLSTRA et al., 2003; DANIEL et al., 2004; CARNEIRO et al., 2005).

Além da ação antiinflamatória e imunomoduladora, outros trabalhos têm sugerido que os efeitos terapêuticos da AC possam ocorrer através da mecanotransdução, onde o sinal mecânico gerado na matriz extracelular (MEC) pela manipulação da agulha, atinge o núcleo celular através do citoesqueleto, determinando a síntese de componentes da MEC (LANGEVIN et al., 2001; LANGEVIN et al., 2006; LANGEVIN et al., 2007).

No entanto, não há evidência científica sobre o uso da EA no processo de cicatrização tendínea, sendo este, o primeiro estudo neste campo. As lesões dos tendões são

comuns e responsáveis por uma elevada proporção de encaminhamentos para reumatologistas e cirurgiões ortopédicos (BAMJI et al., 1990). Com o aumento das atividades atléticas recreativas e organizadas ao longo das últimas duas décadas, a incidência de lesões tendíneas tem aumentado dramaticamente (KANNUS, NATRI, 1997; JÄRVINEN et al., 2001; MAZZONE, MCCUE, 2002; JÄRVINEN et al., 2005).

Os tendões são constituídos por tecido conjuntivo especializado, formado por um arranjo de fibras de colágeno organizadas ao longo do seu maior eixo, que transmite força tensil gerada pelos músculos para o osso (REDDY et al., 1999). Bainhas formadas por tecido conjuntivo frouxo envolvem as fibras (endotendão) e os feixes de fibras (epitendão) que compõem o tendão. O tendão como um todo é envolvido por uma terceira bainha conjuntiva (paratendão) (WANG, 2006). Essas bainhas são a continuação daquelas que envolvem os músculos correspondentes aos tendões (LATARJET, LIARD, 1996), sendo que a rede de colágeno do perimísio (membrana conjuntiva que envolve o músculo) forma a base da ligação mecânica entre tendão e fibras musculares através de placas juncionais perimisiais especializadas (PASSERIEUX et al., 2006; PASSERIEUX et al., 2007). A MEC dos tendões são constituídas por uma complexa rede de moléculas interagindo entre si, incluindo, juntamente com as fibras de colágeno, glicosaminoglicanos (GAGs), proteoglicanos (PGs), proteínas não colagênicas (PNCs) e água (SHARMA; MAFFULLI, 2005). O componente celular é representado pelos tenoblastos e tenócitos os quais estão arranjados em fileiras paralelas entre as fibras de colágeno e contribuem para a homeostase da MEC (ABATE et al., 2009).

Após a lesão do tendão, na chamada fase proliferativa, há um aumento da concentração dos componentes da MEC tais como GAGs, PGs, PNC e água, os quais são

depositados no sítio da lesão. Nesta fase, também ocorre o pico da síntese de colágeno do tipo III de forma a recompor o tecido lesado (REDDY et al., 1999; MIDWOOD et al., 2004; SHARMA, MAFFULLI, 2006; WANG, 2006; ABATE et al., 2009) sendo que o colágeno atinge a concentração de 80% no 15º dia após a lesão em relação a um tendão que não sofreu lesão (REDDY et al., 1999). Durante esta fase da cicatrização, fatores de crescimento, óxido nítrico e enzimas proteolíticas como as metaloproteases (MMPs) estão atuantes (WANG, 2006).

Para o tratamento dessas lesões, várias modalidades terapêuticas são utilizadas com resultados diversos, sendo que algumas destas terapias têm como objetivo principal restituir elementos da MEC perdidos na lesão. Algumas dessas modalidades são: antiinflamatórios não esteróides e esteróides, terapia com exercícios excêntricos, ultrassom, laserterapia de baixa potência e injeção de plasma rico em plaquetas (RILEY, 2008, ABATE et al., 2009). Nós hipotetizamos que através da ação antiinflamatória e de mecanotransdução da EA relatada na literatura científica, possa haver uma otimização no processo de cicatrização tendíneo. Para isso escolhemos o ponto *Zusanli* (E-36) por seu efeito antiinflamatório, imunomodulador e analgésico (BAEK et al., 2005; KIM et al., 2006; YIM et al., 2007; KIM et al., 2008) e o ponto *Chengshan* (B-57) por estar situado próximo a junção miotendínea do músculo tríceps sural com o tendão calcâneo. Esta localização anatômica poderia transmitir o estímulo mecânico gerado pela manipulação da agulha, através das bainhas conjuntivas que envolvem o músculo citado e o tendão calcâneo, às proximidades do local da transecção tendínea, estimulando a síntese dos componentes da MEC pelos tenoblastos. Sendo assim, o objetivo desse estudo foi avaliar através de análises

bioquímicas e morfológicas, o efeito da EA durante o pico de síntese dos componentes da MEC, após 15 dias da transecção parcial do tendão calcâneo de ratos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais e Grupos Experimentais

Ratos wistar machos com 60 dias de idade (N = 72) foram obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Os animais tiveram livre acesso a comida e água sendo separados em 3 grupos: Grupo 1 (G1), composto por ratos não tenotomizados; grupo 2 (G2) composto por ratos cujo tendão calcâneo direito foi parcialmente tenotomizado; grupo 3 (G3), semelhante ao segundo e submetido à EA. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética Institucional para uso animal.

Cirurgia

Os animais foram submetidos à tenotomia parcial do tendão calcâneo direito. Cada animal foi previamente pesado e anestesiado com injeção intraperitoneal de ketamina e xilazina (10%) a uma dose de 70 e 12 mg/kg, respectivamente. A pele sobre o tendão calcâneo foi seccionada e o tendão foi liberado do tecido conjuntivo adjacente por essa incisão. O tendão foi cortado transversalmente a meia distância entre a junção miotendínea e a inserção no osso calcâneo. A região seccionada não foi suturada. Por último, a incisão

da pele foi fechada. Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados sob condições assépticas (CARRINHO et al., 2006).

Eletoacupuntura nos Pontos E-36 (*Zusanli*) e B-57 (*Chengshan*)

Previamente a todas as sessões de EA, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de Ketamina (70 mg/Kg) e Xilazina (12 mg/Kg) para abolir a resistência dos animais durante o procedimento. Foram utilizadas agulhas esterilizadas, de aço inoxidável medindo 0,25 mm x 25 mm as quais foram inseridas unilateralmente, no lado da lesão (ZHANG et al., 2004; MI et al., 2008; WANG et al., 2009). A profundidade de inserção foi de 6 mm em ambos os pontos (MEDEIROS et al., 2003). O ponto B-57 foi localizado a meia distância, na linha traçada entre o ponto B-40 (situado no centro da fossa poplíteia) e o ponto B-60 (situado entre o maléolo lateral e o tendão calcâneo) (YAMAMURA, 2001). O ponto E-36 foi localizado 5 mm lateral e abaixo do tubérculo anterior da tibia (MEDEIROS et al., 2003). A localização dos pontos foi confirmada com um medidor de impedância da pele (Lautz, Rio Claro, SP, Brasil). Após a inserção das agulhas as mesmas foram estimuladas manualmente com movimentos de rotação horária e anti-horária com um total de 16 rotações para cada lado (LANGEVIN et al., 2007). Em seguida, eletroestimulação foi realizada com um equipamento que fornece onda contínua farádica bipolar assimétrica (Accurate Pulse 585PRO Microprocessado - Lautz, Rio Claro, SP, Brasil). A frequência de onda foi ajustada para 2 Hz (TIAN et al., 2003; BAEK et al., 2005; LEE et al., 2006; YIM et al., 2007). A intensidade da estimulação utilizada foi entre 2,0-4,0 volts de forma que houvesse moderada contração muscular, durante 20 minutos (MEDEIROS et al., 2003).

Após os procedimentos, os ratos foram colocados de volta em suas gaiolas para posterior aplicação em um total de 6 aplicações em dias alternados (3 aplicações semanais) como realizado por (YIM et al., 2007) com modificações. A primeira aplicação foi realizada no dia seguinte aos procedimentos cirúrgicos. No 15º dia após a cirurgia, os ratos foram sacrificados e os tendões retirados para as análises bioquímicas e morfológicas.

Extração de componentes da matriz extracelular

Em todos os experimentos foram analisadas as regiões de tensão dos tendões sendo estas sujeitas somente às forças de tensão. Nos grupos que sofreram a transecção (G2-G3), a análise foi feita considerando a região de tecido cicatricial (neoformado) da região de tensão. Após uma rápida lavagem com PBS (5 mM de tampão fosfato, 0.15 M NaCl e 50 mM EDTA), os tendões foram picados, pesados e seguiram para a extração em 50 volumes de cloreto de guanidina a 4 M, contendo 0,05 M EDTA, 1mM de PMSF em 0,05M de tampão Acetato com pH 5.8 (HEINEGARD; SOMMARIN, 1987). A extração foi durante 24 horas, a 4º C em constante agitação. Em seguida o material foi centrifugado a 20.000 r.p.m., por 60 minutos a 4º C. O sobrenadante foi utilizado para SDS-PAGE, dosagem de PNCs e dosagem de GAGs.

Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

SDS-PAGE foi realizada de acordo com Zingales (1984), usando géis de gradiente (4–16%). O extrato (50 µL) dos tendões dos animais dos 3 grupos experimentais foi

precipitado com 100 μ L de 50 mM de tampão acetato, pH 7.4 e 9 volumes de etanol absoluto por 24 horas a 4°C. As massas moleculares relativas foram estimadas por comparações com padrões protéicos de massa molecular já conhecida (WEBER; OSBORN, 1969). Os géis foram corados com coomassie brilliant blue R-250 (Sigma).

Quantificação de proteínas não-colagênicas

As proteínas (PNCs) foram quantificadas pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro Ultrospec 2100 Pro (Amersham Biosciences, England) a 595 nm.

Quantificação de glicosaminoglicanos

O conteúdo de GAGs sulfatados foi determinado pelo método dimetilmetileno azul segundo Farndale e colaboradores (1986), usando sulfato de condroitina como padrão. A leitura das amostras foi mensurada em espectrofotômetro Ultrospec 2100 Pro (Amersham Biosciences, England) a 540 nm.

Quantificação de Hidroxiprolina

Após lavagem em PBS, os fragmentos dos tendões foram imersos em acetona por 48 horas, em clorofórmio-etanol (2:1) por mais 48 horas e em seguida foram secos em estufa a 37°C por 1 hora. Esses fragmentos foram pesados e hidrolisados em HCl 6N (1mL

para cada 10 mg de tecido) por 16 horas a 110°C. Em seguida, o hidrolisado foi neutralizado com NaOH 6N e tratado com uma solução de 1.41% de cloramina T e *p*-dimethylaminobenzaldehyde a 15% (STEGEMAN; STALDER, 1967). A solução foi resfriada a temperatura ambiente e a leitura das amostras foi feita a 550 nm em espectrofotômetro Ultrospec 2100 (Pro Amersham Biosciences, England).

Zimografia

Os tendões foram picados e imersos em uma solução de 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.2 M NaCl, 10 mM CaCl₂, 0.1% Triton e 1% de coquetel inibidor de protease (Sigma) para extração protéica (100 µL da solução de extração para cada 30 mg de tecido) a 4°C durante 2h (SILVA et al., 2008). Em seguida, as amostras foram incubadas adicionando 1/3 do volume da mesma solução de extração descrita previamente, de acordo com o peso de cada amostra, a 60°C durante 5 minutos. Após quantificação das proteínas totais, as amostras foram aplicadas no gel a 1 µg de proteína por amostra. Em seguida foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) a 4°C, contendo 0.1% de gelatina. Ao final desse procedimento, o gel foi lavado com 2.5% de Triton X-100 e incubado por 21 horas em solução de 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) 0.1 M NaCl e 0.03% azida sódica a 37°C. O gel foi corado com coomassie brilliant blue R-250 (Sigma) por 1 hora. Em seguida, o mesmo foi descorado com solução contendo 30% de metanol e 10% ácido acético para visualização das bandas correspondentes a atividade gelatinolítica. A quantificação das bandas foi feita através da densitometria utilizando o programa Scion Image Software Alpha 4.0.3.2 (Scion Corporation, USA).

Processamento para análise estrutural em microscopia de luz

Após a dissecação, os tendões calcaneares foram fixados em solução de formol 4% em tampão Millonig (0.13 M sodium phosphate, 0.1 M NaOH - pH 7.4) durante 24 horas a 4°C. Em seguida os tendões foram lavados em água, desidratados em banhos de álcool, seguidos de diafanização com banhos de xilol e incluídos em parafina (Histosec). Foram realizados cortes longitudinais de 7 μm . Para uma visualização geral do tecido alguns cortes foram corados com Hematoxilina-eosina (KIERNAN, 1981). Para observação de PGs, os cortes foram desparafinizados e corados com Azul de Toluidina (AT) (0.025%) in McIlvaine buffer (0.03M citric acid, 0.04 M sodium phosphate, dibasic - pH 4.0) (MELLO; VIDAL, 2003). As secções foram analisadas com microscópio de luz Olympus BX 60. Para observação dos feixes de colágeno no microscópio de polarização os cortes foram corados com Ponceau SS (0.025% em 2% de ácido acético por 3 minutos) e em seguida foram lavados em ácido acético a 2% e água [49]. A birrefringência foi analisada com um microscópio de polarização Olympus BX51-P BX2 e as imagens foram capturadas e analisadas usando o analisador de *imagens Image-Pro Plus 5.1, Media Cybernetics Inc. (Silver Spring, MD, USA)*. Para a aquisição das imagens os cortes foram posicionados a 45° em relação aos polarizadores cruzados. A intensidade da birrefringência em termos de valores de média de cinza em pixels foi avaliada cobrindo uma área total de 41118 μm^2 em G2 e 67470 μm^2 em G3. Foi avaliada a frequência do valor da média de cinza em pixels nas áreas analisadas. Quanto maior o valor em pixels, maior é a intensidade da birrefringência e, portanto, maior é a organização das fibras de colágeno [50].

Análise Estatística

Todos os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP). O conteúdo de GAGs sulfatados, PNCs e hidroxiprolina foram analisados pela análise de variância (ANOVA) *one-way* seguida pelo teste de Tukey. Foi utilizado também o teste t não pareado quando necessário (MMP-2). O nível de significância adotado foi $p < 0.05$. As análises foram realizadas no programa GraphPad Prism 3.0.

RESULTADOS

Análise Bioquímica

Os resultados da SDS-PAGE mostraram que a presença de colágeno, aparentemente, foi maior no G3 comparada ao G2. Porém não houve diferença aparente entre as PNCS (14 e 67 kDa) entre esses grupos (Figura 2).

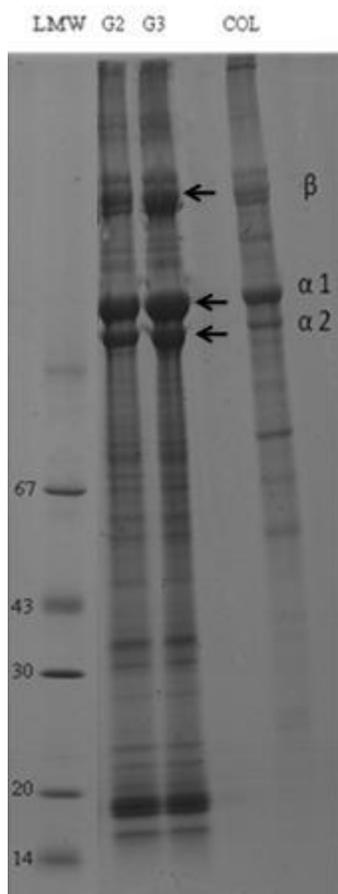


Figura 2. SDS-PAGE dos extratos de tendões dos grupos G2 e G3. Observar o aumento aparente de colágeno no G3 em relação ao G2 (setas). Não houve diferença aparente entre o G2 e G3 em relação às PNCs. O padrão protéico de baixo peso molecular (LMW) está à esquerda e de colágeno (COL) à direita.

Foi calculado a concentração de PNCs em miligrama por grama (mg/g) de tendão (Figura 3). Em G2 e G3 houve um aumento significativo da concentração de PNCs em relação ao G1, porém sem diferença estatística significativa entre os dois últimos grupos (figura 3). Um resultado semelhante foi encontrado na análise das dosagens dos GAGs (Figura 4).

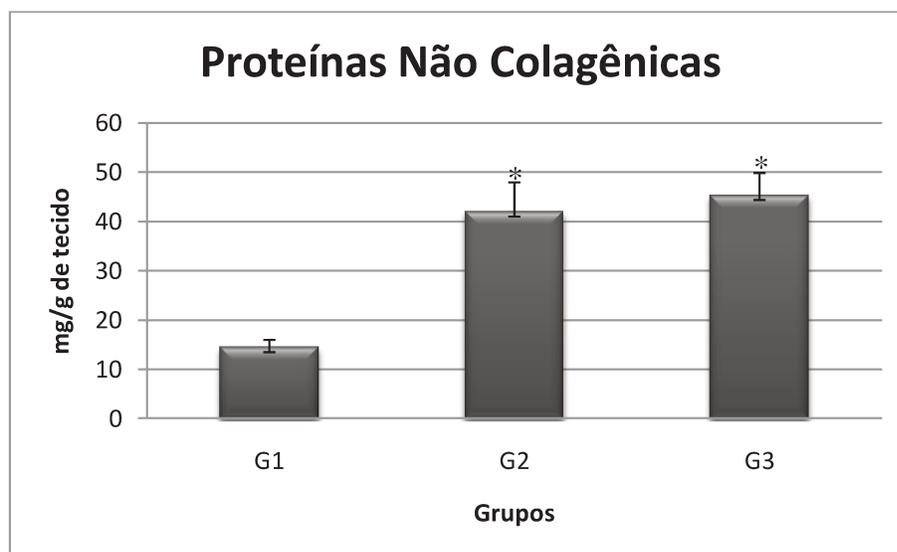


Figura 3. Concentração de PNCs (mg/g de tecido) dos extratos de tendões dos grupos G1, G2 e G3. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre o G2 e G3, porém quando comparados ao G1, ambos apresentaram um aumento significativo da concentração de PNCs. Valores mostrados como média e desvio padrão (n=6). *: $p < 0,001$, comparado com G1.

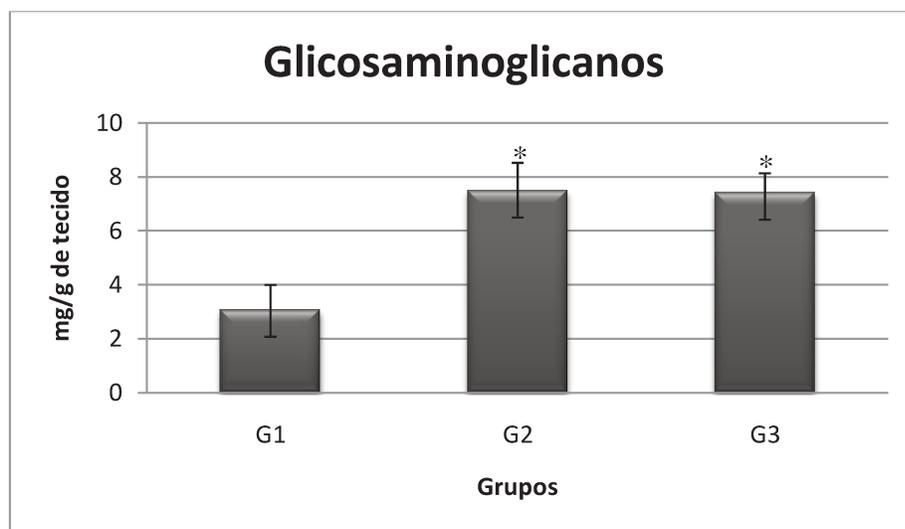


Figura 4. Concentração de GAGs (mg/g de tecido) dos tendões do G1, G2 e G3. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre o G2 e G3, porém quando comparados ao G1, ambos apresentaram um aumento significativo da concentração de GAGs. Valores mostrados como média e desvio padrão (n=6). *: $p < 0,001$, comparado com G1

Já com relação à dosagem de hidroxiprolina podemos observar um aumento significativo em G3 em relação ao G2. Também não houve diferença significativa entre o G1 e o G3 (Figura 5).

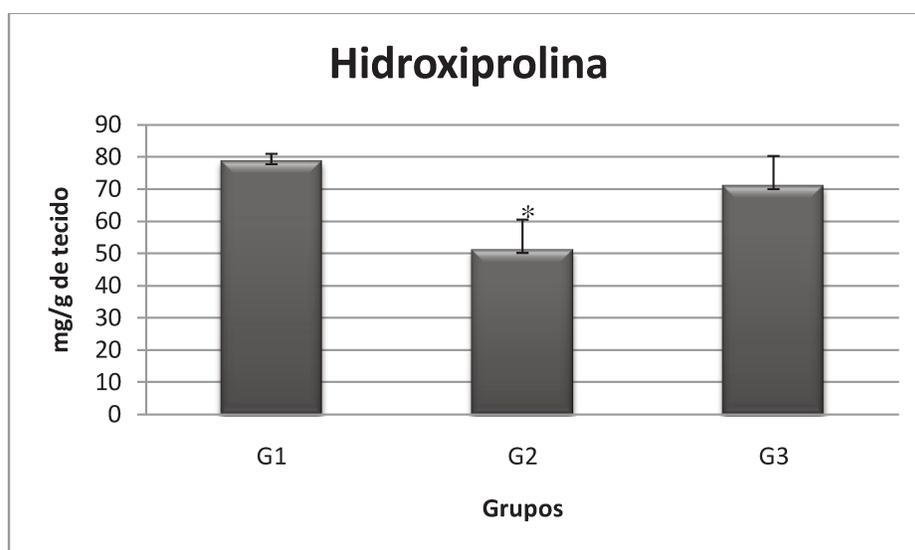


Figura 5. Concentração de hidroxiprolina (mg/g de tecido seco) nos tendões dos grupos G1, G2 e G3. Observe a diferença significativa quando comparamos o G2 ao G1 e ao G3. O G3 não diferiu de G1 ($p > 0,05$). Valores mostrados como média e desvio padrão ($n=6$). *: $p < 0,001$, comparado com G1 e ao G3.

Os resultados da zimografia mostraram que não houve diferença entre o G2 e o G3 nas 3 isoformas da MMP-2, porém estes grupos exibiram uma quantidade maior das 3 isoformas em relação a G1 (Figura 6 A e B).

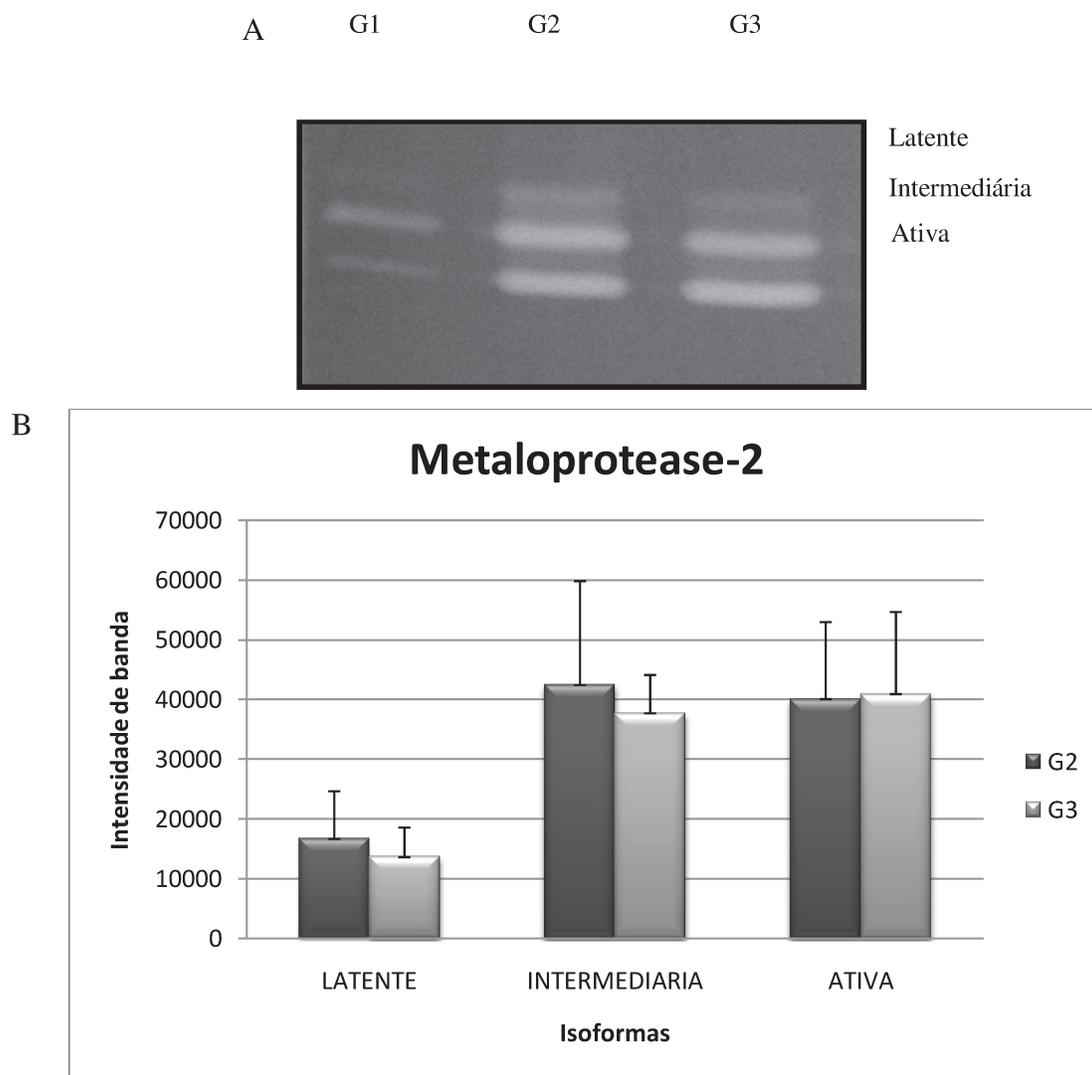


Figura 6. Atividade da MMP-2 obtida na zimografia (A) e medida com densitometria (B). Não houve diferença significativa entre o G2 e o G3 ($p > 0.05$) nas três isoformas. Valores mostrados como média e desvio padrão ($n=6$).

Análise morfológica

Nos cortes corados com HE dos tendões submetidos à transecção, a matriz colagênica se apresenta desorganizada. Juntamente com a MEC, também podemos observar grande número de células (G2 – fig. 7B e G3 – Fig. 7C) em relação ao grupo normal (G1 – fig. 7A) o qual se apresenta com a matriz organizada e com poucas células enfileiradas entre os feixes de colágeno. Nos cortes corados com AT houve um aumento da metacromasia no grupo lesado (G2 – fig. 7E) e no grupo tratado (G3 – Fig. 7F) em relação ao grupo normal (G1 – Fig. 7D), porém sem diferença aparente entre os dois primeiros grupos.

No gráfico de birrefringência (figura 8) podemos observar que os valores da média de cinza em pixels se dividiram em 2 grupos: O primeiro com uma população de fibras de colágeno com valores variando entre 25-50 pixels tanto para o G2 (linha seccionada) quanto para o G3 (linha contínua) e o segundo com uma população de fibras com valores variando entre 55-70 pixels para o G3.

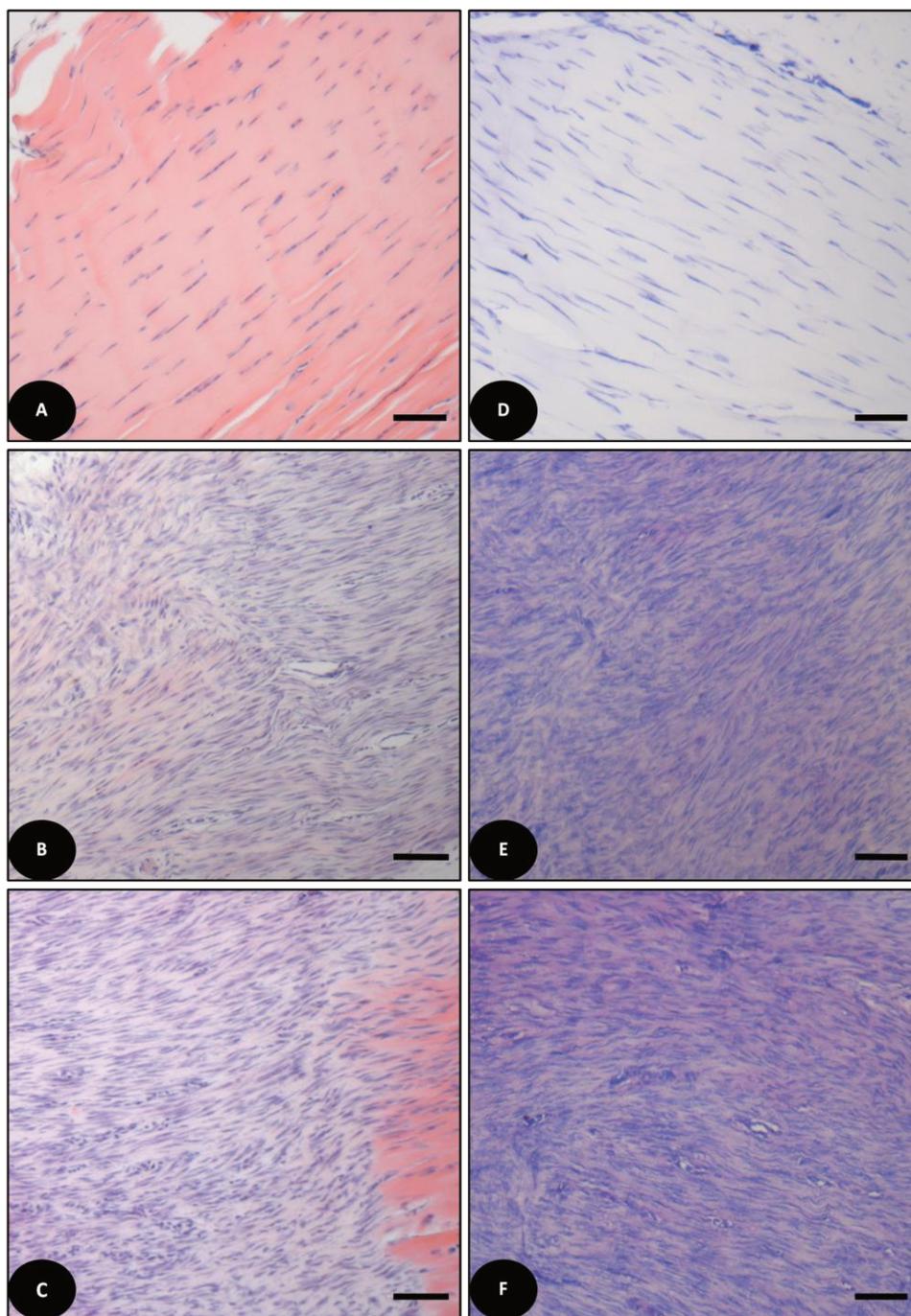


Figura 7. Cortes longitudinais de tendão corados com HE (A-C) e AT (D-F). A- Região de tensão do G1 com a matriz colagênica organizada e poucos tenócitos organizados em fileiras entre elas. B e C - Notar a grande celularidade e a matriz desorganizada nos tendões dos grupos G2 e G3. Não houve diferença aparente entre esses grupos. D- A região de tensão do G1 exibe a MEC fracamente corada e poucos tenócitos enfileirados entre ela. O contrário ocorre nos grupos G2 e G3, onde a MEC aparece mais metacromática e com grande quantidade de células. Não houve diferença aparente na metacromasia entre o G2 (E) e o G3 (F). Barra: 80 μ m.

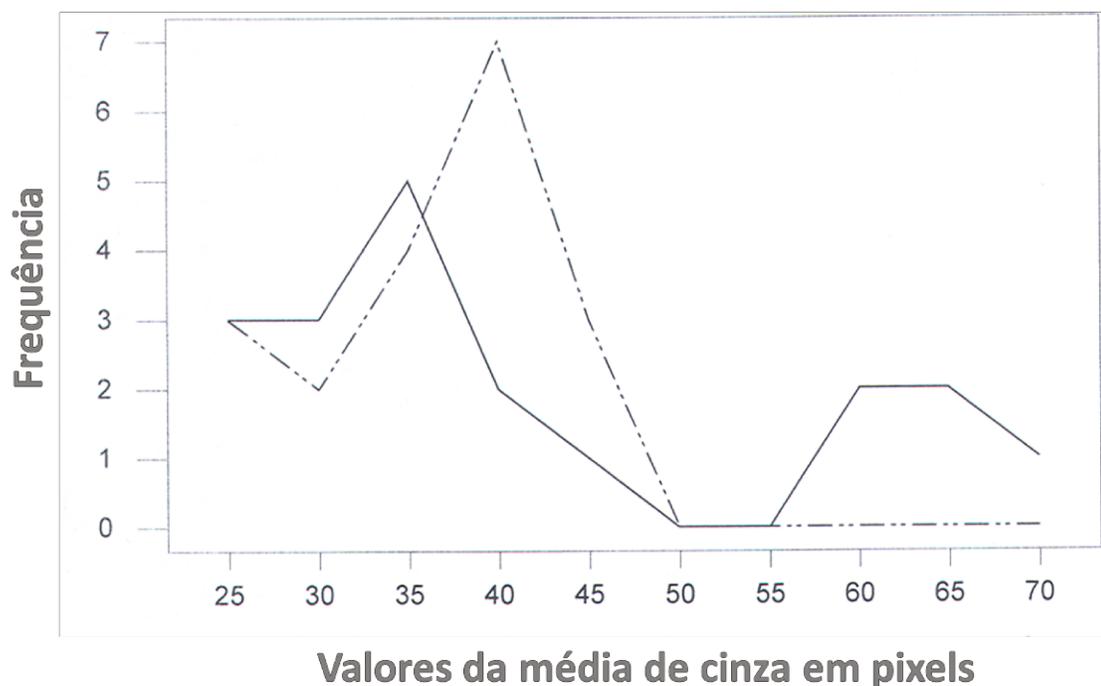


Figura 8: Gráfico da frequência dos valores da média de cinza obtido das fibras de colágeno dos tendões após o eixo longo dos mesmos ter sido posicionado a 45° em relação aos polarizadores cruzados. Observe que tanto em G2 (linha seccionada) quanto em G3 (linha contínua) há uma população de fibras com valor variando entre 25-50 pixels e uma população de fibras com valores variando entre 55-70 pixels para o G3.

DISCUSSÃO

Várias modalidades terapêuticas, agindo nos mecanismos de proliferação celular e síntese de componentes da MEC, estão sendo utilizadas atualmente no tratamento de lesões tendíneas (RILEY, 2008; ABATE et al., 2009). Considerando as pesquisas no campo da EA, a literatura científica não registra nenhum estudo sobre o efeito dessa técnica sobre o

processo de cicatrização de tendões. As chamadas terapias complementares e alternativas têm sido utilizadas de maneira crescente ao longo dos últimos anos para o tratamento de inúmeras patologias (METCALFE et al., 2010), o que justifica seu estudo para a comprovação científica de seus resultados.

Nossos resultados bioquímicos e morfológicos mostraram um aumento acentuado na síntese de PNC, GAGs, na atividade enzimática da MMP-2 e na celularidade no G2 e no G3 em relação ao G1. Já a concentração de colágeno diminuiu no grupo que sofreu a lesão (G2) em relação ao grupo não lesado (G1). Esses resultados estão de acordo com a literatura a qual demonstra estas alterações na fase de reparo do tendão (WOO et al., 1999; OSHIRO et al., 2003).

Segundo estudo realizado por (KAROUSOU et al., 2008) há um aumento pronunciado da expressão gênica de colágeno tipo I em tendões lesados, sendo que estes resultados estão de acordo com análises bioquímicas de outros estudos, que mostraram mudanças na síntese de colágeno após lesão (ERIKSEN et al., 2002). Esse aumento de expressão e síntese de colágeno é uma tentativa do tecido de restaurar a composição tendínea normal (KAROUSOU et al., 2008). Nossos resultados mostraram que a EA aumentou significativamente a concentração de colágeno, o que sugere que essa técnica age aumentando a deposição de colágeno no sítio da lesão, otimizando o processo de restauração da composição tendínea após uma lesão.

Comparando o G2 com o G3 na SDS-PAGE podemos observar uma quantidade maior de colágeno neste último grupo. Pela característica e disposição das bandas no gel podemos inferir que se trata de colágeno tipo I. Esse resultado está de acordo com o da análise da hidroxiprolina a qual é utilizada como um indicador da concentração de

colágeno. Como já mencionado, vários estudos têm evidenciado um efeito antiinflamatório e imunomodulador da EA (TIAN et al., 2003; ZHANG et al., 2004; KIM et al., 2006; LEE et al., 2006; KIM et al., 2007; YIM et al., 2007; KIM et al., 2008; WANG et al., 2009), sendo que isso provavelmente ocasionou uma diminuição do processo inflamatório no G3 em relação ao G2, o que favoreceu a síntese e subsequente deposição de colágeno no G3. Há relatos indicando que a diminuição da inflamação nos primeiros momentos da regeneração tendínea favorece a síntese precoce de colágeno acelerando o processo de reparo (CASALECHI et al., 2009). Vários trabalhos têm demonstrado que mediadores pró-inflamatórios tais como a prostagladina E2 (PGE2) podem reduzir a proliferação de fibroblastos e a síntese de colágeno (VARGA et al., 1987; RIQUET et al., 2000; CILLI et al., 2004; THAMPATTY et al., 2006). Outros trabalhos mostram que catecolaminas como a norepinefrina podem modular tanto a fase inflamatória quanto a fase proliferativa da cicatrização de feridas (GOSAIN et al., 2006). Considerando que a EA pode reduzir os níveis de PGE2 (KIM et al., 2006; LEE et al., 2006; LAU et al., 2008), dentre outros mediadores pró-inflamatórios (WANG et al., 2009), e aumentar a liberação de norepinefrina dos terminais pós ganglionares simpáticos (KIM et al., 2007), acreditamos que esse mecanismo antiinflamatório e imunomodulador seja um dos responsáveis pela síntese aumentada de colágeno no grupo tenotomizado e tratado com EA.

O outro mecanismo responsável que pode ter contribuído para o aumento da síntese de colágeno é o da mecanotransdução. A ação mecânica da agulha durante sua manipulação nas proximidades do sítio de lesão (o ponto B-57 é situado na transição do tríceps sural com o tendão calcâneo) pode ter gerado um estímulo, que através do tensionamento das fibras de colágeno que formam as bainhas conjuntivas que envolvem o músculo e o tendão,

atinge as proximidades de sítio da lesão, ocasionando o aumento de síntese de colágeno pelos tenoblastos (LANGEVIN et al., 2001; LANGEVIN et al., 2006; LANGEVIN et al., 2007). Tem sido relatada uma íntima interação entre estímulo mecânico e mudanças bioquímicas nos tendões e que essas mudanças químicas são convertidas em adaptações nas propriedades estruturais dos tendões (KJAER et al., 2009).

Na análise da concentração das PNC e dos GAGs observamos diferença significativa nos grupos G2 e G3 em relação ao G1, porém não houve diferença aparente entre os dois primeiros grupos. Estes resultados indicam que a EA, nos parâmetros utilizados neste estudo, não interfere na concentração destes componentes da MEC. Dentre as PNC a tenascina-C, a trombospodina e a fibronectina são alguns exemplos encontrados nos tendões participando do processo de reparo e regeneração (JOZSA et al., 1991; MACKIE, RANSEY, 1996). Os PGs desempenham funções diversas nos tecidos por causa da variabilidade da proteína central e dos diferentes tipos de GAGs (IOZZO; MURDOCH, 1996). Decorin e fibromodulin são exemplos de pequenos PGs que participam da regulação da fibrilogênese do colágeno (HEDBOM; HEINEGARD, 1989), desempenhando uma importante função nas propriedades estruturais e funcionais dos tecidos (VOGEL; FISHER, 1986).

Dentre os componentes que participam do processo de cicatrização tendínea estão enzimas como as MMPs as quais estão envolvidas no remodelamento da MEC dos tendões (KAROUSOU et al., 2008). A MMP-2 (gelatinase) digere a gelatina a qual é uma forma desnaturada de colágeno (SNOEK-VAN BEURDEN; VON DEN HOFF, 2005). É relatado na literatura que a concentração de MMP-2 está elevada até o vigésimo oitavo dia após a lesão participando tanto da degradação quanto do remodelamento do colágeno (RILEY et

al., 2002). Em nosso estudo não observamos alteração na ativação e quantidade da MMP-2 entre o G2 e o G3 estando esse resultado de acordo com os resultados morfológicos que não mostraram alteração no grau de degradação ou remodelamento tecidual.

Na análise morfológica dos cortes corados com HE, nossos resultados mostraram, no G1, fibras colágenas dispostas paralelamente constituindo uma MEC altamente organizada, com poucos fibroblastos em formato alongado. Essa organização estrutural permite que o tendão transmita a força gerada pelo músculo ao osso, resultando na movimentação. No G2 e no G3 pode-se observar a presença de uma matriz colageênica desorganizada e hiper celularidade na região da injúria, sendo o fibroblasto o tipo celular predominante nesta fase de reparo tecidual (WOO et al., 1999), porém não houve diferença aparente entre esses grupos. Nossas observações não mostraram diferença aparente na metacromasia entre o G2 e o G3 nos tendões corados com AT estando esse resultado de acordo com a quantificação de GAGs. Este corante catiônico, com uma estrutura molecular planar em pH 4 (VIDAL, 1980), liga-se preferencialmente aos grupos fosfato dos ácidos nucleicos e aos radicais sulfato e carboxila das cadeias de GAGs na MEC. Estas cadeias são organizadas longitudinalmente ao longo do eixo principal das fibrilas de colágeno (VIDAL, VILARTA, 1988; MELLO, VIDAL, 2003), de modo a otimizar as interações eletrostáticas entre as cargas negativas dos GAGs e as positivas do colágeno (MELLO; VIDAL, 1973).

A análise da birrefringência das fibras de colágeno dos tendões em G3 mostrou claramente a existência de 2 populações de fibras em termos de valores de média de cinza. Uma dessas populações em G3 mostrou um valor mais alto em relação ao G2, indicando que a EA aumentou a organização de um grupo de fibras de colágeno após lesão.

Alguns estudos relatam que substâncias antiinflamatórias podem modular o processo de cicatrização tendínea (GOSAIN et al., 2006). Nós acreditamos que o aumento da organização das fibras de colágeno se deva ao efeito antiinflamatório da EA como relatado na literatura (LEE et al., 2006) o qual potencialmente pode ter acelerado o início da fase de remodelamento sendo esta fase caracterizada pela reorganização das fibras de colágeno (WANG, 2006). A mecanotransdução através do ponto B-57 é outro provável mecanismo que pode ter contribuído para o aumento da organização das fibras de colágeno. A manipulação da agulha de acupuntura gera um enrolamento das fibras de colágeno com formação de tensão nessas fibras e reorganização do citoesqueleto de fibroblastos situados nas proximidades da região do estímulo (LANGEVIN et al., 2001). A reorganização do citoesqueleto em resposta a estímulos mecânicos pode induzir a contração celular com reorganização dos elementos da MEC (SUMPIO et al., 1988). Estando o ponto B-57 localizado na transição miotendínea do músculo gastrocnêmio com o tendão calcâneo (YSAO, 2001), portanto, próximo a região de lesão no tendão, acreditamos que a manipulação da agulha com movimentos no sentido horário e anti horário ocasionou um enrolamento das fibras de colágeno do endomísio e perimísio do músculo gastrocnêmio em torno da agulha com formação subsequente de tensão nessas fibras (LANGEVIN et al., 2001). Considerando que endomísio e perimísio são continuações diretas do endotendão e peritendão (LATARJET; LIARD, 1996) potencialmente a tensão gerada nas fibras de colágeno pela manipulação da agulha foi transmitida a região de lesão do tendão estimulando os tenoblastos a atuarem na reorganização das fibras de colágeno (WANG, 2006).

Em conclusão nossos resultados indicam, pela primeira vez, que o tratamento com EA nos pontos *Zusanli* (E-36) e *Chengshan* (B-57) tem efeito no aumento do conteúdo de colágeno e na organização molecular das fibras de colágeno em tendões calcaneares parcialmente lesados de ratos. Estes resultados podem embasar uma terapia alternativa para as lesões tendíneas. Todavia, mais estudos precisam ser desenvolvidos para analisar os efeitos de outros protocolos sobre as características bioquímicas e morfológicas da MEC de tendões em processo de cicatrização.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABATE, M. et al. Pathogenesis of tendinopathies: inflammation or degeneration? *Arthritis Res Ther*, v. 11, n. 3, p. 235, 2009.

BAEK, Y. et al. Analgesic effect of electroacupuncture on inflammatory pain in the rat model of collagen-induced arthritis: mediation by cholinergic and serotonergic receptors. *Brain Res*, v. 1057, n. 1-2, p. 181-185, 2005.

BAMJI, A. et al. What do rheumatologists do? A pilot audit study. *Br J Rheumatol*, v. 29, n. 4, p. 295-298, 1990.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, v. 72, p. 248-54, 1976.

CABIOĞLU, M.; CETIN, B. Acupuncture and immunomodulation. *Am J Chin Med*, v. 36, n. 1, p. 25-36, 2008.

CARNEIRO, E. et al. Effect of electroacupuncture on bronchial asthma induced by ovalbumin in rats. *J Altern Complement Med*, v. 11, n. 1, p. 127-134, 2005.

CARRINHO, P. et al. Comparative study using 685-nm and 830-nm lasers in the tissue repair of tenotomized tendons in the mouse. *Photomed Laser Surg*, v. 24, n. 6, p. 754-758, 2006.

CASALECHI, H. et al. The effects of low-level light emitting diode on the repair process of Achilles tendon therapy in rats. *Lasers Med Sci*, v. 24, n. 4, p. 659-665, 2009.

CILLI, F. et al. Prostaglandin E2 affects proliferation and collagen synthesis by human patellar tendon fibroblasts. *Clin J Sport Med*, v. 14, n. 4, p. 232-236, 2004.

DANIEL, K. et al. A double-blind, randomized, placebo-controlled trial of acupuncture for the treatment of childhood persistent allergic rhinitis. *Pediatrics*, v. 114, n. 5, p. 1242-1247, 2004.

ERIKSEN, H. et al. Increased content of type III collagen at the rupture site of human Achilles tendon. *J Orthop Res*, v. 20, n. 6, p. 1352-1357, 2002.

FARNDALE, R. et al. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochim Biophys Acta*, v. 883, n. 2, p. 173-177, 1986.

GOLLUB, R. et al. Acupuncture: pain management coupled to immune stimulation. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*, v. 20, n. 9, p. 769-777, 1999.

GOSAIN, A. et al. Norepinephrine modulates the inflammatory and proliferative phases of wound healing. *J Trauma*, v. 60, n. 4, p. 736-744, 2006.

HEDBOM, E.; HEINEGÅRD, D. Interaction of a 59-kDa connective tissue matrix protein with collagen I and collagen II. *J Biol Chem*, v. 264, n. 12, p. 6898-6905, 1989.

HEINEGÅRD, D.; SOMMARIN, Y. Isolation and characterization of proteoglycans. *Methods Enzymol*, v. 144, p. 319-372, 1987.

IOZZO, R.; MURDOCH, A. Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. *FASEB J*, v. 10, n. 5, p. 598-614, 1996.

JOZSA, L. et al. Three-dimensional ultrastructure of human tendons. *Acta Anat (Basel)*, v. 142, n. 4, p. 306-312, 1991.

JÄRVINEN, T. et al. Achilles tendon injuries. *Curr Opin Rheumatol*, v. 13, n. 2, p. 150-155, 2001.

_____. Achilles tendon disorders: etiology and epidemiology. *Foot Ankle Clin*, v. 10, n. 2, p. 255-266, 2005.

KANNUS, P.; NATRI, A. Etiology and pathophysiology of tendon ruptures in sports. *Scand J Med Sci Sports*, v. 7, n. 2, p. 107-112, 1997.

KAPTCHUK, T. Acupuncture: theory, efficacy, and practice. *Ann Intern Med*, v. 136, n. 5, p. 374-383, 2002.

KAROUSOU, E. et al. Collagens, proteoglycans, MMP-2, MMP-9 and TIMPs in human achilles tendon rupture. *Clin Orthop Relat Res*, v. 466, n. 7, p. 1577-1582, 2008.

KAVOUSSI, B.; ROSS, B. The neuroimmune basis of anti-inflammatory acupuncture. *Integr Cancer Ther*, v. 6, n. 3, p. 251-257, 2007.

KIERNAN, J. Histological and histochemical methods. In theory and practice In: PRESS, P. (Ed.). England, p. 81-82, 1981.

KIM, H. et al. The anti-inflammatory effects of low- and high-frequency electroacupuncture are mediated by peripheral opioids in a mouse air pouch inflammation model. *J Altern Complement Med*, v. 12, n. 1, p. 39-44, 2006.

_____. Low-frequency electroacupuncture suppresses zymosan-induced peripheral inflammation via activation of sympathetic post-ganglionic neurons. *Brain Res*, v. 1148, p. 69-75, 2007.

_____. Low-frequency electroacupuncture suppresses carrageenan-induced paw inflammation in mice via sympathetic post-ganglionic neurons, while high-frequency EA suppression is mediated by the sympathoadrenal medullary axis. *Brain Res Bull*, v. 75, n. 5, p. 698-705, 2008.

KJAER, M. et al. From mechanical loading to collagen synthesis, structural changes and function in human tendon. *Scand J Med Sci Sports*, v. 19, n. 4, p. 500-510, 2009.

LANGEVIN, H. et al. Mechanical signaling through connective tissue: a mechanism for the therapeutic effect of acupuncture. *FASEB J*, v. 15, n. 12, p. 2275-2282, 2001.

_____. Subcutaneous tissue fibroblast cytoskeletal remodeling induced by acupuncture: evidence for a mechanotransduction-based mechanism. *J Cell Physiol*, v. 207, n. 3, p. 767-774, 2006.

_____. Connective tissue fibroblast response to acupuncture: dose-dependent effect of bidirectional needle rotation. *J Altern Complement Med*, v. 13, n. 3, p. 355-360, 2007.

LATARJET, M.; RUIZ LIARD, A. *ANATOMIA HUMANA*. 2. ed. São Paulo: Panamericana, 1996.

LAU, W. et al. Electroacupuncture inhibits cyclooxygenase-2 up-regulation in rat spinal cord after spinal nerve ligation. *Neuroscience*, v. 155, n. 2, p. 463-468, 2008.

LEE, J. et al. Electroacupuncture inhibits inflammatory edema and hyperalgesia through regulation of cyclooxygenase synthesis in both peripheral and central nociceptive sites. *Am J Chin Med*, v. 34, n. 6, p. 981-988, 2006.

MACKIE, E.; RAMSEY, S. Expression of tenascin in joint-associated tissues during development and postnatal growth. *J Anat*, v. 188 (Pt 1), p. 157-65, 1996.

MAZZONE, M.; MCCUE, T. Common conditions of the achilles tendon. *Am Fam Physician*, v. 65, n. 9, p. 1805-1810, 2002.

MEDEIROS, M. et al. c-Fos expression induced by electroacupuncture at the Zusanli point in rats submitted to repeated immobilization. *Braz J Med Biol Res* [S.I.], v. 36, n. 12, p. 1673-1684, 2003.

MELLO, M.; VIDAL, B. C. Experimental tendon repair: glycosaminoglycan arrangement in newly synthesized collagen fibers. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, v. 49, n. 4, p. 579-585, 2003.

MELLO, M.; VIDAL, B. C. Anisotropic properties of toluidine blue-stained collagen. *Ann Histochem*, v. 18, n. 2, p. 103-122, 1973.

METCALFE, A. et al. Use of complementary and alternative medicine by those with a chronic disease and the general population - results of a national population based survey. *BMC Complement Altern Med*, v. 10, n. 1, p. 58, 2010.

MI, W. et al. Synergistic anti-hyperalgesia of electroacupuncture and low dose of celecoxib in monoarthritic rats: involvement of the cyclooxygenase activity in the spinal cord. *Brain Res Bull*, v. 77, n. 2-3, p. 98-104, 2008.

MIDWOOD, K. et al. Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. *Int J Biochem Cell Biol*, v. 36, n. 6, p. 1031-1037, 2004.

OSHIRO, W. et al. Flexor tendon healing in the rat: a histologic and gene expression study. *J Hand Surg Am*, v. 28, n. 5, p. 814-823, 2003.

PASSERIEUX, E. et al. Structural organization of the perimysium in bovine skeletal muscle: Junctional plates and associated intracellular subdomains. *J Struct Biol*, v. 154, n. 2, p. 206-216, 2006.

_____. Physical continuity of the perimysium from myofibers to tendons: involvement in lateral force transmission in skeletal muscle. *J Struct Biol*, v. 159, n. 1, p. 19-28, 2007.

REDDY, G. et al. Matrix remodeling in healing rabbit Achilles tendon. *Wound Repair Regen*, v. 7, n. 6, p. 518-527, 1999.

RILEY, G. et al. Matrix metalloproteinase activities and their relationship with collagen remodelling in tendon pathology. *Matrix Biol*, v. 21, n. 2, p. 185-195, 2002.

RILEY, G. Tendinopathy--from basic science to treatment. *Nat Clin Pract Rheumatol*, v. 4, n. 2, p. 82-9, 2008.

RIQUET, F. et al. Suppression of type I collagen gene expression by prostaglandins in fibroblasts is mediated at the transcriptional level. *Mol Med*, v. 6, n. 8, p. 705-19, 2000.

SHARMA, P.; MAFFULLI, N. Tendon injury and tendinopathy: healing and repair. *J Bone Joint Surg Am*, v. 87, n. 1, p. 187-202, 2005.

_____. Biology of tendon injury: healing, modeling and remodeling. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, v. 6, n. 2, p. 181-190, 2006.

SILVA, J. et al. The influence of type I diabetes mellitus on the expression and activity of gelatinases (matrix metalloproteinases-2 and -9) in induced periodontal disease. *J Periodontal Res*, v. 43, n. 1, p. 48-54, 2008.

SNOEK-VAN BEURDEN, P.; VON DEN HOFF, J. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Biotechniques*, v. 38, n. 1, p. 73-83, 2005.

STEGEMANN, H.; STALDER, K. Determination of hydroxyproline. *Clin Chim Acta*, v. 18, n. 2, p. 267-273, 1967.

SUMPIO, B. E. et al. Alterations in aortic endothelial cell morphology and cytoskeletal protein synthesis during cyclic tensional deformation. *J. Vasc. Surg.*, v. 7, p. 130-138, 1988.

THAMPATTY, B. et al. Leukotriene B4 at low dosage negates the catabolic effect of prostaglandin E2 in human patellar tendon fibroblasts. *Gene*, v. 372, p. 103-109, 2006.

TIAN, L. et al. Downregulation of electroacupuncture at ST36 on TNF-alpha in rats with ulcerative colitis. *World J Gastroenterol*, v. 9, n. 5, p. 1028-1033, 2003.

VARGA, J. *et al.* PGE₂ causes a coordinate decrease in the steady state levels of fibronectin and types I and III procollagen mRNAs in normal human dermal fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 147, n. 3, p. 1282-1288, 1987.

VIDAL, B. C.; VILARTA, R. Articular cartilage: collagen II-proteoglycans interactions. Availability of reactive groups. Variation in birefringence and differences as compared to collagen I. *Acta Histochem*, v. 83, n. 2, p. 189-205, 1988.

VIDAL, B. C. The part played by proteoglycans and structural glycoproteins in the macromolecular orientation of collagen bundles. *Cell Mol Biol Incl Cyto Enzymol*, v. 26, n. 4, p. 415-421, 1980.

VOGEL, K.; FISHER, L. Comparisons of antibody reactivity and enzyme sensitivity between small proteoglycans from bovine tendon, bone, and cartilage. *J Biol Chem*, v. 261, n. 24, p. 11334-11340, 1986.

WANG, J. Mechanobiology of tendon. *J Biomech*, v. 39, n. 9, p. 1563-1582, 2006.

WANG, J. *et al.* Electroacupuncture downregulates TLR2/4 and pro-inflammatory cytokine expression after surgical trauma stress without adrenal glands involvement. *Brain Res Bull*, v. 80, n. 1-2, p. 89-94, 2009.

WEBER, K.; OSBORN, M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem*, v. 244, n. 16, p. 4406-4412, 1969.

WOO, S. *et al.* Tissue engineering of ligament and tendon healing. *Clin Orthop Relat Res*, n. 367 Suppl, p. S312-23, 1999.

XUE, C. *et al.* Effect of acupuncture in the treatment of seasonal allergic rhinitis: a randomized controlled clinical trial. *Am J Chin Med*, v. 30, n. 1, p. 1-11, 2002.

YAMAMURA, Y. *Acupuntura Tradicional: A Arte de Inserir*. 2. ed. São Paulo: ROCA, 2001.

YIM, Y. et al. Electro-acupuncture at acupoint ST36 reduces inflammation and regulates immune activity in Collagen-Induced Arthritic Mice. *Evid Based Complement Alternat Med*, v. 4, n. 1, p. 51-57, 2007.

ZHANG, S. et al. Non-opioid-dependent anti-inflammatory effects of low frequency electroacupuncture. *Brain Res Bull*, v. 62, n. 4, p. 327-334, 2004.

ZIJLSTRA, F. et al. Anti-inflammatory actions of acupuncture. *Mediators Inflamm*, v. 12, n. 2, p. 59-69, 2003.

ZINGALES, B. Analysis of protein sodium dodecyl sulfatepolyacrylamide gel electrophoresis. In: C, M. (Ed.). *Genes and Antigens of Parasites*. Rio de Janeiro: Fiocruz, p. 357-363, 1984.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O tratamento da EA nos pontos *Zusanli* (E-36) e *Chengshan* (B-57) com os parâmetros utilizados nesse estudo, não alterou o conteúdo de PNCs, GAGs, a atividade enzimática da MMP-2 e a organização dos feixes de colágeno durante a fase proliferativa do processo de reparo em tendões parcialmente lesados. No entanto, houve um aumento significativo da concentração de hidroxiprolina o que sugere que a EA estimula a produção de colágeno. A organização das fibras de colágeno no grupo tratado com EA também aumentou.

Existem algumas limitações neste estudo: Primeira - As análises foram realizadas em apenas um intervalo de tempo após a lesão e não foi considerado se o efeito da EA se estendeu para a fase de remodelamento do processo de cicatrização. Segunda - Não foi mensurada a presença e a influência da mecanotransdução, ou seja, se através de estímulo

mecânico gerado pela agulha de acupuntura houve alteração nas características bioquímicas e morfológicas do tendão calcâneo após a lesão. Terceira - Não foi avaliado se houve o efeito antiinflamatório da EA e sua relação com o processo de reparo do tendão. Quarta - O aumento de colágeno no grupo submetido à EA não foi classificado como sendo do tipo I ou tipo III. A diferença entre esses tipos tem influência direta sobre as propriedades mecânicas do tendão. Quinta - As propriedades biomecânicas dos tendões em processo de cicatrização submetidos à EA precisam ser avaliadas em estudos futuros.

Considerando o aumento da procura por parte da população pela acupuntura ou eletroacupuntura e a alta incidência de lesões em tecidos moles, sobretudo em tendões, estudos futuros são necessários para esclarecer os efeitos terapêuticos da EA e seus respectivos mecanismos de ação em tais lesões.

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha Dissertação de Mestrado intitulada "O EFEITO DA ELETROACUPUNTURA NOS PONTOS ZUSANLI (E-36) E CHENGSHAN (B-57) SOBRE O PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DO TENDÃO CALCÂNEO DE RATOS APÓS TENOTOMIA PARCIAL: UMA ANÁLISE BIOQUÍMICA E MORFOLÓGICA".

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

(X) tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões) de Bioética ou Biossegurança*: Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNICAMP, sob Protocolo(s) nº 2260-1.

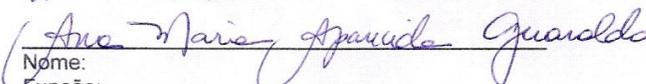
** Caso a Comissão seja externa à UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*


Aluno(a): Marcos dos Santos de Almeida


Orientador(a): Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido


Nome:
Função:

Profa. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/UNICAMP