UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia

ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

Rubens dos Santos Rosa

**Efeito sinérgico da associação exercício/aquecimento nas propriedades
mecânicas e estruturais do tendão calcâneo**

São Carlos

2014

Rubens dos Santos Rosa

**Efeito sinérgico da associação exercício/aquecimento nas propriedades
mecânicas e estruturais do tendão calcâneo**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia – Escola de Engenharia São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de doutor em Ciências

Área de Concentração: Bioengenharia

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Maria de Guzzi Plepis

Versão Corrigida

São Carlos

2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES
TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO,
PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento
da Informação do Serviço de Biblioteca – EESC/USP

R788e Rosa, Rubens dos Santos
 Efeito sinérgico da associação exercício/aquecimento
nas propriedades mecânicas e estruturais do tendão
calcâneo / Rubens dos Santos Rosa ; orientador Ana Maria
de Guzzi Plepis. -- São Carlos, 2014.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação e Área de
Concentração em Bioengenharia) -- Escola de Engenharia de
São Carlos da Universidade de São Paulo.

1. Propriedades mecânicas. 2. Tendão. 3. Aquecimento.
I. Título.

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia
EESC / FMRP / IQSC

Rubens dos Santos Rosa

Título: "Efeito sinérgico da associação exercício/aquecimento nas propriedades mecânicas e estruturais do tendão calcâneo".

TESE APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INTERUNIDADES BIOENGENHARIA - EESC/FMRP/IQSC DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
DOUTOR EM CIÊNCIAS NA ÁREA DE BIOENGENHARIA.

Aprovado em: 19 / 03 / 2014

Profa. Dra. Ana Maria de Guzzi Plepis (Orientadora) Universidade de São Paulo - USP

Resultado: aprovado

Assinatura: Ana Maria de Guzzi Plepis

Profa. Dra. Virginia da Conceição Amaro Martins

Universidade de São Paulo - USP

Resultado: aprovado

Assinatura: Virginia da Conceição Amaro Martins

Prof. Dr. Marcelo Rodrigues da Cunha

Faculdade de Medicina de Jundiaí - FMJ

Resultado: APROVADO

Assinatura: Marcelo Rodrigues da Cunha

Prof. Dr. Mario Jefferson Quirino Louzada

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP

Resultado: aprovado

Assinatura: Mario Jefferson Quirino Louzada

Prof. Dr. José Carlos Silva Camargo Filho

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP

Resultado: aprovado

Assinatura: José Carlos Silva Camargo Filho

Homologado em: ____ / ____ / ____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Rubens e Aglacir (in memoriam), que além de terem me dado à vida, me deram a oportunidade para completar mais esta etapa, me deram apoio carinho, compreensão e amor. Ainda sinto e sempre sentirei muita falta de vocês.

À minha esposa Célia Regina que nos momentos mais duros e difíceis de minha vida, me deu força, carinho, compreensão e amor para que eu pudesse superar mais esta trajetória.

AGRADECIEMNTO ESPECIAL

*À minha orientadora e professora, Dra. Ana Maria de Guzzi Plepis,
pela orientação científica, ensinamentos, incentivo, confiança, paciência
e amizade*

AGRADECIEMNTOS

Ao professor e amigo Mário Jefferson que me acolheu em seu Laboratório se comprometeu e disponibilizou o seu tempo e interesse em me ajudar em todos os momentos que eu necessitei

Ao professor José Carlos (Zeca) que além de ter transmitido os seus conhecimentos contribuiu de forma gentil e valiosa na produção e leitura das lâminas histológicas deste trabalho

Ao professor Rubens Bernardes Filho que me deu a oportunidade de realizar em seu laboratório as medidas de microscopia de força atômica

Ao professor Nivaldo Parizotto por ter me auxiliado e ensinado a obter as medidas de birrefringência

Ao professor Oscar Peitl Filho por ter me disponibilizado o Laboratório de Materiais e Vidros – LAMAV – UFSCar – São Carlos

Ao professor Luciano Cintra por ter cedido espaço e tempo para a realização da captura de imagens no Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia Araçatuba – FOA – UNESP

À Dra. Virgínia, que me ajudou e colaborou de forma eficiente na formatação final do texto

Ao amigo Pedro Florindo do Departamento de Apoio a Pesquisa em Saúde Animal – DAPSA – UNESP - Araçatuba, pela ajuda, desenvolvimento e comprometimento para a execução deste trabalho

Ao professor e amigo Fábio Yoshikazu Kodama que colaborou no procedimento cirúrgico, ensaios mecânicos de tração e nas análises estatística

Ao Guilherme que ajudou no procedimento cirúrgico e na captura de imagens deste trabalho

Ao Matheus filho de meu amigo José Augusto que disponibilizou seu tempo e me ajudou no procedimento experimental

À Bruna que me ajudou nos ensaios mecânicos de tração

À sempre competente e eficiente Janete que sempre me ajudou e auxiliou nos momentos que precisei

À minha Tia Aglamir (in memoriam) e ao meu Tio João que sempre acreditaram no meu potencial e sempre estiveram ao meu lado quando eu precisei

Às minhas avós Virgínia e Maria Rosa pelos bons ensinamentos transmitidos ao longo de minha vida

Ao meu primo Bruno e sua esposa Márcia, que sempre torceram e me deram apoio mesmo estando distantes

Às minhas queridas sobrinhas Giulia e Pietra pelos bons momentos vividos ao lado de vocês

Aos amigos de longa data José Otávio, Silvio, Fernando Bacelar, José Alberto, Fernando Rodrigues, Júlio Bilac, Júlio Testa, Gapinha, pela amizade, consideração e respeito de todos vocês

Aos amigos e companheiros de trabalho (professores e coordenadores) que sempre me deram força nos momentos que precisei

Ao sempre e eterno amigo Fábio Camilo, Fabiana e família pela amizade construída ao longo do tempo

Ao Nandão que sempre me acolheu em seu lar em São Carlos

À família Wistar, por terem me proporcionado a oportunidade da pesquisa e literalmente darem a vida por este trabalho

À todos que direta ou indiretamente ajudaram na concretização deste trabalho

RESUMO

ROSA, R. S. **Efeito sinérgico da associação exercício/aquecimento nas propriedades mecânicas e estruturais do tendão calcâneo.** 2014. 145 f. Tese (Doutorado) Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia – Escola Engenharia de São Carlos - EESC / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP / Instituto de Química de São Carlos – IQSC, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

O aquecimento terapêutico e o treinamento com saltos verticais são modalidades de escolha para tratamentos nas várias áreas da medicina e da fisioterapia. Na literatura poucos estudos avaliaram a resistência do tendão calcâneo pós-aquecimento, principalmente em tecidos aquecidos a temperaturas elevadas (42 e 45°C). Este estudo teve o objetivo de comparar certas propriedades mecânicas do tendão calcâneo de ratos como: força no limite de resistência máxima (N), rigidez (N/m) e energia absorvida até o ponto de ruptura (mJ), após o aquecimento induzido *in vivo* por convecção associado ao exercício físico (saltos verticais) e posteriormente investigar quantitativamente e qualitativamente as alterações estruturais na proteína colágeno presente no tendão, por meio de análises histológicas (hematoxilina e eosina, picro-sirius), força atômica (AFM) e birrefringência. No presente estudo foram utilizados 35 Ratos Albinus da Raça Wistar, todos machos divididos em 7 grupos (grupo controle GC, I, II, III, IV, V e VI). O GC foi utilizado exclusivamente para análises histológicas, os grupos I (sem alteração térmica), III (42°C) e V (45°C) não passaram por exercícios físicos, os grupos II (sem alteração térmica), IV(42°C) e VI (45°C) passaram por exercícios físicos (saltos verticais) e todos os grupos passaram por ensaio mecânico de tração. De uma maneira generalizada os resultados para as análises mostraram uma diferença do grupo controle GC, I, II em relação aos grupos III, IV, V e VI, o que fez perceber que em temperaturas elevadas há danos no tecido tendíneo e em temperaturas iguais e ou acima de 42°C e 45°C associado ao exercício físico de saltos verticais o dano acentua-se. Há um início de danos ao tecido tendíneo, acentuando-se na temperatura de 45°C e os eventos constatados nas análises histológicas foram comprovados nos resultados dos ensaios mecânicos de tração.

Palavras chave: Propriedades mecânicas, tendão, aquecimento

ABSTRACT

ROSA, R. S. Synergistic effect of the combination exercise/heat on the mechanical and structural properties of the Achilles tendon. 2014. 145 f. Tese (Doutorado) Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia – Escola Engenharia de São Carlos - EESC / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP / Instituto de Química de – IQSC, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

Therapeutic heating and vertical jumps are training modalities of choice for treatment in various areas of medicine and physiotherapy. In the literature, few studies have evaluated the resistance of the Achilles tendon post-heating, especially in tissues heated to high temperatures (42 to 45 °C). This study aims to compare certain mechanical properties of the Achilles tendon of rats as: strength in the limit of maximum resistance (N), stiffness (N/m) and energy absorbed to the point of rupture (mJ) after heat induction in vivo by convection associated with exercise (vertical jumps) and subsequently investigate qualitatively and quantitatively the structural changes in collagen protein present in the tendon by histological analysis (hematoxylin and eosin, picro-sirius red), atomic force (AFM) and birefringence. The present study used 35 Wistar rats, all males divided into 7 groups (control group GC, I, II, III, IV, V e VI). GC was used exclusively for histological analysis, the group I (no thermal alteration), III (42°C) and V (45°C) did not undergo physical exercises, groups II (without thermal alteration), IV (42°C) and VI (45°C) underwent exercise (vertical jumps) and all groups underwent mechanical tests. the results for the analyzes showed a difference between the GC, I, II groups in relation to III, IV, V and VI, showing that at elevated temperatures occurred a damage in tendon tissue and for temperatures equal or above 42°C and 45°C associated with the exercise of vertical jumps the damage is accentuated. There is an early tissue damage, with a peak temperature of 45°C and the events recorded in the histologic analyses were confirmed in the results of tensile test.

Key words: Mechanical properties, tendon, heating

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Conformação biológica de um filamento simples da hélice tríplice da proteína colágeno.....	32
Figura 2. Três filamentos em cores diferentes do modelo estrutural compacto da hélice tríplice da proteína colágeno.	33
Figura 3. Figura esquemática da estrutura hierárquica do tendão (adaptado).	38
Figura 4. Esquema do funcionamento de um Microscópio de Força Atômica.	44
Figura 5. Mapa de forças entre amostra e agulha em função da distância, caracterizando os diferentes modos de trabalho do microscópio de força atômica.	45
Figura 6. Esquema geral da montagem e funcionamento da microscopia por força atômica em modo contato. O feixe laser incide sobre a alavanca; sua reflexão é detectada por um fotodetector sensível à posição (PSPD), o que permite medir a deflexão da alavanca devido às forças de interação entre ponta amostra.	46
Figura 7. Esquema geral da montagem e funcionamento da microscopia por força atômica em modo não contato. Variações na amplitude da oscilação da alavanca permitem que sejam adquiridas imagens topográficas com forças repulsivas da ordem de 0,01 nN	47
Figure 8. Representação esquemática da configuração do microscópio de luz polarizada (adaptado).....	49
Figura 9. Representação esquemática de birrefringência.	51
Figura 10. Orientação em ângulo de 45° (direita/esquerda) do plano de polarização do corpo de prova..	52
Figura 11. Orientação em ângulo de 0° entre o polarizador e o analisador, ângulo que proporciona o desaparecimento das imagens birrefringentes e um escurecimento da imagem..	52
Figura 12. Ilustração de um ensaio em tendão calcâneo bovino na Máquina Universal de Ensaio de Tração.	60
Figura13. Curva representativa da carga <i>versus</i> deformação.....	62
Figura 14. Contensor para imobilização específica do rato.	67
Figura 15. Banho hidrotérmico.	68
Figura 16. Termômetro digital.	68

Figura 17. Termômetro infravermelho.	69
Figura 18. Esquema ilustrando o treinamento de saltos verticais.	70
Figura 19. Colete torácico para ratos.	71
Figura 20. Músculo gastrocnêmios (a), tendão calcâneo (b) e pé do rato (c).	72
Figura 21. Garra auto-travante.	73
Figura 22. Garras e mordentes de metal.	73
Figura 23. Conjunto (músculo gastrocnêmio, tendão calcâneo e pé do animal) acoplado à máquina durante o ensaio de tração.	74
Figura 24. Tendões dissecados e tenotomizados	76
Figura 25. Corte histológico do tendão calcâneo corado por hematoxilina e eosina, grupo controle (10x).	85
Figura 26. Corte histológico do tendão calcâneo corado por hematoxilina e eosina, grupo controle (20x).	86
Figura 27. Corte histológico do tendão calcâneo corado por hematoxilina e eosina, grupo I (10x).	87
Figura 28. Corte histológico do tendão calcâneo corado por hematoxilina e eosina, grupo I (20x).	87
Figura 29. Corte histológico do tendão calcâneo corado por hematoxilina e eosina, grupo I (40x).	88
Figura 30. Corte histológico do tendão calcâneo corado por hematoxilina e eosina, grupo II (10x).	89
Figura 31. Corte histológico do tendão calcâneo corado por hematoxilina e eosina, grupo II (20x).	89
Figura 32. Corte histológico do tendão calcâneo corado por hematoxilina e eosina, grupo III (10x).	90
Figura 33. Corte histológico do tendão calcâneo corado por hematoxilina e eosina, grupo III. (20x).	90
Figura 34. Corte histológico do tendão calcâneo corado por hematoxilina e eosina, grupo IV (10x).	91
Figura 35. Corte histológico do tendão calcâneo corado por hematoxilina e eosina, grupo IV (20x).	91

Figura 36. Corte histológico do tendão calcâneo corado por hematoxilina e eosina, grupo V (10x).	92
Figura 37. Corte histológico do tendão calcâneo corado por hematoxilina e eosina, grupo V (10x).	93
Figura 38. Corte histológico do tendão calcâneo corado por hematoxilina e eosina, grupo V (20x).	94
Figura 39. Corte histológico do tendão calcâneo corado por hematoxilina e eosina, grupo V (40x).	94
Figura 40. Corte histológico do tendão calcâneo corado por hematoxilina e eosina, grupo VI (10x).	95
Figura 41. Corte histológico do tendão calcâneo corado por hematoxilina e eosina, grupo VI (10x).	96
Figura 42. Fibra colágena de tendão calcâneo corado com picro-sirius red, grupo controle (100x).	98
Figura 43. Fibra colágena de tendão calcâneo corado com picro-sirius red, grupo I (100x).	99
Figura 44. Fibra colágena de tendão calcâneo corado com picro-sirius red, grupo II (100x).	99
Figura 45. Fibra colágena de tendão calcâneo corado com picro-sirius red, grupo III (100x).	100
Figura 46. Fibra colágena de tendão calcâneo corado com picro-sirius red, grupo IV (100x).	101
Figura 47. Fibra colágena de tendão calcâneo corado com picro-sirius red, grupo V (100x).	101
Figura 48. Fibra colágena de tendão calcâneo corado com picro-sirius red, grupo VI (100x).	102
Figura 49. Porcentagens (%) de colágeno tipo I (fibras grossas) para os animais que passaram pelo banho hidrotérmico comparados ao grupo controle.	102
Figura 50. Porcentagem de colágeno tipo I (fibras grossas) para os animais que passaram pelos banhos hidrotérmicos associado ao exercício físico.	104

Figura 51. Imagem de tendão calcâneo obtida por microscopia de força atômica, grupo controle (5,0 x 5,0 μm).....	106
Figura 52. Imagem de tendão calcâneo obtida por microscopia de força atômica, grupo I (5,0 x 5,0 μm)	106
Figura 53. Imagem de tendão calcâneo obtida por microscopia de força atômica, grupo II (2,0 x 2,0 μm)	107
Figura 54. Imagem de tendão calcâneo obtida por microscopia de força atômica, grupo III (2,0 x 2,0 μm).....	107
Figura 55. Imagem de tendão calcâneo obtida por microscopia de força atômica, grupo IV (2,49 x 2,49 μm).....	108
Figura 56. Imagem de tendão calcâneo obtida por microscopia de força atômica, grupo V (2,47 x 2,47 μm).....	108
Figura 57. Imagem de tendão calcâneo obtida por microscopia de força atômica, grupo VI (5,0 x 5,0 μm).....	109
Figura 58. Representação Box-Plot das medidas de perimetria topográfica (μm) dos grupos controle GC, I, III e V, para os animais que passaram pelo banho hidrotérmico.	110
Figura 59. Representação Box-Plot das medidas de perimetria topográfica (μm) de todos os grupos pareados, para os animais que passaram pelos banhos hidrotérmicos associado ao exercício físico.....	111
Figura 60. Imagens de microscopia de birrefringência das fibras colágenas do grupo controle.....	114
Figura 61. Imagens de microscopia de birrefringência das fibras colágenas do grupo I.	114
Figura 62. Imagens de microscopia de birrefringência das fibras colágenas do grupo II.	115
Figura 63. Imagens de microscopia de birrefringência das fibras colágenas do grupo III.....	115
Figura 64. Imagens de microscopia de birrefringência das fibras colágenas do grupo IV.....	116
Figura 65. Imagens de microscopia de birrefringência das fibras colágenas do grupo V.....	116

Figura 66. Imagens de microscopia de birrefringência das fibras colágenas do grupo VI.....	117
Figura 67. Representação Box-Plot das medidas de birrefringência (nm) dos grupos controle GC, I, III e V para os animais que passaram pelos banhos hidrotérmicos.	118
Figura 68. Representação Box-Plot das medidas de birrefringência (nm) de todos os grupos para os animais que passaram pelos banhos hidrotérmicos associado ao exercício físico.....	120
Figura 69. Curvas representativas do ensaio mecânico de tração.	122
Figura 70. Representação Box-Plot dos valores da força máxima de tração (N) para os animais que passaram pelos banhos hidrotérmicos.	124
Figura 71. Representação Box-Plot dos valores da rigidez (N/m) para os animais que passaram pelos banhos hidrotérmicos.	124
Figura 72. Representação Box-Plot dos valores da energia absorvida pelo corpo até o ponto de ruptura (mJ) para os animais que passaram pelos banhos hidrotérmicos.	125
Figura 73. Representação Box-Plot dos valores da força máxima (N) para os animais que passaram pelo banho hidrotérmico associado ao exercício físico.	127
Figura 74. Representação Box-Plot dos valores da rigidez (N/m) para os animais que passaram pelos banhos hidrotérmicos associado ao exercício físico.	127
Figura 75. Representação Box-Plot dos valores da energia absorvida pelo corpo até o ponto de ruptura (mJ) para os animais que passaram pelos banhos hidrotérmicos associado ao exercício físico.....	128

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Média percentual (%) do colágeno tipo I (fibras grossas) para os animais que passaram pelo banho hidrotérmico.	103
Tabela 2. Média percentual (%) do colágeno tipo I (fibras grossas) para os animais que passaram pelo banho hidrotérmico com associação de exercícios físicos.....	104
Tabela 3. Valores da perimetria topográfica (μm), para os animais que passaram pelos banhos hidrotérmicos.	111
Tabela 4: Valores da perimetria topográfica (μm) de todos os grupos analisados para os animais que passaram pelos banhos hidrotérmicos associado ao exercício físico.	112
Tabela 5. Valores de birrefringência (nm), obtidos mediante os retardos ópticos dos grupos analisados para os animais que passaram pelos banhos hidrotérmicos.	118
Tabela 6: Valores de birrefringência (nm) dos grupos analisados para os animais que passaram pelos banhos hidrotérmicos associado ao exercício físico.	121
Tabela 7: Valores das propriedades mecânicas dos grupos analisados para os animais que passaram pelos banhos hidrotérmicos obtidos por meio do ensaio de tração.	125
Tabela 8: Valores numéricos das propriedades mecânicas dos grupos analisados aos pares para os animais que passaram pelos banhos hidrotérmicos com associação do exercícios físicos obtidos por meio do ensaio de tração.	129

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Å – Angstrons

A – Área de secção transversa

AFM – Microscopia de Força Atômica

An – Analisador

BF – Birrefringência de forma

CEUA – Comissão de Ética de Uso Animal

CLM – Carga no limite máximo

cm – Centímetros

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

CV – Coeficiente de variação

E – Constante de proporcionalidade

E-: animais que não sofreram exercícios físicos (saltos verticais)

E+: animais que sofreram exercícios físicos (saltos verticais)

EM +: animais que sofreram ensaio mecânico de tração

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

F – Força aplicada

FCT – Faculdade de Ciências e Tecnologia

FMVA – Faculdade de Medicina Veterinária

FOA – Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Gly – Glicina

H.E – Hematoxilina e eosina

Hz – Hertz

IBM – International Business Machines

kHz – Kiloherzt

L_0 – Comprimento inicial

LCA – Ligamento cruzado anterior.

mJ – Milijoule

mL – Mililitro

mm – Milímetro

n – Índice de refração

N – Newtons

N/m – Newtons/metro

N/mm^2 – Newtons/milímetro ao quadrado

n_e – Índice de refração do meio na direção onde se propaga o raio extraordinário

nm – Nanômetros

n_o – Índice de refração do meio na direção onde se propaga o raio ordinário

Po – Polarizador

PSPD – Fotodetector sensível à posição

RO – Retardos ópticos

Si_3N_4 – Nitreto de silício

SiO_2 – Óxido de silício

ST°: animais que não foram submetidos a temperaturas

TM – Tapping mode

UNESP – Universidade Estadual Paulista

X – Prolina

Y – Hidroxiprolina

ΔL – Deformação sofrida

ϵ – Épsilon (Deformação)

σ – Sigma (Tensão)

λ – Lambda - Comprimento de onda

μm – Micrômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	22
2 HIPÓTESE	25
3 OBJETIVO	26
4 JUSTIFICATIVA	27
5 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	28
5.1. Temperatura corporal humana.....	28
5.2. Termoterapia (calor terapêutico)	29
5.2.1. Modalidades da termoterapia.....	29
5.2.2. Critério de quantificação térmica	31
5.3. Colágeno.....	32
5.4. Tecido conjuntivo	34
5.4.1. Tecido conjuntivo frouxo	35
5.4.2. Tecido conjuntivo denso.....	36
5.5. Tendão	37
5.5.1.Viscoelasticidade do tendão	39
5.5.2. Tendão calcâneo	39
5.5.3. Lesões tendinosas	40
5.6. Técnicas de avaliação	42
5.6.1. Histologia com coloração de hematoxilina e eosina - H.E.....	42
5.6.2. Histologia com coloração de picro-sirius red	42
5.6.3. Microscopia de força atômica - AFM.....	43
5.6.3.1. Princípios básicos de operação do microscópio de força atômica.....	43
5.6.4. Microscopia de luz polarizada	47

5.6.4.1. Características do microscópio de luz polarizada.....	48
5.6.4.2. Propriedades anisotrópicas ópticas	49
5.6.4.3. Birrefringência de materiais	50
5.7. Estudo biomecânico.....	55
5.7.1. Ensaio mecânico.....	56
5.7.1.1. Ensaio mecânico de tração	57
5.7.1.2. Propriedades mecânicas do tendão	63
6 MATERIAIS E MÉTODOS.....	65
6.1. Animais.....	65
6.2. Banhos hidrotérmico	66
6.3. Exercícios de saltos verticais	69
6.4. Retirada do material.....	71
6.5. Ensaio de tração.....	72
6.6. Preparação dos tecidos (tendões), para análises microscópicas	76
6.6.1. Preparação das lâminas para análises histológicas por coloração com hematoxilina e eosina - H.E, picro-sirius red	78
6.6.2. Preparação das lâminas para análises de microscopia de força atômica - AFM e de microscopia de polarização	800
6.7. Análise Estatística	82
7 RESULTADOS E DISCUSSÃO	84
7.1. Análise visual dos animais durante e após o procedimento experimental	84
7.2. Análise morfológica qualitativa das lâminas coradas por hematoxilina e eosina - H.E	84
7.3. Análise morfológica qualitativa das lâminas coradas por picro-sirius red.....	97

7.4. Análise morfológica qualitativa das imagens obtidas por microscopia de força atômica - AFM	105
7.5. Análise qualitativa e quantitativa das medidas de birrefringência	113
7.6. Análise quantitativa dos ensaios mecânicos de tração	122
8 CONCLUSÃO	132
REFERÊNCIAS ¹	134
ANEXO A Aprovação do comitê de ética.....	145

1 INTRODUÇÃO

Terapias com o uso do aquecimento são utilizadas com frequência em áreas de saúde, tais como ortopedia, dermatologia, oftalmologia, entre outras. A bibliografia médica divulga que na prática terapêutica com aquecimento os tecidos são submetidos a temperaturas que não ultrapassam os 45°C ($\cong 8,5$ acima da média da temperatura corpórea normal), (WRIGHT E HUMPREY, 2002).

Os recursos térmicos de aquecimento, em diversas formas, são utilizados com finalidades terapêuticas desde os tempos antigos (DOHERTY et al., 2009). Na prática clínica da fisioterapia, a termoterapia é amplamente empregada, principalmente para o tratamento de lesões do sistema músculo esquelético como: ligamentos, ossos, músculos e tendões (NADLER et al., 2004; ZHANG et al., 2008). Para que os efeitos terapêuticos decorrentes da aplicação de calor sejam obtidos, é necessário que o tecido alvo alcance uma faixa ideal de temperatura de tratamento (DRAPER et al., 1999). Esta faixa estende-se de 40°C a 45°C por pelo menos 5 minutos de terapia (DRAPER et al., 1999; ROBERTSON et al., 2005). Estando fora desta faixa os tratamentos tornam-se ineficazes ou danosos. Para um tratamento tornar-se eficaz e seguro são essenciais, a compreensão do comportamento da temperatura tecidual em resposta às aplicações térmicas (SILVA et al., 2011).

De acordo com os estudos de Maggi et al., (2008), o dano térmico ao tecido provoca destruição do citoesqueleto, da membrana celular e da microvasculatura regional. Tais lesões podem causar interrupção do ciclo reprodutivo celular e do fluxo sanguíneo no local, o que predispõe à necrose tecidual (KNIGHT et al., 2001).

Portanto, o grande sucesso das terapias localizadas que utilizam-se do aquecimento como forma de aplicação terapêutica é a alta dependência do entendimento do

comportamento da temperatura e do processo térmico que ocorre no interior dos tecidos alvo e adjacente (KARAA et al., 2005). Todavia, embora a precisão *in vivo* da temperatura tecidual possam ser aplicadas com esse objetivo, até o momento existem riscos associados à realização desses procedimentos e grandes dificuldades de aplicabilidade, principalmente pelo caráter invasivo, pela imprecisão no controle de diversos parâmetros e pelas limitações das medidas (TROBEC et al., 2008; SHRIVASTAVA e VAUGHAN, 2009).

Ocorrem diferentes efeitos clínicos quando as células sofrem imposições térmicas supra fisiológicas, tais como a expressão aumentada do choque de aquecimento de proteínas, morte celular, desnaturação da proteína e coagulação do tecido. Associadas a isso podem ocorrer mudanças na estrutura, função e propriedades dos tecidos. A composição tecidual inclui diferentes tipos de células, proteínas, água em abundância e íons que respondem de diferentes formas frente às temperaturas supra fisiológicas impostas, onde cada qual apresenta comportamentos característicos.

Nas cápsulas articulares, tendões e ligamentos o resultado de temperaturas impostas por aquecimento térmico e tempos de imposição a esta temperatura vão resultar em alterações morfológicas e redução de volume, além do encolhimento do tecido.

De acordo com Nakagaki et al., (2007), existem também outros fatores influenciadores no metabolismo do tendão, que alteram a sua composição química, a sua estrutura bem como as propriedades mecânicas que ocorrem durante o seu desenvolvimento e maturação, dentre esses fatores citados anteriormente estão os exercícios.

Segundo Pajala et al., (2002), as rupturas agudas do tendão calcâneo são relativamente comuns, sendo que 81% a 89% ocorrem durante a prática desportiva, mas podem atingir não só atletas como população geral (PAAVOLA 2002). O aumento ou diminuição da atividade física pode causar alterações nas propriedades biomecânicas e na composição dos tendões (ROGATTO et al., 2004) e o tendão calcâneo é um dos que mais

sofre lesões no corpo humano, estando entre as principais as rupturas agudas (WREN et al., 2001; HARRIS e PEDUTO, 2006).

2 HIPÓTESE

1- O aumento da temperatura provoca alterações histológicas no colágeno do tendão calcâneo de ratos;

2- O aumento da temperatura provoca alterações nas propriedades mecânicas do tendão calcâneo de ratos;

3- O aquecimento da temperatura associado ao exercício físico (saltos verticais) provoca alterações histológicas no colágeno do tendão calcâneo de ratos;

4- O aquecimento da temperatura associado ao exercício físico (saltos verticais) provoca alterações estruturais nas propriedades mecânicas do tendão calcâneo de ratos;

3 OBJETIVO

1- Comparar propriedades mecânicas do tendão calcâneo de ratos como: força no limite de resistência máxima, rigidez, energia absorvida pelo corpo de prova (tendões) até o seu ponto de ruptura após o aquecimento induzido *in vivo* por convecção;

2- Avaliar as alterações das propriedades mecânicas do tendão calcâneo de ratos com uso do aquecimento terapêutico associado ao exercício físico resistido (saltos verticais em meio aquático);

3- Investigar quantitativamente e qualitativamente por meio de análises histológicas as alterações estruturais na proteína colágeno.

4 JUSTIFICATIVA

A ideia deste trabalho consistiu na verificação das possíveis alterações das propriedades mecânicas do tendão calcâneo de ratos após aquecimento induzido *in vivo* por 10 min associado ao exercício físico (4 séries de 10 saltos verticais), bem como também observar o comportamento histológico do tendão calcâneo, já que os profissionais da área de saúde deparam-se constantemente com pacientes que são submetidos a um aquecimento prévio por meio da termoterapia induzida a 45°C com finalidade de aumentar a maleabilidade e a mobilidade articular e depois a um estresse biomecânico que consiste em caminhadas, corridas e saltos.

5 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

5.1. Temperatura corporal humana

Segundo Robertson et al., (2009) temperatura é a medida da quantidade de calor em relação aos níveis avaliados por receptores especiais encontrados na pele, mensurado por termômetro.

Os humanos são homeotérmicos e sua temperatura central média normal fica entre 36,5 e 37°C, quando mensurados por via oral ou sub axilar, independentemente das variações de temperatura ambiente (GUYTON e HALL, 2012).

De acordo com Mourão Jr.e Abramov (2009) o organismo consegue manter a homeostase com temperaturas que chegam até 38°C. Valores entre 30 a 42°C exigem do organismo maiores esforços para manter sua constância interna e sua estabilidade, essa faixa de temperatura é chamada zona de tolerância.

Segundo Garcia (2002), quando se está fora do padrão normal de temperatura tissular que é de 30°C a 42°C podem ocorrer danos e morte celular do tecido. As temperaturas dos tecidos periféricos, como pele, músculo e tecido subcutâneo, são geralmente menores que as temperaturas viscerais e sujeitos as flutuações mais intensas.

Ao aplicar aquecimento em grandes áreas do corpo humano ocorre à elevação da temperatura corporal interna, o que pode gerar um quadro de hipertermia, que eleva a temperatura corporal de forma progressiva. A causa da hipertermia é ocasionada quando o ser humano é exposto à temperaturas altas, atingindo ou ultrapassando 40°C, há vasodilatação periférica, abertura dos capilares, sequestro de grande quantidade de sangue periférico, posteriormente inicia-se o processo de insuficiência circulatória periférica denominado

choque térmico. Este processo se complica quando há sudorese em abundância, ocasionado à redução do volume plasmático (BRASILEIRO FILHO, 2011).

5.2. Termoterapia (calor terapêutico)

É a modificação da temperatura dos tecidos biológicos usada como um processo terapêutico, sendo algumas patologias beneficiadas pela ação do calor. A termoterapia está indicada nas patologias inflamatórias crônicas das articulações (artrites e sinovites) e dos tendões (tendinites), nos estiramentos e contusões musculares.

Todavia, nas moléstias vasculares periféricas que caracterizam-se por uma diminuição do fluxo sanguíneo arterial, neoplasias malignas, na gravidez, nas injúrias hemorrágicas ou onde há tendência à hemorragia e também em pacientes anestesiados, o aquecimento está contra indicado (GARCIA, 2002).

5.2.1. Modalidades da termoterapia

As modalidades da termoterapia são divididas em:

Calor superficial: transfere a sua energia ao corpo por condução, promove aquecimento da pele entre 40°C e 43°C com produção de efeitos terapêuticos,

Calor profundo: produz temperaturas mais altas e uma resposta mais vigorosa, a elevação da temperatura ocorre em ritmo rápido elevando a temperatura tecidual até próximo dos 45°C, e mantêm as temperaturas por um período prolongado (ANDREWS et al., 2005).

O calor pode ser transmitido por meio das modalidades que são: radiação, condução e convecção.

Radiação: é a conversão da energia em radiação eletromagnética, emite radiações caloríferas ricas em raios infravermelhos incandescentes, ocorrendo troca de energia entre

objetos no espaço não aquecendo o meio que se propaga só o corpo que a absorve (GARCIA, 2002, e ROBERTSON, 2005).

Condução: o calor é transferido de um local para outro local pelo movimento cinético entre os átomos e moléculas. As moléculas do material mais quente agitam-se e fornecem energia cinética ao material mais frio, sendo essa transferência chamada de condutividade térmica (GARCIA, 2002, e ROBERTSON, 2005).

Convecção: é transmissão de calor mediante a movimentação das partículas de um sólido e um meio fluido, o fluido pode ser líquido ou gasoso. O movimento dessas partículas ocorre por diferença de densidade entre as diversas partes do fluido gerada pela diferença de temperatura entre um corpo sólido e um fluido (GARCIA, 2002 e ROBERTSON, 2005).

A troca de calor é dependente da intensidade e do tempo de exposição de aplicação ao calor, estes fatores geram variações de temperatura e estão correlacionadas ao meio térmico de aplicação. O movimento cinético e aleatório dos átomos e moléculas nos tecidos propaga o calor transferido e a corrente sanguínea o conduz para outros locais.

As modalidades específicas terapêuticas que produzem calor terapêutico e suas formas de aplicações são:

- ✓ Bolsa quente ou bolsas hidrocloradas
- ✓ Turbilhões
- ✓ Banheiras de hidromassagem ou imersão em água parada
- ✓ Banhos de parafina
- ✓ Ondas curtas
- ✓ Ultra-som

5.2.2. Critério de quantificação térmica

Segundo Kitchen (2003) o conhecimento de padrões teóricos de produção de calor e a busca de informações do paciente são usados para informar a quantidade qualitativa de calor que está sendo produzida, pois os conceitos de variabilidade de temperatura como quente, morna, fria e gelada mudam de pessoa para pessoa e dependem da sensibilidade de cada uma. Esses padrões de sensibilidade são transmitidos pelo sistema sensorial do corpo humano e são insuficientes para dar uma noção absoluta da grandeza dessas energias. A sensação térmica depende da natureza do material tocado, da sensibilidade do observador e das condições que precedem o contato com o corpo enquanto a temperatura depende diretamente do estado cinético de suas moléculas, quanto maior for a agitação molecular, maior será a energia térmica desenvolvida.

Para mensurar a quantidade de aquecimento, pede-se ao paciente que relate a sensação térmica momentânea, este método é um método convencional de se determinar a dose (KITCHEN, 2003). Portanto, a sensação subjetiva de calor referido pelo paciente e a fase que encontra-se a enfermidade está baseada em uma escala criada chamada escala de Schliephake (MACHADO, 1991), ou seja:

- ✓ Calor muito débil: Imediatamente abaixo do limiar de sensibilidade;
- ✓ Calor débil: Imediatamente perceptível;
- ✓ Calor médio: Sensação clara de calor;
- ✓ Calor forte: No limite da tolerância.

Segundo Low e Reed (2001) o aquecimento acima de 45°C pode causar dano proteico e destruição de células e tecidos; em contrapartida Leitão e Leitão (1995) afirmam a tolerância de alguns tecidos a 50°C.

5.3. Colágeno

Nos mamíferos o colágeno é a proteína mais abundante do interstício com aproximadamente 25% das proteínas do organismo (BRASILEIRO FILHO, 2011). De acordo com os estudos de Alter (2010), o colágeno é encontrado nos tendões, ligamentos, aponeuroses, fáscia profunda, cápsula dos órgãos e derme. O grau de extensibilidade das fibras do colágeno é leve e suas proteínas estruturais são feixes que arranjam-se exceto sob tensão, sendo contudo, resistentes ao estresse de tração. Com isso, são as principais estruturas que constituem tendões e ligamentos que sofrem constante força de tração.

A molécula de colágeno é formada por três longas cadeias polipeptídicas, do tipo cadeia alfa, enroladas em espiral no sentido horário (alfa-hélice) de modo semelhante ao de uma corda torcida. Cada cadeia polipeptídica apresenta uma repetição tripla, $(\text{Gly-X-Y})_n$, onde Gly é a glicina, e X e Y são frequentemente prolina ou hidroxiprolina (Figura 1).

Figura 1: Conformação biológica de um filamento simples da hélice tríplice da proteína colágeno Fonte: Okuyama et al., 1981

Porém de cada três aminoácidos repetidos o terceiro sempre é a glicina. Em 20% dos aminoácidos da cadeia de colágeno, aparecem a prolina e hidroxiprolina e a união dessas três cadeias é mantida por ligações de hidrogênio (BRODSKY e PERSIKOV, 2005). A prolina e a hidroxiprolina, mantêm o arranjo do colágeno em forma de corda estável, resistente ao alongamento (Figura 2). Assim, quanto mais alta for a concentração desses

aminoácidos, maiores serão as resistências das moléculas ao alongamento, como o nitrogênio da prolina é fixado na estrutura do anel, ele evita a fácil rotação das regiões em que está localizada (ALTER, 2010).

Figura 2. Três filamentos em cores diferentes do modelo estrutural compacto da hélice tríplice da proteína colágeno. Fonte: Stryer, 1996.

Existem cerca de 29 tipos de cadeia alfa (20 genes diferentes) capazes de formar até 1.000 diferentes tipos de colágeno, dos quais 29 já foram identificados (JOBILING, R et al., 2014).

Células como macrófagos, mastócitos e algumas células indiferenciadas originadas do tendão, epitendão e paratendão têm a capacidade de sintetizar colágeno tipo I, que é o tipo mais comum de colágeno e as principais células responsáveis pela síntese de colágeno tipo I são os fibroblastos e osteoblastos (DÖLKEN, 2008).

Segundo Raimond et al., (2003) há um extenso número de diferentes tipos de colágeno, cada tipo de colágeno nos vertebrados é identificado por um número romano, que reflete a ordem a qual os diferentes tipos de colágeno foram descobertos. De acordo com Brasileiro Filho (2011) os mais bem definidos são o colágeno I, II, III e IV.

Colágeno tipo I: representam aproximadamente 80% do total de colágeno, ele forma as fibras mais espessas e é encontrado em todos os tecidos expostos à força de tração, tais como cápsulas, ligamentos, aponeuroses, tendões e tecido conjuntivo intramuscular e dos

nervos, às vezes também pode ser encontrado em discos intervertebrais e intra-articulares, assim como nos meniscos e ossos (DÖLKEN, 2008).

Colágeno tipo II: considerado colágeno fino que forma apenas fibrilas em vez de fibras, existe em todos os tecidos que sofrem intervenção frequente às forças de pressão, como parte dos discos intervertebrais, dos meniscos e dos discos intra-articulares, sua síntese está a cargo dos condroblastos (DÖLKEN, 2008).

Colágeno tipo III: este tipo de colágeno é sintetizado pelos fibroblastos e miofibroblastos, aparece com muita frequência na pele e abaixo da pele, nas membranas sinoviais e dentro dos órgãos internos, é um colágeno extremamente delicado, além das estruturas citadas anteriormente este tipo de colágeno é encontrado em todos os tecidos que apresentam ferimentos em vias de cicatrização, tem o objetivo de cicatrizar a ferida durante a fase de proliferativa, e mais tarde ele é substituído por um tipo de tecido conjuntivo mais firme e com maior capacidade funcional (DÖLKEN, 2008).

Colágeno tipo IV: é encontrado mais especificamente nas membranas celulares e nas membranas basais dos vasos, da pele e dos tecidos nervosos e musculares, a síntese deste tipo de colágeno está a cargo das células endoteliais epiteliais além dos fibroblastos (DÖLKEN, 2008).

5.4. Tecido conjuntivo

Segundo Dixon (2007), os tecidos são organizações coesas que têm funções especiais baseadas em suas propriedades específicas. No sentido mais amplo, qualquer tecido que forneça estrutura ou mantenha o corpo coeso (unido) pode ser classificado como tecido conjuntivo. O tecido conjuntivo é formado por um pequeno número de células em uma matriz de fibras e uma substância sólida, semi sólida ou líquida. Alguns tipos de tecidos conjuntivos são rígidos (p. ex., ossos); alguns são flexíveis e resistentes (como tendões e ligamentos) e o

sangue é um tecido conjuntivo líquido, conectando todas as células do corpo. Esses tecidos diferentes têm uma função especial, que liga as partes do corpo. Todos os tipos de tecido conjuntivo também têm uma estrutura distinta que pode ser observada ao microscópio.

Para explicar melhor o que é o tecido conjuntivo, pode ser útil identificar o que não corresponde ao tecido conjuntivo. Três tipos de tecido no corpo humano não são o tecido conjuntivo: são os tecidos epiteliais, nervoso e muscular.

O tecido conjuntivo forma um contínuo com o tecido epitelial, muscular e nervoso, assim como com outros componentes dos tecidos conjuntivos, a fim de manter um corpo funcionalmente integrado.

A maior parte dos tecidos conjuntivos origina-se do mesoderma, a camada germinativa dos tecidos embrionários (GARTNER e HIAT, 2003), e suas funções são: dar sustentação estrutural, servir de meio para trocas, ajudar a defesa e proteção do corpo, formar um local de armazenamento de gorduras.

Os tipos básicos de tecido conjuntivo são o tecido conjuntivo propriamente dito (tecido conjuntivo denso e tecido conjuntivo frouxo), a cartilagem, o osso, o sangue.

O tecido conjuntivo maduro é classificado em tecido conjuntivo propriamente dito (tecido conjuntivo frouxo, tecido conjuntivo denso, tecido conjuntivo reticular e tecido adiposo) e tecido conjuntivo especializado.

5.4.1. Tecido conjuntivo frouxo

Segundo Cormack (2003) o tecido conjuntivo frouxo é também conhecido como tecido conjuntivo areolar que preenche os espaços do corpo abaixo da pele fica abaixo do revestimento mesotelial da cavidade interna do corpo, está associado às adventícias dos vasos sanguíneos e envolve o parênquima das glândulas. O tecido conjuntivo frouxo caracteriza-se pela substância fundamental e fluida tecidual (fluido extracelular) abundante.

As células do tecido conjuntivo são: fibroblastos, células adiposas, macrófagos e mastócitos, também estão dispersas por toda a substância fundamental fibras de colágeno, reticulares e elásticas, frouxamente entrelaçadas.

5.4.2. Tecido conjuntivo denso

Contém a maioria dos mesmos componentes encontrados no tecido conjuntivo frouxo, diferindo por ter muito mais fibras e menos células. Neste tecido a orientação e disposição das fibras de colágeno tornam resistentes à tração. O tecido conjuntivo denso também é conhecido como tecido conjuntivo fibroso. Baseadas no arranjo de suas fibras de colágeno, duas formas distintas de tecido conjuntivo denso são reconhecidas, a forma modelada (ou regular) e a não-modelada (ou irregular).

Modelado (ou regular): os feixes de fibras estão dispostos de maneira paralela e estendem-se na direção da tensão na transmissão de trações unidirecionais. São encontrados em aponeuroses e tendões que aparentemente apresentam-se de forma larga e achatada espalhados em camadas fibrosas, sua função é a transmissão de força das contrações musculares aos ossos ou cartilagens.

Não-modelado (ou irregular): são resistentes a distensões em várias direções, pois a orientação de seus feixes de fibras aparece em vários planos não estando totalmente paralelo, este tipo de tecido tem muitas finalidades como: mantém o fluxo unidirecional no sistema circulatório, promove o envoltório protetor fibroso das cartilagens e ossos (CORMACK 2003).

5.5. Tendão

Os tendões são estruturas fundamentais para a execução de atividades de vida diária, consideradas atividades simples, como a execução do andar, subir e descer escadas, mas que requerem uma complexa estrutura que possibilita a movimentação e a coordenação do sistema ósteo-mio-articular. O tendão pode ser revestido por uma bainha sinovial, a qual facilita o deslizamento do tendão contra as estruturas adjacentes, que tem função de diminuir o atrito contra os acidentes ósseos e os tecidos (BENJAMIN e RALPHS, 2000, KANNUS, 2000).

De acordo com James e Wang (2006) o tendão tem uma estrutura multi-unidade hierárquica composta por moléculas de colágeno, fibrilas, feixes de fibras, fascículos e unidades de tendão que estão dispostas em paralelos ao eixo longo tendão (Figura 3).

Os tendões são mecanicamente responsáveis pelas transmissões de forças geradas no músculo ao osso, e, assim, permitir locomoção e melhorar a estabilidade articular. Além disso, tendões são tecidos vivos e respondem às forças mecânicas, alterando o seu metabolismo, bem como a suas propriedades estruturais e mecânicas (JAMES e WANG, 2006).

Segundo Alter (2010) em sua constituição morfológica o tendão varia em forma, tamanho e espessura, podendo ser laminado e cilíndrico, tendo um aspecto esbranquiçado praticamente incolor por causa da sua relativa a vascularidade, são compostos de 30% de colágeno e de 2% de elastina tudo dentro de uma matriz extracelular que contém de 60 a 70% de água, e o colágeno que representa ao redor de 70% do peso seco do tendão.

Figura 3: Figura esquemática da estrutura hierárquica do tendão (adaptado). Fonte: Silver *et al.*, 2003b.

Os tendões podem apresentar múltiplas variações em sua arquitetura, podem ser curtos e grossos como os tendões do quadríceps ou bem largos e finos como os tendões dos dedos das mãos (MAGNUSSON, 2003).

Os tendões têm características de tecido elástico com alta rigidez tênsil na direção de orientação das fibras (KILLIAN et al., 2012). Segundo Woo et al., (2005) aproximadamente 20% a 30% do peso seco do tendão é feita de proteoglicanos, glicosaminoglicanos. Além de elastina e de colágeno tipo I, muitos outros tipos de colágeno, incluindo III, V, IX, X, XI e XII, também estão presentes em tendões, embora em quantidades menores (WANG et al., 2012).

De acordo com Plaper et al., (2001) em repouso a característica morfológica das fibras de colágeno do tendão apresenta-se na forma ondulada, mas ao ser estirado em 2% no seu comprimento o tendão perde a sua morfologia.

5.5.1.Viscoelasticidade do tendão

Os tecidos biológicos não são perfeitamente elásticos e nem plásticos, porém exibem uma combinação de propriedades denominada viscoelasticidade, quando as cargas aplicadas são baixas, o tendão apresenta comportamento elástico, quando mais altas apresentam comportamento plástico (ALTER, 2010). O comportamento do tendão depende em grande parte de sua capacidade viscoelástica. Tendões exibem comportamento viscoelástico ou taxa-dependência (tempo-dependente). Sob carga as suas propriedades biomecânicas mudam com diferentes taxas de carga. Quando espécimes de tendões são submetidas à taxa de deformação aumentada (taxas de carga), a porção linear de estresse e deformação fica mais íngreme, indicando maior rigidez do tecido em altas taxas de deformação. Com taxas de deformação mais altas, os tendões isoladamente armazenam mais energia, requerem mais força para romper e sustentam maior alongamento e as dimensões do tendão influenciam decisivamente na curva da carga-deformação (Nordin e Frenkel, 2003).

5.5.2. Tendão calcâneo

Segundo O'Brein (2005) o tendão de calcâneo está no compartimento superficial posterior da perna, é formado de continuações tendíneas dos 2 ventres musculares do músculo gastrocnêmio e sóleo, inserindo-se principalmente na parte posterior da porção central do osso calcâneo, bem como o fornecimento de fibras que se estendem em torno do calcanhar para se unir com o fásia plantar e tem a função de transmitir a força criada no músculo gastrocnêmio e sóleo à porção posterior, determinando a flexão plantar do tornozelo (MAFULLI et al., 2007).

O tendão calcâneo é maior e mais forte tendão do corpo humano, é submetido a extensas cargas estáticas e dinâmicas e pode estar sujeito a cargas 2 a 3 vezes o peso do corpo, composto quase que inteiramente de colágeno tipo I, este fato ocorreu devido ao processo evolutivo dos hominídeos que mudaram da posição de quatro apoios para a posição bípede requerendo o uso sistemático mais acentuado dos membros inferiores (THOMPSON e BARAVARIAN, 2011).

A região proximal do tendão calcâneo, mais perto do ventre muscular, possui a estrutura típica do tendão para resistir exclusivamente forças de tração. No entanto, a região distal, mais perto do osso calcâneo, apresenta duas estruturas de fibrocartilagem: a primeira é uma fibrocartilagem que suporta compressão e que progride para calcificação com o passar do tempo e a segunda é a fibrocartilagem entese (COVIZI et al., 2001.; ESQUISATTO et al., 2007), as enteses são locais de concentração de tensão e, conseqüentemente estão sujeitas a utilização excessiva e que posteriormente provocam lesões denominadas entesopatias (BENJAMIN et al., 2006).

5.5.3. Lesões tendinosas

Lesões no tendão por uso excessivo são consideradas lesões por “over use” e são referidas como tendinopatias (KHAN et al., 2002). A tendinopatia é uma disfunção do tendão caracterizada por uma degeneração intratendínea e desorganização das fibras colágeno causadas por fatores intrínsecos ou extrínsecos ou em combinação (RILEY, 2004), e as cargas mecânicas excessivas são consideradas fatores causais importantes.

As tendinopatias limitam a mobilidade e função articular e muitas vezes levam à incapacidade e dor. Danos tendíneos podem ser o resultado de uma lesão aguda (por exemplo,

laceração ou lesão esportiva) ou lesão crônica (por exemplo, lesão de esforço ou degeneração), e a capacidade do tendão para curar varia dependendo da sua magnitude, duração e localização (RILEY, 2004, SMITH et al., 2002, XU e MURREL, 2008). Acredita-se que pequenos estresses repetitivos, que estão abaixo do limiar de falha do tendão, causam microlesões no tendão e subsequentemente inflamação dos tendões (JAMES e WANG, 2005).

Segundo McComis, Nawoczenski e De Haven (1997), a ruptura tendinosa é menos frequente que a ruptura muscular. O coeficiente de elasticidade tendinosa é muito menor que a muscular e a estrutura mais compacta do tendão também forma maior resistência à tração muscular. Estudos angiográficos mostraram que a lesão tendínea ocorre em uma área hipovascular, localizada entre 2 e 6 cm proximais à inserção no calcâneo (HARTGERINK et al., 2001).

As teorias fisiopatológicas mais aceitas para essa injúria são a degenerativa, na qual microtraumas repetitivos em uma área hipovascular provocariam a lesão e a falência do mecanismo inibitório da unidade músculo-tendínea (LEPPILAHTI e ORAVA, 1998). Os principais mecanismos de trauma indireto sugeridos são flexão plantar do tornozelo com joelho estendido, no início da corrida; dorso flexão súbita do tornozelo e dorso flexão violenta após flexão plantar, como uma queda de altura.

O aumento das atividades esportivas frequentemente praticadas por adultos vem contribuindo para o aumento na incidência dessas lesões, o caso de maior incidência ocorre em homens, entre 30 e 50 anos de idade, durante práticas de atividades esportivas, tendo pequena predileção pelo lado esquerdo e notadamente aqueles que exigem salto ou aceleração súbita (HATTRUP e JOHNSON, 1995).

5.6. Técnicas de avaliação

No presente estudo foram usadas algumas técnicas de avaliação que são descritas a seguir

5.6.1. Histologia com coloração de hematoxilina e eosina - H.E

Esta técnica histológica baseia-se na preparação de tecidos biológicos, que visa à conservação o mais próximo possível das características do organismo vivo, cuja morfologia e composição molecular sejam bem próximas ou as mesmas que havia no corpo vivo para que estas estruturas possam ser estudadas e analisadas com o auxílio da microscopia óptica (GARTNER e HIATT 2003).

De acordo com Young e Heath (2003), usa-se a técnica de Hematoxilina e Eosina - H.E com frequência para o estudo da histologia animal e rotina de laboratórios especializados em patologia. A hematoxilina é corante básico das estruturas ácidas em azul tirante ao púrpura, contrastando com isso, eosina é um corante ácido que cora as estruturas básicas em vermelho ou em rosa, portanto no emprego desta técnica o citoplasma assume uma coloração rosa ou vermelho enquanto o núcleo evidencia-se em uma coloração azul.

5.6.2. Histologia com coloração de picro-sirius red

Na microscopia de campo claro por meio da luz polarizada o colágeno apresenta-se de forma vermelha sobre um fundo amarelo pálido, os núcleos são geralmente pretos, mas muitas vezes podem aparecer na coloração cinza ou marrom. O período prolongado de exposição em Picro-Sirius Red provoca no núcleo a intensificação da coloração, este fato não é problemático, pois com a tradicional van Gieson ou com Picro-Anilina Azul, utilizando seus tempos de coloração de 1 minuto também intensificam a coloração.

Mediante aos exames de luz polarizada as fibras colágeno maiores são amarelo brilhante ou laranja, e as mais finas, incluindo as reticulares, são verdes (DAYAN et al., 1989).

De acordo com Junqueira e Carneiro (2008) a birrefringência é altamente específica para o colágeno, entre eles está o tipo I, que em grande parte é devido às moléculas estarem alinhadas em paralelo.

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

5.6.3. Microscopia de força atômica - AFM

5.6.3.1. Princípios básicos de operação do microscópio de força atômica

Segundo Bernardes Filho e Mattoso (2003) é de fundamental importância conhecer e compreender o princípio de funcionamento do Microscópio de Força Atômica - AFM e entender sua gama de aplicações. O microscópio tem seu funcionamento semelhante a uma agulha de toca-discos (vinil), onde, no lugar da agulha (probe), encontra-se o “cantilever”, que consiste de uma haste flexível em cuja parte inferior é crescida uma ponta com dimensão de poucas micras.

Para realizar uma varredura percorrendo o corpo de prova de forma a obter-se uma imagem, um sistema de posicionamento é empregado que utiliza cerâmicas piezoelétricas capazes de realizar movimentos nas três direções (xyz), com precisão de angstroms (Å). Um sistema de alinhamento durante esta varredura é utilizado, onde um feixe de laser incide sobre o “cantilever” e refletindo em um sensor de quatro quadrantes que fornece informação de posição para o sistema de realimentação e controle. Este corrige a posição do “cantilever” de forma a manter o contato com a amostra, durante a varredura e permitir a obtenção da imagem (Figura 4). (BERNARDES FILHO e MATTOSO, 2003).

Figura 4: Esquema do funcionamento de um Microscópio de Força Atômica. Fonte: Bernardes Filho e Mattoso, 2003.

Enquanto acontece o processo de varredura do corpo de prova podem atuar forças de atração ou repulsão, que variam em função da distância entre a amostra e o “cantilever”

(Figura 5). Forças de atração podem ter origem tanto em fatores físicos, como a capilaridade ou químicos como a afinidade entre o “cantilever” e a amostra. A força de repulsão deve-se a interação coulombiana.

Figura 5: Mapa de forças entre amostra e agulha em função da distância, caracterizando os diferentes modos de trabalho do microscópio de força atômica. Fonte: Bernardes Filho e Mattoso, 2003.

A técnica de Microscopia de Força Atômica - AFM pode ser classificada em 2 modos de força distintos: contato, não- contato e contato intermitente.

A) Modo contato: neste tipo de modalidade a imagem é obtida com a agulha tocando suavemente o corpo de prova (amostra), sendo utilizado um “cantilever” com baixa constante de mola, na faixa de 0,02 a 2 N/m. Durante esta varredura o sistema de realimentação/controle monitora o feixe de laser refletido pelo “cantilever” mantendo constante a força exercida pelo “cantilever” sobre a amostra. Nesta forma de aquisição de

imagens a varredura da agulha do “cantilever” não danifica a amostra sendo a mais indicada na obtenção de imagens de amostras rígidas (Figura 6) (BERNARDES FILHO e MATTOSO, 2003).

Figura 6: Esquema geral da montagem e funcionamento da microscopia por força atômica em modo contato. O feixe laser incide sobre a alavanca; sua reflexão é detectada por um fotodetector sensível à posição (PSPD), o que permite medir a deflexão da alavanca devido às forças de interação entre ponta amostra. Fonte: Moreau, 2011.

B) Modo não-contato: de acordo com estudos de Bernardes Filho e Mattoso (2003) neste tipo de modalidade de varredura a constante de mola varia de 10 a 80 N/m, utiliza-se é um “cantilever” bem mais rígido do que o utilizado para modo contato e ele oscila sobre a amostra sem tocá-la. Neste caso não há contaminação da agulha, com material retirado da amostra. Pelas circunstâncias da varredura ocorrer com a agulha mais afastada do corpo de prova (amostra) as imagens capturadas nesta modalidade apresentam menos detalhes que as obtidas em modo contato ou contato intermitente (Figura 7).

Figura 7: Esquema geral da montagem e funcionamento da microscopia por força atômica em modo não contato. Variações na amplitude da oscilação da alavanca permitem que sejam adquiridas imagens topográficas com forças repulsivas da ordem de 0,01 nN (SARID, 1991). Fonte: Moreau, 2011.

C) Contato intermitente: no modo contato intermitente (Tapping Mode TM) durante a varredura da amostra a agulha do “cantilever” vibra em alta frequência, dezenas a centenas de kilohertz, sobre a amostra tocando-a suavemente, pode ocorrer contaminação do cantilever com material retirado da amostra, durante o contato. Quanto maior a constante da mola, mais rígido o “cantilever” e conseqüentemente maior será frequência de oscilação deste durante a varredura (BERNARDES FILHO e MATTOSO, 2003).

5.6.4. Microscopia de luz polarizada

Mediante a microscopia de luz polarizada é possível analisar as fibras de colágeno com relação a sua quantificação, o estabelecimento exato da estatística de ordem molecular, variação de agregação molecular e o estado de orientação das fibras, visto que na natureza

desse tecido há uma propriedade existente chamada birrefringência de forma textural (VIDAL, 1987a, b).

5.6.4.1. Características do microscópio de luz polarizada

O microscópio de luz polarizada possui em sua concepção básica dois filtros polarizadores: o Polarizador (Pol) e o Analisador (An). Abaixo do condensador do microscópio óptico está o filtro Pol, que tem uma rotação de 360° , e pode mover-se ou ser colocado no trajeto da luz. Acima das objetivas e abaixo das oculares encontra-se o filtro polarizador An, desta forma a luz polarizada com o vetor elétrico vibrante e um só plano emitido, encontrará o plano de polarização do analisador perpendicular à sua direção de vibração, absorvendo-a, sendo que, esse processo ocorre pela própria natureza dos polarizadores (VIDAL 1987b).

Estas características particularidades da concepção do microscópio permitirão passar apenas energia de radiação em uma só direção, a que corresponde ao seu plano de polarização, isto permite que a placa polarizada obtenha absorção de todos os vetores elétricos da radiação visível de forma seletiva.

De acordo com Vidal (1987b) quando os filtros Pol e An estiverem paralelos entre si a intensidade de passagem de luz torna-se máxima, pois toda radiação polarizada perpendicularmente ao plano de polarização do analisador será absorvida (Figura 8).

Figure 8. Representação esquemática da configuração do microscópio de luz polarizada (adaptado). Fonte: Davidson e Abramowitz, 2005.

5.6.4.2. Propriedades anisotrópicas ópticas

A absorção e assimilação seletiva da luz polarizada transmitida pelo microscópio óptico são captadas pelas propriedades anisotrópicas ópticas. A birrefringência e o dicroísmo linear são propriedades anisotrópicas ópticas, e dois aspectos de uma mesma propriedade possuem a mesma informação.

O dicroísmo linear possui característica de apresentar duas cores, uma tem origem na luz refletida e a outra na luz transmitida, mas o dicroísmo linear não é detectado em

sistemas de pouca orientação e organização, estas características não são aplicadas para birrefringência (VIDAL, 1987b).

De acordo com os estudos de Hetch (1991), em um mesmo material a anisotropia óptica não apresenta as mesmas propriedades ópticas em todas as direções, mas as mesmas propriedades citadas surgem em vários materiais que contêm substâncias cristalinas sólidas e os átomos aparecem dispostos de forma regular.

Ao atravessar um material isotrópico óptico a luz se propaga em qualquer direção deste corpo obtendo velocidade de propagação constante em relação ao seu índice de refração. Entretanto, em materiais anisotrópicos ópticos a luz birrefringente ao atravessar este material propaga-se em duas direções diferentes, pois materiais birrefringentes possuem dois índices de refração diferentes (VIDAL, 1987b).

5.6.4.3. Birrefringência de materiais

A birrefringência é um termo definido como anisotropia óptica, mediante esta propriedade, as ordenações macromoleculares bem como a quantificações de estruturas biológicas são determinadas, tais informações determinam a disposição das fibras colágenas a sua morfoestrutura bem como a sua distribuição no tecido, só há possibilidade de obterem-se estes dados devido à propagação desigual da luz, que ocorre em um material biológico (VIDAL 1987a, b).

Birrefringência é a diferença numérica entre dois índices de refração, pois um raio de luz polarizado ao atravessar um material anisotrópico óptico orientado, sofre o fenômeno de dupla refração um de origem lenta e outro de origem rápida, cujas velocidades são inversamente proporcionais aos índices de refração (Figura 9).

Figura 9: Representação esquemática de birrefringência. Fonte: <http://www.dfn.if.usp.br/~suaide/>.

Segundo Vidal (1987a, b) em um corpo birrefringente o material apresenta dois índices de refração em determinadas direções, as quais são perpendiculares umas as outras. Quando analisado por microscopia de polarização o material birrefringente apresenta um alto brilho característico expressado pelas fibras e fibrilas, brilho este correspondente aos índices de refração, portanto esta alta intensidade de brilho característico condiz com a espessura do material em análise e as diferenças de fase entre as frentes de luz emergentes ao material em análise ficam mais evidentes quando as amostras são posicionadas à 45° (tanto a direita quanto a esquerda) do plano de polarização de luz (Figura 10).

Figura 10. Orientação em ângulo de 45° (direita/esquerda) do plano de polarização do corpo de prova. Fonte: NARDY, 2006.

Quando os eixos de propagação do material estiverem paralelos ao analisador e ao polarizador, a imagem do corpo de prova desaparecerá tornando o campo de visão do microscópio escuro, pois este fenômeno é chamado de ângulo de extinção (Figura 11).

Figura 11. Orientação em ângulo de 0° entre o polarizador e o analisador, ângulo que proporciona o desaparecimento das imagens birrefringentes e um escurecimento da imagem. Fonte: NARDY, 2006.

Ao refletir em um material birrefringente a luz polarizada por intermédio da microscopia de polarização se propagará de duas maneiras distintas de trajetos ópticos, um feixe de luz irá ao encontro do raio ordinário (n_0) e o outro irá ao encontro do raio extraordinário (n_e). A consequência dessa diferença de trajeto óptico ou retardo óptico (RO) é a aparência de um material com brilho altamente característico. (VIDAL 1987a, b).

Usam-se nanômetros como unidades para expressar quantitativamente birrefringência em termos de retardos ópticos.

A birrefringência e o retardo óptico podem ser expressos pelas equações:

$$\mathbf{B} = (n_0 - n_e) \quad (\text{Equação 1})$$

$$\mathbf{RO} = (n_0 - n_e) \times t, \quad (\text{Equação 2})$$

$$\mathbf{RO} = \mathbf{B} \times t \quad (\text{Equação 3})$$

Sendo: t = espessura do corpo;

$\mathbf{B}$ = Birrefringência;

$\mathbf{RO}$ = Retardo Óptico

n_0 : índice de refração do meio na direção onde propaga-se o raio ordinário

n_e : índice de refração do meio na direção onde propaga-se o raio extraordinário

Considera-se birrefringência textural ou de forma (BF) a birrefringência do colágeno, esta característica aparece com a presença de microcorpos com morfologia assimétrica disposta de maneira ordenada, cujas suas distâncias e diâmetros sejam menores que o comprimento de onda (λ), sendo dependentes dos índices de refração, da contribuição dos volumes parciais das partículas e do meio homogêneo dispersante.

Entretanto Vidal (1987b) relata que a característica das fibras colágenas é a presença da birrefringência de forma (B.F) e birrefringência intrínseca positiva, sendo que a

concentração parcial, o estado de orientação e agregação das fibras colágenas são fatores determinantes e o que caracteriza a tal birrefringência de forma.

De acordo com Vilarta e Vidal (1989) a força orientacional de todas as transições eletrônicas na molécula é que determina a birrefringência intrínseca. Mudanças dos meios de imersão dos feixes colágeno, em diferentes índices de refração (n), permite analisar suas propriedades ópticas como a birrefringência. A variação do brilho do colágeno é adquirida quando o colágeno é imerso nestes meios, isto deve-se ao fato de que o valor da birrefringência de forma (B.F) varia de acordo com o meio de imersão (VIDAL 1987b).

Segundo Vidal (1987b) a determinação das curvas de birrefringência são obtidas pela plotagem dos valores de retardos ópticos (R.O) das fibras de colágeno em função do índice de refração médio dos fluidos de imersão, com a água destilada ($n= 1,333$); 20%, 30%, 40%, 60%, 80%, 100% de soluções de glicerina, cujos $n= 1,3600$; $1,3724$; $1,3864$; $1,4131$; $1,4353$; e $1,4610$, respectivamente; e finalmente o Nujol ($n= 1,4786$).

Para não alterar as respostas birrefringentes do material a ser analisado é recomendado o uso de substâncias fluídicas que não penetrem ou que provoquem reação no corpo de prova, a obtenção da curva birrefringência de forma (B.F) é observada quando se respeita este procedimento.

Para que os feixes de fibras colágeno apresentem maiores valores de birrefringência que correspondem aos valores de birrefringência total, isto é, representam os valores da (B.F) somada a birrefringência intrínseca, e podem representar com objetividade a morfologia das moléculas de colágeno, o diâmetro e grau de empacotamento das fibras é aconselhável utilizar água destilada (VIDAL, 1987b)

O aumento das ligações cruzadas entre as fibras de colágeno está ligado ao alto valor da birrefringência total, gerando um padrão mais cristalino e intenso na agregação ordenada do colágeno tipo I.

Mudanças apresentadas nas curvas de birrefringência, que estão relacionadas ao grau de agregação ordenada lateralmente das fibras e diferença nos estados organizacionais de um mesmo tipo de colágeno podem ser encontradas em função da idade e localização topográfica.

5.7. Estudo biomecânico

A Engenharia utiliza algumas técnicas de análise que podem ser adaptadas aos estudos dos biomateriais, pois os materiais biológicos e os usados na Engenharia são diferentes (FRATESCHI, 2002).

A Bioengenharia atua como elo fundamental entre as ciências exatas e biológicas, possibilitando uma oportunidade para estudos multidisciplinares e interação entre profissionais de diferentes formações, por ser um valioso instrumento de medida no estudo e compreensão do complexo de forças atuantes no sistema musculoesquelético e suas consequências (PESSAN, 1996).

Biomecânica pode ser definida como estudo da estrutura e função dos sistemas biológicos, por meio da utilização dos métodos da mecânica. Notando-se que para haver desenvolvimento de um estudo biomecânico, necessita-se de contribuição de áreas distintas, como anatomia, fisiologia e mecânica (HALL, 2000).

Há dois campos de estudo na Biomecânica: forças internas e forças externas.

- **Forças internas:** é chamado de biomecânica interna, que encarrega-se da determinação das forças internas e seus resultados.

- **Forças externas:** também chamadas de biomecânica externa que refere-se às características observáveis exteriormente na estrutura do movimento, representando parâmetros de determinação quantitativa ou qualitativa referentes às mudanças de lugar e posição do corpo (BARBOSA, 2004).

O conhecimento das características de resistência de alguns materiais biológicos é necessário para se evitarem rupturas nas estruturas afins como: osso, tendão, cartilagem e músculo (GOULD III, 1993).

5.7.1. Ensaios mecânicos

No princípio dos estudos de ensaios mecânicos encontravam-se testes quase que exclusivamente no campo da Engenharia, hoje, porém a Bioengenharia ou Engenharia Biomédica abrange vasto campo científico e multidisciplinar dando suporte a medicina e a reabilitação em suas várias áreas (CARVALHO, 2001).

Portanto a ciência considera a Bioengenharia como uma peça de fundamental importância na análise das propriedades mecânicas dos tecidos biológicos e componentes do corpo humano ou de materiais que são utilizados para substituir ou reparar alguma parte dele. Para tal, são utilizados ensaios mecânicos para verificar, estudar e auxiliar a compreensão do comportamento dos tecidos ou de materiais quando submetidos a esforços e a estímulos externos.

Os tipos de ensaios mecânicos é que vão determinar as propriedades mecânicas de um material, e são classificados em destrutivos e não destrutivos.

- **Destrutivos:** inclui a técnica de tração, impacto, dobramento, flexão, torção, fadiga, compressão entre outros e provocam inutilização do material ou sua própria ruptura.

-**Não destrutivos:** preservam a estrutura do material utilizado. Há também outros tipos de ensaios que são classificados de acordo com a velocidade de aplicação da carga, em

estáticos, com baixa velocidade de aplicação da carga, e dinâmicos, quando as cargas são aplicadas com altas velocidades, considerando que os ensaios estáticos são os de tração, compressão, torção, cisalhamento e flexão, e os ensaios dinâmicos são os de fadiga e impacto (SOUZA, 1977).

5.7.1.1. Ensaio mecânico de tração

Segundo Souza (1977) e Ramos (1979), dentre os ensaios o ensaio mecânico de tração apresenta considerável importância, principalmente pela facilidade em sua execução e boa reprodutibilidade nos resultados, conseguindo medir a resistência do material analisado, por ter a capacidade de fazer com que as cargas aplicadas cresçam lentamente durante o teste.

Rocha (1998) reporta o ensaio longitudinal de tração como sendo uma boa capacidade de determinar um bom número de propriedades mecânicas, sendo simples e de fácil introdução de conceitos de validação coerente. O ensaio empregado utiliza cargas impostas à estrutura tendínea, que é acometida por constante atuação de forças.

Em um estudo, Rossi et al., (1990) avaliaram por meio de ensaio mecânico de tração a resistência de tendões flexores profundos dos dedos de coelhos, seccionados, suturados e submetidos à estimulação ultra-sônica, demonstrando que o ultra-som terapêutico impede a cicatrização tendinosa.

Culaw et al., (1999) reportaram que não houve diferença significativa entre grupos quanto à resistência mecânica do ligamento cruzado anterior de ratos submetidos à imobilização de joelho, quando estes mesmos foram submetidos ao de ensaio de tração.

Os ligamentos coracoacromiais são menos resistentes no quesito referente à carga máxima, mas registraram valores mais elevados para os quesitos limite de proporcionalidade e a resiliência, estes achados só foram possíveis graças às propriedades mecânicas dos

ligamentos coracoclaviculares e coracoacromiais, por meio de ensaio de resistência a tração (PLAPER, 2001).

Rossi et al., (1990) estudaram propriedades mecânicas do ligamento cruzado anterior (LCA) e do terço central do tendão patelar, através do ensaio mecânico de tração, concluindo que as características mecânicas desses dois tecidos são diferentes e não proporcionais.

Järvinen et al.,(2002), em seus estudos de ensaio mecânico de tração em músculos gastrocnêmio, afirmam que os pontos de ruptura variam muito pouco, sendo que em seu trabalho 94% dos músculos a ruptura ocorreu no ventre muscular. Os resultados encontrados por Lima, Caierão e Durigan (2007), e por Sene, Shimano e Picado (2008), corroboram estes achados, uma vez que apresentaram a mesma característica quanto ao local de ruptura muscular, por se tratar de uma região onde há uma maior concentração de tecido muscular do que tecido conjuntivo (LIMA, CAIERÃO e DURIGAN, 2007).

A estrutura anatômica do material a ser ensaiado é fixada à máquina preservando suas características fisiológicas referentes à origem e inserção muscular, isto é de grande importância (FRATESCH, 2002), pois a análise do tecido como estrutura inteira proporciona um resultado o mais próximo da solicitação fisiológica (MATHEUS et al., 2008a).

Há estudos como o de Kodama (2011) e Rocha (2006) que são direcionadas para registros das análises mecânicas musculares, testando o complexo (da origem muscular até a inserção do tendão calcâneo) como um todo.

Este estudo foi direcionado para análises mecânicas do complexo tendíneo de ratos, mais especificamente o tendão calcâneo, por este ser um animal andador e não saltador como o coelho, o que proporciona uma maior semelhança no que diz respeito à locomoção biomecânica de humanos e também o tendão calcâneo ser uma estrutura situada no membro pélvico do animal, o que proporciona uma maior carga de estresse linear, gerando maiores

índices de lesões, uma vez que o músculo gastrocnêmio trabalha sob condições extremas de atividade física e possui um risco aumentado para rupturas (SENE, SHIMANO e PICADO, 2008).

De acordo com WOO et al., (1994), fatores como temperatura do corpo de prova, temperatura ambiente, hidratação e principalmente orientação tecidual, podem alterar o comportamento mecânico do tendão.

Tecidos biológicos com dimensões pequenas são de difícil fixação à Máquina Universal de Ensaio de Tração devido ao escorregamento na região da garra e quando a fixação se torna possível, pode ocorrer concentração de estresse nos pontos de fixação (WOO et al., 1994).

Para a determinação das propriedades dos materiais biológicos, o ensaio mecânico de tração é um teste bastante utilizado (SHIMANO e SHIMANO, 2000), em um ensaio mecânico de tração há necessidade de submeter-se o material a aplicação de uma força paralela ao eixo da amostra, que tende a alongá-la ou a esticá-la (CALLISTER, 2002), sendo que este material deve ter formas e dimensões padronizadas realizado em um corpo de prova, para que os resultados possam ser comparados ou reproduzidos. Os testes impostos ao corpo de prova são registrados na própria máquina de ensaio através de um software que permite interface direta entre a máquina de ensaio e um computador acoplado ao sistema, o material pode ser levado até a ruptura, sendo que as deformações observadas neste corpo de provas são distribuídas uniformemente até ser alcançada a carga máxima, a carga aplicada nesse material cresce de forma lenta e gradual durante todo o teste, podendo assim medir a resistência do material (Figura 12).

Figura 12. Ilustração de um ensaio em tendão calcâneo bovino na Máquina Universal de Ensaio de Tração.

O resultado da aplicação do ensaio de tração é registrado como uma relação carga/deformação ou tensão/deformação.

Define-se tensão como sendo a resistência de um corpo a uma força externa aplicada em função da sua área, sendo expressada por:

$$\sigma = \frac{F}{A} \quad (\text{Equação 4})$$

Sendo: σ = tensão; F = força aplicada; A = área de secção transversa.

A) Deformação

Entende-se por formação como o resultado da aplicação da tensão sobre o corpo expressada por:

$$\varepsilon = \frac{\Delta L}{L_0} \quad (\text{Equação 5})$$

Sendo: ε = deformação; ΔL = deformação sofrida; L_0 = comprimento inicial.

B) Deformação elástica e deformação plástica

A parte inicial do gráfico tensão/deformação é uma reta definida pela equação:

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon} \quad (\text{Equação 6})$$

A equação mencionada acima fornece o módulo da elasticidade, cuja constante de proporcionalidade (E) é a expressão da lei de Hooke, ou módulo de Young.

A uniformidade de deformação propicia medições precisas da sua variação em função da carga aplicada, o que permite a elaboração do gráfico da curva da carga *versus* deformação (SOUZA, 1977).

Região elástica é a porção linear da carga *versus* deformação, em que há uma relação linear entre a carga aplicada e a deformação produzida. Nesta região o material se deformará somente enquanto estiver sendo aplicada carga, quando a carga for removida o material retorna às suas dimensões originais. Se a carga ultrapassar o limite elástico do material, mesmo após sua remoção, o material terá sofrido deformação permanente, com perda de suas dimensões iniciais. A região plástica ocorre a partir do ponto onde a curva deixa de ser linear, em que a deformação produzida não é mais linearmente proporcional à carga aplicada e a tensão suportada pelo material nesse ponto é conhecida como limite elástico. O ponto na curva onde isto acontece é conhecido como ponto de escoamento e a aplicação da carga além desse ponto resultará em uma deformação permanente do material (ENGLES, 2001).

A partir da curva do gráfico da carga *versus* deformação obtêm-se as seguintes informações das propriedades mecânicas: rigidez, limite de proporcionalidade, limite máximo, resiliência e tenacidade (Figura 13), sendo que esta curva apresenta três regiões distintas.

Figura13: Curva representativa da carga *versus* deformação. Fonte: Romano, 2001.

Rigidez: esta propriedade biomecânica é registrada durante a fase elástica do material quando está sendo testada é obtida pelo cálculo da tangente do ângulo (θ) na região elástica do gráfico carga *versus* deformação (Figura 13).

Limite de proporcionalidade: consiste no ponto final dentro de uma fase elástica é o ponto de término da relação linear entre a carga e deformação (A), no gráfico carga *versus* deformação (Figura 13).

Limite máximo: consiste nos maiores valores de carga e alongamentos observados em cada ensaio executado até o rompimento, é o ponto onde a carga é máxima com deformação correspondente, medida em cada ensaio (B), e pode ser utilizado como critério de avaliação da resistência (Figura 13).

Resiliência: é capacidade que todo material possui em absorver energia na fase elástica do material e é calculada pela área do triângulo (OAD) (Figura 13).

Tenacidade: é a energia absorvida pelo material até sua ruptura (C), é calculada pela área total do espaço delimitado abaixo da carga *versus* deformação (Figura 13).

5.7.1.2. Propriedades mecânicas do tendão

As propriedades biomecânicas do tendão devem-se ao arranjo e organização das moléculas de colágeno (PIEZ e REDDI, 1984). Um meio de analisar as propriedades biomecânicas de tendões é sujeitar espécimes a deformações de tensão usando uma taxa constante de alongamento. Como ocorre em todos os tecidos biológicos, a estrutura hierárquica dos tendões define seu comportamento mecânico. Os tendões têm propriedades biomecânicas fundamentais como força e deformação, a força depende da espessura do tendão bem como seu conteúdo de colágeno, independente da tensão máxima que pode exercer o músculo. Por outro lado, as forças externas aplicadas ao tendão são resistidas internamente por meio de suas ligações moleculares. As forças de estiramento que seguem o eixo longitudinal do tendão e o alongam é a força tênsil. As forças aplicadas no eixo longitudinal no sentido de encurtamento do tendão são as forças compressivas, e por último, as forças perpendiculares aplicadas no eixo longitudinal do tendão são as forças de torção ou cisalhamento. *In vivo*, o tendão nunca é submetido a uma força de tensão superior a 25% de sua força máxima.

A organização molecular do tendão determina suas propriedades mecânicas. A substância fundamental amorfa é responsável pela contração do tendão em repouso, porque sua aparência é ondulada (CURWIN, 1994b).

De acordo com Junqueira e Carneiro (2008), o tecido elástico não é muito frequente no organismo humano e é composto por feixes espessos e paralelos de fibras elásticas. O espaço entre as fibras é ocupado por fibras delgadas de colágeno e fibroblastos achatados. A abundância de fibras elásticas neste tecido lhe confere uma cor amarela típica e grande elasticidade. O sistema elástico constitui uma família de fibras com características funcionais variáveis capazes de adaptar-se às necessidades locais dos tecidos.

As principais células produtoras de elastina são os fibroblastos e como a proteína colágeno, a elastina é rica em glicina e em prolina. Além destes, a elastina contém dois aminoácidos incomuns, a desmosina e isodesmosina, formados por ligações covalentes entre quatro resíduos de lisina. Essas ligações cruzadas parecem ser responsáveis pela consistência elástica da elastina, que é cinco vezes mais extensa do que a borracha (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008).

A elastina ou fibras elásticas é uma estrutura complexa, com propriedades de elasticidade mecânica, assim como o colágeno ela é composta de aminoácidos e quase sempre são encontradas próximas e associadas com os tecidos colagenosos, o que contribui para dar elasticidade ao tendão, por isso que cedem facilmente ao alongamento, mas, quando liberadas, retornam quase ao mesmo tamanho original, sendo responsáveis por desenvolver ao tendão sua configuração original ondulada depois de ter sido estirado alcançam o ponto de ruptura somente quando alongadas em grau superior a 150% de seu comprimento original (ALTER, 2010).

Portanto Nordin e Frenkel, (2003) relatam que a proteína elastina é escassamente presente em tendões e ligamentos de extremidade e as propriedades mecânicas do tendão não só são dependentes na arquitetura e propriedades das fibras de colágeno, mas também na proporção de elastina que essas estruturas contêm.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1. Animais

O presente estudo utilizou *Ratos Novergicus Albinus* da linhagem *Wistar* por ser este animal de fácil disponibilidade, manutenção em um pequeno espaço físico, baixos custos e pela semelhança da articulação do calcâneo com a articulação em humanos.

O trabalho contou com 35 ratos machos, saudáveis, adultos, com peso corporal entre 450 g e 480 g e cerca de 100 dias de vida, obtidos no biotério central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA da Universidade Estadual Paulista – UNESP. Os animais foram distribuídos de maneira aleatória em 7 grupos com 5 animais cada grupo e os mesmos estiveram mantidos por pelo menos 72 horas no novo ambiente para aclimação, e permaneceram durante todo o decorrer da fase pré-experimental no Biotério do Laboratório de Biofísica e Biomecânica, na Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba – FMVA da Universidade Estadual Paulista – UNESP, em gaiolas apropriadas de polietileno padrão. Os animais tinham em suas gaiolas livre mobilidade, a água e alimentação foram administradas à vontade objetivando o consumo mais homogêneo da ração, as condições ambientais também foram controladas, a iluminação com ciclos de 12 horas (claro/escuro) e ambiente higienizado.

De acordo com protocolo nº 02314-2011, o presente estudo está coerente com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) sendo aprovado pela Comissão de Ética de Uso Animal (CEUA) da Universidade Estadual Paulista – UNESP de Araçatuba, presidida pelo Prof. Dr. Edilson Ervolino (Anexo A).

Os grupos foram denominados desta forma:

Grupo Controle – o corpo de prova dos animais deste grupo não foram submetidos ao banho hidrotermal, aos exercícios físicos (saltos verticais) e ensaio de tração. Os tendões calcâneos destes animais foram exclusivamente usados para análises histológicas coradas por Hematoxilina e Eosina - H.E, histologia por coloração com Picro-Sirus Red, Microscopia de Força Atômica - AFM e microscopia de polarização com medidas de análises de Birrefringência.

Grupo I: ST°/E-/EM+

Grupo II: ST°/E+/EM+

Grupo III: 42°C/E-/EM+

Grupo IV: 42°C/E+/EM+

Grupo V: 45°C/E-/EM+

Grupo VI: 45°C/E+/EM+

Sendo:

ST°: animais que não foram submetidos a temperaturas

E-: animais que não passaram exercícios físicos (saltos verticais)

E+: animais que passaram exercícios físicos (saltos verticais)

EM +: animais que passaram ensaio mecânico de tração

6.2. Banhos hidrotérmico

Anteriormente ao experimento e/ou tratamento todos os animais foram pesados, e em seguida anestesiados por injeção intraperitoneal de anestésico Ketamina (Francotar®- 10 mL – uso veterinário, Virbac do Brasil Ind. Com Ltda.), na dosagem de 0,08 mL para cada 100 g de peso corporal, associado ao relaxante muscular e analgésico Cloridrato de Xylazina (Virbaxyl® 2%- 10 mL - uso veterinário, Virbac do Brasil Ind. Com Ltda.) na dosagem de

0,04 mL para cada 100 g de peso corporal. Todo este procedimento foi realizado utilizando uma seringa de insulina (1 mL).

Nos grupos tratados com banhos hidrotermais (grupos III, IV, V e VI) os mesmos foram imobilizados em um contensor (Figura 14) e submetidos ao experimento, submergindo os membros inferiores (direito/esquerdo) em água aquecida em temperatura constante por 10 minutos, durante dois dias alternados (primeiro e terceiro dia) com intervalo de 48 horas.

Figura 14. Contensor para imobilização específica do rato.

Para tal realização utilizou-se um recipiente com água aquecida com um termostato embutido da empresa Fanem Ltda modelo® 102 R (Figura 15), um termômetro digital da marca J Prolab modelo® SH 102 (Figura 16) e um termômetro convencional com a finalidade de medição constante da temperatura da água aquecida e manutenção da temperatura desejada durante o experimento.

Figura 15. Banho hidrotérmico.

Figura 16. Termômetro digital.

Antes do início e após o experimento a temperatura cutânea tendínea foi mensurada por intermédio de um termômetro digital a laser infravermelho da marca Fluke modelo nº62 (Figura 17), com a finalidade de mensuração da temperatura tendínea.

Figura 17. Termômetro infravermelho.

6.3. Exercícios de saltos verticais

Posteriormente ao procedimento citado anteriormente os animais dos grupos II, IV e VI foram submetidos a 4 séries de 10 saltos, durante dois dias com intervalo de 48 horas (segundo e quarto dia). Os animais foram colocados em um tubo de PVC de formato cilíndrico, especialmente adaptado para saltos na água e a profundidade do tubo de PVC foi determinada em referência comprimento dos animais. Por intermédio dos estudos Malheiro et al., (2009) o recipiente foi confeccionado com 50 cm de altura e 25 cm de diâmetro e seu espaço interno dispunha de água até a altura de 38 cm e a temperatura da água foi mantida em $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (figura 18).

Figura 18. Esquema ilustrando o treinamento de saltos verticais. Fonte: Malheiro et al.,2009.

Entre cada uma das séries de saltos respeitou-se um intervalo de 1 minuto, verificado por cronômetro digital.

De acordo com os estudos de Malheiro et al., (2009) a sobrecarga utilizada correspondeu a 50% do peso corpóreo de cada animal, usado com a finalidade de provocar a submersão total do animal, causando uma reação instintiva de saltos verticais em direção à superfície da água, já que o animal não obedece ao comando verbal de saltos verticais.

O peso adicional foi acomodado na região anterior do tórax por meio de um colete, confeccionado em borracha em forma de cinta para não reter água e a fixação no corpo do animal faz-se por intermédio do ajustamento perimétrico abdominal com fitas de velcro existente em suas extremidades. No centro da cinta de borracha na região anterior torácica tal colete contém um pino de metal com ranhuras em forma de rosca que serve para adicionar ou retirar cargas (arruelas), posteriormente estas cargas são fixadas com uma porca (Figura 19).

Figura 19. Colete torácico para ratos.

6.4. Retirada do material

Após o procedimento experimental cada animal foi morto no quinto dia com doses excessivas do anestésico Thiopental, seguindo os princípios éticos de pesquisa animal (CARVALHO et al., 2009; POLIZELLO et al., 2009).

Foi feita uma incisão central com rebatimento e excisão do músculo gastrocnêmio direito e esquerdo mantendo o tendão e o pé do rato, sendo tomada a precaução de preservar a integridade do conjunto. A intenção de preservar o músculo gastrocnêmio e a inserção no calcâneo foi mantida para facilitar à fixação da peça à Máquina Universal de Ensaio de Tração.

Após a dissecação, o músculo gastrocnêmio, o tendão calcâneo e o pé do rato foram colocados em solução de lactato de Ringer, em temperatura ambiente, até o momento da realização do ensaio de tração, período este de 24 horas, após a morte dos animais (Figura 20). (MATHEUS et al., 2007).

Figura 20. Músculo gastrocnêmio (a), tendão calcâneo (b) e pé do rato (c).

6.5. Ensaio de tração

Após o procedimento de retirada do material todos os animais dos grupos I - VI, foram levados ao ensaio mecânico de tração, utilizando uma Máquina Universal de Ensaio modelo® DL 3000, eletromecânica, microprocessada (EMIC – Equipamentos e Sistemas de Ensaio Ltda.) do Departamento de Prótese da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA – “Júlio de Mesquita Filho” da Universidade Estadual Paulista - UNESP, equipada com célula de carga de 500 N.

A máquina utilizada possui interface direta a um microcomputador, com o software Tesc®, capaz de gerar um gráfico, carga *versus* alongamento, para cada ensaio.

Dois conjuntos acessórios de garras e mordentes foram acoplados à Máquina Universal de Ensaio – EMIC, um conjunto foi acoplado à célula estática da máquina sendo um par de garras auto-travante por efeito de alavanca de simples estágio, para ensaios de tração com capacidade máxima 500 N, o jogo de garras e mordentes possui na sua área de contato com o corpo de prova uma textura recartilhada para melhor fixação da amostra (Figura 21), material este adquirido da própria fabricante da Máquina Universal de Ensaio – EMIC.

Figura 21. Garra auto-travante.

O acessório da célula móvel foi confeccionado baseado nas garras e mordentes dos estudos de Yuan et al., (2003), na qual o músculo e as fibras intramusculares tendinosas foram compactadas entre duas garras e mordentes de metal e parafusadas ao sistema para melhor força de compressão e com intenção de o corpo de prova não escorregar durante o ensaio de tração (Figura 22).

Figura 22. Garras e mordentes de metal.

Estes acessórios foram confeccionados para fixação do calcâneo em sua região tendínea e muscular, mantendo o tendão e o músculo alinhados de maneira vertical sem qualquer tipo de angulação, para melhor tracionamento do corpo de prova.

Antes de iniciar o ensaio, o complexo (músculo-tendão) foi acoplado à máquina e no momento do ensaio, o complexo foi submetido a uma pré-carga de 300 g (CARVALHO et al., 2009) durante o tempo de 30 segundos, com intuito de promover a acomodação do sistema.

Após a pré-carga, o ensaio prosseguiu com velocidade pré-estabelecida de 2 mm/minuto, a carga aplicada foi registrada pelo software em intervalos de alongamento até o momento da ruptura do tendão (Figura 23).

Figura 23. Conjunto (músculo gastrocnêmio, tendão calcâneo e pé do rato) acoplado à máquina durante o ensaio de tração.

A partir dos gráficos, carga *versus* alongamento de cada ensaio foi obtida e analisada as seguintes propriedades mecânicas:

Força máxima: correspondente ao ponto gráfico de maior valor de força em Newton (N) obtido pelo músculo no ensaio de tração.

Rigidez: representada pelo valor de deformação em milímetros ($\times 10^{-3}\text{m}$) atingido no Limite Máximo.

Energia absorvida pelo corpo até o seu ponto de ruptura: energia absorvida pelo material até sua ruptura, e calculada pela área total do espaço delimitado abaixo da carga *versus* deformação e expressada em milijoule (mJ).

No presente estudo durante a execução dos testes de ensaio de tração e baseado em análises visuais, constatou-se que o local de ruptura dos corpos de provas foi no terço médio do tendão calcâneo. Young e Heath (2001) relataram que o tendão calcâneo é um tecido inextensível, porém flexível, sendo a forma mais densa de tecido colágeno, constituídos por feixes de espessas fibras de colágeno, orientadas no eixo longitudinal do tendão com poucos fibroblastos intercalados entre feixes, onde algumas fibras de elastina também podem ser vistas entre os feixes de fibras de colágeno, entre as quais estão espalhadas fileiras de fibroblastos com núcleos alongados, grande densidade numérica, organização, disposição e arranjo das fibrilas do tendão, o que lhe permite uma resistência aos estiramentos e tração (ENWEMEKA et al., 1988).

Após o final das análises do ensaio de tração, mediante uma pequena incisão os tendões dos membros direito e esquerdo foram dissecados, tenotomizados e retirados como um todo, desde a origem miotendínea (junção miotendínea) até a inserção calcânea (Figura 24). A área de estudo analisada nas técnicas histológicas foi a região central como mostra a figura 24 (setas amarelas), sendo que as demais áreas foram desprezadas. Para análises histológicas coradas por Hematoxilina e Eosina - H.E, Microscopia de luz polarizada com Picro-Sirius Red, Microscopia de Birrefringência e Microscopia de Força Atômica – AFM, logo após a tenotomia os tendões foram submersos e fixados em formol a 10% por um período de tempo de 48 horas. Posteriormente a esta técnica os mesmos foram inseridos em recipientes específicos e lavados em água corrente por 24 horas.

Figura 24. Tendões dissecados e tenotomizados

6.6. Preparação dos tecidos (tendões), para análises microscópicas

Segundo Gartner e Hiatt (2003) várias técnicas foram desenvolvidas e elaboradas ao longo do tempo para preparar os tecidos biológicos, o objetivo é a manutenção de um aspecto muito próximo do seu estado natural vivo.

As etapas envolvidas neste estudo foram:

Fixação: é o processo de tratamento dos tecidos por meio de agentes químicos que tem a finalidade de retardar e paralisar as alterações dos tecidos subsequentes à morte (após sua remoção do corpo), mantém a arquitetura normal, os agentes fixadores mais comuns são formol e o líquido de Bouin.

Desidratação: grande parte dos tecidos tem em sua composição a água, nesta etapa de preparação é usada uma série de banhos de solução alcoólica em concentrações crescentes, iniciando com álcool 70% e subindo gradualmente até chegar a 100%, a fim de remover a água (desidratação), uma vez que a água presente nos tecidos não é miscível em substâncias como a parafina e resinas de inclusão.

Diafanização: procedimento no qual os tecidos são tratados com xilol, os tecidos biológicos tornam-se transparentes no xilol um produto químico miscível com parafina fundida.

Inclusão: para os estudos de microscopia óptica, o meio de inclusão mais usado é a parafina, o tecido é colocado em um recipiente adequado contendo parafina fundida até tornar-se totalmente infiltrado. Uma vez impregnado e embebido com parafina, ele é colocado em um pequeno recipiente, coberto com parafina fundida e deixado até endurecer, formando um bloco de parafina contendo o tecido para posteriormente cortá-los em cortes finos, este procedimento é feito com a finalidade de distinguir as células de um tecido da matriz extracelular.

Microtomia: esta tarefa é efetuada usando um micrótomo, uma máquina equipada com uma lâmina de aço inoxidável que realiza cortes específicos para microscopia óptica com espessuras de cerca de 5 a 10 μm .

Montagem das lâminas histológicas: posteriormente aos cortes histológicos específicos realizados no micrótomo os tecidos são aderidos e montados em lâminas histológicas de vidro revestido com adesivo, finalizada esta etapa a parafina é removida da lâmina e em seguida o tecido é reidratado e corado.

Coloração: os tecidos apresentam-se incolores após a realização dos cortes histológicos, a coloração tem o objetivo de contrastar as estruturas teciduais a serem estudadas, pois como muitos constituintes dos tecidos têm densidades ópticas muito próximas, eles precisam ser corados para a microscopia óptica, usando principalmente corantes solúveis em água, após a coloração o corte é novamente desidratado para possibilitar que uma lamínula seja afixada de modo permanente, pra proteger de danos como é necessário para observação do corte ao microscópio.

6.6.1. Preparação das lâminas para análises histológicas por coloração com hematoxilina e eosina - H.E, picro-sirius red

Todas as lâminas do presente trabalho foram montadas com o auxílio do Prof. Dr. José Carlos Silva Camargo Filho do Departamento de Histologia e Histoquímica da Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente – FCT – UNESP. Os corpos de prova (tendões) foram removidos e depois imersos por 24 horas em solução de formol a 10% com a finalidade de fixação do tendão, em seguida os mesmos foram lavados por 12 horas em água corrente. Logo após este procedimento os tendões passaram pela técnica de desidratação sendo banhados em soluções crescentes de álcool etílico, a 70%, 90%, 95%, por uma hora em cada solução e a 100%, sendo este repetido por 3 vezes por 1 hora cada. Finalizado os banhos de desidratação, todas as peças foram submetidas à diafanização, que consistiu de 3 banhos de xilol por 1 hora. Posteriormente aos banhos de xilol as peças foram retiradas do recipiente e inseridas imediatamente em parafina líquida (60°C), este procedimento foi executado com 3 banhos consecutivos de 1 hora cada banho.

Terminado este processo de parafinização, os tendões foram inclusos em blocos de parafina para posteriormente executar-se os cortes das peças. Por intermédio de um micrótomo LEICA modelo RM 2125 RT as peças inclusas em blocos de parafina passaram por cortes longitudinais, com espessura padrão de 5µm para a coloração de Hematoxilina e Eosina - H.E e Picro-Sirius Red.

Ao término do processo citado anteriormente, todas as lâminas passaram pelo processo de montagem sendo que cada lâmina histológica foi confeccionada com uma série de no mínimo 5 cortes transversais consecutivos e cada grupo de animais foi representados por 10 lâminas histológicas montadas com seus respectivos tendões.

Após serem montadas, todas as lâminas passaram pela técnica de desparafinização, em seguida as mesmas foram hidratadas e coradas com Hematoxilina e Eosina - H.E, para análise histológica em microscopia de luz utilizou-se o microscópio NIKON ECLIPSE 50i equipado com a câmera fotográfica INFINITY 1 e o programa software NIS-ELEMENTS D3 com objetivo de reproduzir imagens ampliadas para revelarem detalhes das estruturas dos tecidos, pois a coloração de lâminas como muitos constituintes dos tecidos biológicos têm densidades ópticas muito próximas, por tal motivo as amostras precisam ser coradas para a microscopia óptica, usando principalmente corantes solúveis em água, após a coloração o corte é novamente desidratado para possibilitar que uma lamínula seja afixada de modo permanente, para proteger de danos como é imprescindível para observação do corte ao microscópio.

Para as análises das lâminas histológicas com coloração Picro-Sirius Red foi adotado o procedimento igual ao procedimento de Hematoxilina e Eosina - H.E com relação à fixação, desidratação, diafanização, inclusão, microtomia, montagem das lâminas histológicas, que foram técnicas citadas anteriormente no texto.

A coloração ocorreu com Sirius-Red F3B (CI 35782) 05g, solução aquosa saturada de ácido pícrico 500 mL (1,3% em água), o Sirius-Red está disponível a partir da Sigma-Aldrich sob o nome de “Direct Red 80”, água acidificada: adicionando 5 mL de ácido acético (glacial) para 1 litro de água destilada.

O procedimento de coloração ocorreu com a Hematoxilina de Weigert por 8 min, depois as lâminas foram lavadas em água corrente por 10 min, posteriormente as lâminas foram coradas em Picro-Sirius Red durante 1 hora, após esta etapa ocorreu a lavagem das mesmas em duas mudanças de água acidificada.

Fisicamente a remoção de maior parte da água ocorreu a partir da agitação vigorosa das lâminas, a desidratação deu-se por 3 banhos de etanol a 100% e para finalizar o processo as lâminas foram limpas em xilol e montadas em um meio resinoso.

Para a captura das imagens coradas com Picro-Sirius Red foi utilizado um microscópio LEICA-DM-4000B, do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia Araçatuba – FOA da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP – SP sob coordenação do Prof. Luciano Tavares Ângelo Cintra e o programa utilizado para captura de imagens foi o IMAGE J. Para determinação das porcentagens (%) do colágeno tipo I (fibras grossas) utilizou-se o programa EXCEL e foram feitas 20 medidas utilizando a equação

$$\%AD = \frac{AD}{AT} \cdot 100 \quad (\text{Equação 7})$$

sendo AD a área dourada que corresponde ao colágeno tipo I e AT é a área total .

6.6.2. Preparação das lâminas para análises de microscopia de força atômica - AFM e de microscopia de polarização

O mesmo procedimento de preparação citado nas técnicas para análises histológicas com coloração por Hematoxilina e Eosina - H.E e Picro-Sirius Red foi utilizado para a montagem das lâminas referentes às duas técnicas de análises (Microscopia de Força Atômica – AFM e Birrefringência).

Após a remoção dos tecidos e imersão em solução de formol a 10% por 24 horas e lavagem em água corrente dos mesmos por 12 horas, os corpo de provas (tendões) passaram pelas seguintes etapas: fixação, desidratação, diafanização, inclusão, microtomia, montagem das lâminas histológicas e coloração.

Após a realização da técnica de inclusão que ocorreu em blocos parafina, as peças foram cortadas longitudinalmente por um micrótomo LEICA modelo RM 2125 RT com cortes padronizados de $7\mu\text{m}$, imediatamente após os cortes serem fixados em lâminas histológicas os mesmos não receberam coloração e coberturas de lamínulas. As lâminas

obtiveram sua confecção separadamente e cada lâmina histológica foi montada com uma série de no mínimo 5 cortes consecutivos de cada peça e cada grupo de animais foi representado por 10 lâminas histológicas montadas com seus respectivos tendões. Ao término deste procedimento as lâminas foram desparafinizadas e desidratadas.

Para as análises topográficas das amostras dos tendões calcâneos de ratos foi utilizado um Microscópio de Força Atômica – AFM - VEECO modelo DIMENSION V, em meio aéreo, operando no modo tapping mode, frequência de varredura de 150 kHz-Hz, num campo de análise de 512 x 512 px. Para a obtenção de imagens foram realizadas cinco capturas de sua topografia sob uma disposição aleatória na área correspondente à área central da lâmina. Mediante as imagens tridimensionais capturadas do Microscópio de Força Atômica - AFM foram analisadas de maneira qualitativa a conformação organizacional (alinhamento, homogeneidade e predominância dimensional) das fibras e feixes colágenos.

Todo o procedimento de análise para Microscopia de Força Atômica - AFM foi coordenado e orientado com o auxílio do Prof. Rubens Bernardes Filho do Laboratório de Nanotecnologia para Agronegócio da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA – São Carlos – SP. Para as análises perimétricas topográficas foram feitas 20 medidas e o programa utilizado para obtenção das imagens e medidas de perimetria topográficas (medidas em micrômetros, μm) foi o GWYDDION 2.31.

Entretanto por meio da microscopia de polarização usando a propriedade anisotrópica óptica foi possível analisar as fibras colágenas de tendões de ratos do presente trabalho, pois o colágeno possui tal anisotropia óptica o que se refere a birrefringência de forma textural.

Com o uso de água destilada todas as lâminas de cada grupo analisado, passaram por um processo de submersão, com a finalidade de uma análise da birrefringência total das

lâminas histológicas de forma precisa, porém onde o índice de refração é de ($n = 1,333$), conforme descreve em suas pesquisas Vidal (1987b).

As medidas dos retardos ópticos em H_2O representam à soma das birrefringências intrínsecas e textural dos feixes de colágeno.

Durante um intervalo de tempo de 30 minutos todas as lâminas a serem analisadas foram imersas em água destilada e antes de serem analisadas no microscópio de luz polarizada foram cobertas por lamínulas, contendo água destilada nas interfaces.

Para a obtenção das medidas de retardos ópticos (R.O) utilizou-se um microscópio de luz polarizada Leica modelo DMRX. As medidas foram obtidas com uma objetiva Pol 10x/0,22, condensador 0,0, compensador Sénarmont's $\lambda/4$, monocromática $\lambda = 546\text{nm}$, obtida por meio de um filtro de interferência Leica, todo este equipamento foi utilizado no Departamento de Engenharia de Materiais da UFSCar e as análises transcorreram sob a supervisão e orientação do Prof. Dr. Oscar Peitl Filho.

As fibras colágenas apresentam um alto brilho e consequentemente um alto valor de retardo óptico (R.O) quando estão orientadas na posição de 45° de orientação do eixo longo do tendão em relação aos polarizadores do microscópio, nesta posição as medidas de birrefringência tornam-se possíveis.

6.7. Análise Estatística

A análise estatística foi feita por meio do programa SPSS 17.0 for Windows. Para comparação entre os grupos dos animais que somente passaram pelos banhos hidrotérmicos foi utilizado o teste ANOVA One-Way seguido do pós-teste de Tukey, sendo considerado o nível de significância de $p < 0,05$.

Para comparação pareada (animais que passaram pelo banho hidrotérmico associado aos exercícios físicos) foi utilizado o Tete T Independente para amostras (Independent Sample Teste T), sendo considerado o nível de significância de $p < 0,05$.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1. Análise visual dos animais durante e após o procedimento experimental

Desde o início do presente estudo foram planejados para os 7 grupos conter 5 animais, perfazendo um total de 35 animais e 70 conjuntos (tendões do membro direito/esquerdo), o procedimento experimental prosseguiu de forma normal como o planejado não ocorrendo óbito de animais.

Durante o ato cirúrgico que consistiu na extirpação total do músculo gastrocnêmio, do tendão e pé do rato do membro pélvico foi observado em uma análise visual que os animais do grupo controle GC, I, II, III e IV os membros inferiores (direito/esquerdo) não apresentaram lesões cutâneas e motoras, fato evidenciado também 24 e 48 horas após o experimento. Para os grupos V e VI constatou-se notadamente uma coloração não habitual (supostamente necroses), encolhimento tendíneo e posteriormente durante o procedimento cirúrgico uma dificuldade de extirpação do mesmo (rigidez tecidual),

7.2. Análise morfológica qualitativa das lâminas coradas por hematoxilina e eosina - H.E

Por meio de microscopia de luz foram realizadas as análises histológicas. As lâminas foram montadas com cortes longitudinais com finalidade de analisar fibras de colágeno, fibroblastos, células inflamatórias e o estado de organização do colágeno, pois a técnica de coloração com Hematoxilina e Eosina - H.E evidencia tais alterações.

As figuras 25 e 26 estão correlacionadas com os animais do grupo controle GC cujas patas traseiras não foram submergidas ao banho hidrotérmico, aos exercícios com saltos verticais e tampouco ao ensaio de tração. Os tecidos apresentam uma alta organização do colágeno em sua região central e externa (asteriscos amarelos) sem presença de fibroblastos e também a ausência de reações inflamatórias.

Figura 25. Corte histológico do tendão calcâneo corado por hematoxilina e eosina, grupo controle (10x).

Figura 26. Corte histológico do tendão calcâneo corado por hematoxilina e eosina, grupo controle (20x).

As figuras 27, 28 e 29 correspondem aos animais do grupo I, cujos membros não foram submetidos ao banho hidrotérmico e ao exercício físico, mas neste grupo todos os tendões foram submetidos ao ensaio de tração. Os asteriscos amarelos indicam a presença de colágeno em alta organização.

Figura 27. Corte histológico do tendão calcâneo corado por hematoxilina e eosina, grupo I (10x).

Figura 28. Corte histológico do tendão calcâneo corado por hematoxilina e eosina, grupo I (20x).

A figura 29 mostra fibrócitos entre as fibras (asteriscos verdes), responsáveis por sintetizar colágeno entre as fibras.

Figura 29. Corte histológico do tendão calcâneo corado por hematoxilina e eosina, grupo I (40x).

As figuras 30 e 31 exibem alta concentração de tecido colagenoso (asteriscos amarelos) o que evidenciam um tecido altamente organizado. Os membros inferiores dos animais deste grupo II não sofreram banhos hidrotérmicos, mas realizaram exercícios de saltos verticais e seus tendões passaram por ensaios de tração.

Figura 30. Corte histológico do tendão calcâneo corado por hematoxilina e eosina, grupo II (10x).

Figura 31. Corte histológico do tendão calcâneo corado por hematoxilina e eosina, grupo II (20x).

As figuras 32 e 33 são imagens dos tendões do grupo III (42°C sem exercício/com ensaio mecânico de tração), que mostraram uma arquitetura com características muito

próximas à do grupo II, evidenciando o conjunto de fibras colágenas organizadas e preservadas na sua morfologia tecidual (asteriscos amarelos).

Figura 32. Corte histológico do tendão calcâneo corado por hematoxilina e eosina, grupo III (10x).

Figura 33. Corte histológico do tendão calcâneo corado por hematoxilina e eosina, grupo III. (20x).

As figuras 34 e 35 representam os tendões analisados do grupo IV (42°C com exercício/com ensaio mecânico de tração). As imagens deste grupo demonstram um tecido em vias de desorganização, perdendo o paralelismo de fibras em sua porção central (asteriscos amarelos), presença de reações inflamatórias (asteriscos azuis).

Figura 34. Corte histológico do tendão calcâneo corado por hematoxilina e eosina, grupo IV (10x).

Figura 35. Corte histológico do tendão calcâneo corado por hematoxilina e eosina, grupo IV (20x).

As figuras 36, 37 e 38 representam os animais do grupo V (45° C sem exercício/com ensaio mecânico de tração).

Figura 36. Corte histológico do tendão calcâneo corado por hematoxilina e eosina, grupo V (10x).

Na figura 36 percebe-se a presença de tecido colágeno (asteriscos amarelos) intermediado com fibroblastos (asteriscos pretos), estando o tecido colágeno aparente na faixa central um pouco espaçado, com pouca desorganização e pequena perda de continuidade, sendo uma área de rompimento. Há presença também de reações inflamatórias (asteriscos azuis) na parte superior da imagem.

A figura 37 mostra um tecido colágeno com pouca desorganização mantendo o paralelismo entre as fibras (asteriscos amarelos) e presença de células fibroblásticas (asteriscos pretos) presentes no tecido colagenoso.

Figura 37. Corte histológico do tendão calcâneo corado por hematoxilina e eosina, grupo V (10x).

A figura 38 mostra uma reação inflamatória (asterisco azuis) mais acentuada que nas figuras 36 e 37, o que indica uma tendência para o início da desorganização tecidual nas fibras colagenosas.

Figura 38. Corte histológico do tendão calcâneo corado por hematoxilina e eosina, grupo V (20x).

A figura 39 representa o tendão calcâneo do grupo V (45° C sem exercício/com ensaio de tração), evidenciando-se na imagem a presença de tecido colágeno (asteriscos amarelos) espaçado, com pouca organização e intermediado com fibroblastos (asteriscos pretos).

Figura 39. Corte histológico do tendão calcâneo corado por hematoxilina e eosina, grupo V (40x).

As figuras 40 e 41 representam os animais do grupo VI (45° C com exercício/com ensaio de tração). A figura 40 exhibe um tecido colagenoso (asteriscos amarelos) central desagregado, espaçado, com presença de células inflamatórias (asteriscos azuis), com pouca organização e perda de continuidade tecidual, sendo áreas de rompimento. Na região esquerda e abaixo do centro da imagem há um espaçamento grande, o que denota uma área que supostamente sofreu ruptura (asteriscos lilás).

Figura 40. Corte histológico do tendão calcâneo corado por hematoxilina e eosina, grupo VI (10x).

A figura 41 representa um tecido colágeno muito desorganizado em sua região central, não mantendo o paralelismo habitual entre as fibras colágenas (asteriscos amarelos), com espaçamento grande entre as fibras de colágeno e um grande agregado de células inflamatórias (asteriscos azuis) na parte central e inferior direita.

Figura 41. Corte histológico do tendão calcâneo corado por hematoxilina e eosina, grupo VI (10x).

Na análise histológica qualitativa realizada neste trabalho notou-se pouca diferença do grupo controle GC em relação aos grupos I, II e III, pois em todos os casos as diferenças são discretas nas estruturas das fibras, sem aumento da presença de células fibroblásticas.

Entretanto ao se analisar comparativamente o grupo III e IV, na qual a variável é o exercício (grupo IV) já que os tendões dos dois grupos foram submetidos à mesma temperatura (42°C), verificou-se no grupo IV há pequena desorganização das fibras colágenas com perda de sua continuidade morfológica e presença de células inflamatórias.

Quando se compara histologicamente (H.E) os grupos V e VI, cujo variável também é o exercício de saltos verticais (grupo VI), onde os tendões também foram expostos às mesmas temperaturas (45°C), há uma evidencia que os animais dos grupos que passaram por exercícios tiveram um dano muito maior em relação àqueles que não foram submetidos aos saltos verticais, pois as imagens apresentam uma desorganização acentuada em sua porção central com perda da continuidade tecidual, destruição tecidual, aparecimento de células inflamatórias o que indica a presença de um processo inflamatório e regiões apresentando

evidências de avulsionamento, o que provavelmente foi causado por uma desorganização do tecido.

Relacionando de uma maneira generalizada as imagens do grupo controle GC, I, II em relação aos grupos III, IV, V e VI, evidencia-se uma grande desigualdade nas imagens obtidas, o que faz perceber que em temperaturas elevadas iguais e ou acima de 42°C há um início de danos ao tecido tendíneo, acentuando-se na temperatura de 45°C. Para as temperaturas elevadas citadas anteriormente associadas com os exercícios de saltos verticais o dano é maior ainda, fato este demonstrado nas imagens obtidas por Hematoxilina e Eosina - H. E.

Em relação somente à temperatura do grupo III e IV (42°C) o que se pode pensar é que este grau de aquecimento é uma temperatura limite para aplicabilidade clínica. Low e Reed (2001) relata em que o uso da termoterapia que induz o aquecimento tecidual a 45°C causa dano proteico e tecidual, portanto se elevarmos o aquecimento poderá ocorrer uma destruição muscular e uma desnaturação na morfologia do colágeno, evento este que pôde ser identificado nos grupos V e VI, este fato foi enfatizado ainda mais quando se adicionou exercícios (saltos verticais) neste trabalho.

7.3. Análise morfológica qualitativa das lâminas coradas por picro-sirius red

As análises com coloração de Picro-Sirius Red foram feitas por meio da microscopia de luz polarizada, todas as imagens analisadas foram obtidas com o aumento de 100x (10x oculares e 10x objetivas), com a intenção de observar-se as fibras colágenas tipo I presentes no tendão calcâneo de ratos.

Após este procedimento utilizou-se o editor de imagens IMAGE J, para a demarcação do colágeno tipo I existente no tendão calcâneo, para a determinação da porcentagem (%) das fibras colágenas do presente estudo, foi utilizado o programa EXCEL.

As figuras 42 – 45 são pertencentes aos grupos controle GC, I, II e III. Todos os grupos citados não foram expostos a temperaturas exceto o grupo III e somente o grupo II foi submetido ao exercício. Tais imagens possuem um brilho acentuado na cor dourado, pois esta cor correlaciona-se com presença de colágeno tipo I (fibras grossas), colágeno este altamente organizado e resistente. Dayan *et al.*, (1989) mostraram que as cores da birrefringência de polarização parecem ser uma medida da espessura das fibras, da densidade do empacotamento e do arranjo espacial. Moléculas fortemente empacotadas e, presumivelmente, melhor alinhadas mostram cores de polarização em comprimento de onda mais distantes.

Figura 42. Fibra colágena de tendão calcâneo corado com picro-sirius red, grupo controle (100x).

Figura 43. Fibra colágena de tendão calcâneo corado com picro-sirius red, grupo I (100x).

Figura 44. Fibra colágena de tendão calcâneo corado com picro-sirius red, grupo II (100x).

Figura 45. Fibra colágena de tendão calcâneo corado com picro-sirius red, grupo III (100x).

As figuras 46, 47 e 48 são pertencentes aos grupos IV, V e VI, todos os grupos citados foram expostos aos banhos hidrotérmicos e somente o grupo IV e VI foi submetidos ao exercício (saltos verticais), as figuras denotaram a presença de um tecido desorganizado com espaçamento entre as fibras e perda de continuidade que o torna com capacidade funcional reduzida.

Figura 46. Fibra colágena de tendão calcâneo corado com picro-sirius red, grupo IV (100x).

Figura 47. Fibra colágena de tendão calcâneo corado com picro-sirius red, grupo V (100x).

Figura 48. Fibra colágena de tendão calcâneo corado com picro-sirius red, grupo VI (100x).

A figura 49 expressa o gráfico confeccionado a partir das porcentagens (%) obtidas das lâminas coradas com Picro-Sirius Red, o gráfico exposto foi analisado somente com a variável temperatura dos grupos controle GC, I, III e V.

Figura 49. Porcentagens (%) de colágeno tipo I (fibras grossas) para os animais que passaram pelo banho hidrotérmico comparados ao grupo controle.

Os resultados para a variável temperatura estão expressos na tabela 1 que contém as informações em porcentagens (%) das proporções de colágeno tipo I (área dourada) de cada grupo analisado no experimento.

Tabela 1. Média percentual (%) do colágeno tipo I (fibras grossas) para os animais que passaram pelo banho hidrotérmico.

Grupos	Média (%) do Colágeno Tipo I (Área Dourada)
Controle	86,20 ± 3,10
I	81,39 ± 3,13
III	59,03 ± 4,82
V	38,11 ± 3,80

A tabela 1 mostra os valores percentuais (%) do colágeno tipo I e informa que nos grupos controle GC, I e III ocorreu uma porcentagem alta de colágeno tipo I (áreas douradas). Com aumento da temperatura dos banhos hidrotérmicos há uma diminuição de percentual nos grupos citados anteriormente ocorrendo diminuição das áreas douradas no grupo V, este fato vai de encontro com as análises visuais estudadas nas imagens anteriores, e supõe que o aumento da temperatura provoca dano no tecido colagenoso.

A figura 50 mostra as porcentagens (%) obtidas das lâminas coradas com Picro-Sirius Red. O gráfico foi montado mediante as variáveis temperaturas e exercícios físicos (saltos verticais) de todos os grupos e a intenção foi estudar o efeito das variáveis pareadas comparando seus efeitos dentro dos grupos.

Figura 50. Porcentagem de colágeno tipo I (fibras grossas) para os animais que passaram pelos banhos hidrotérmicos associado ao exercício físico.

A tabela 2 expressa os resultados em porcentagens (%) das proporções de colágeno tipo I (área dourada) de cada grupo analisado no experimento aos pares para a variável temperatura associada ao exercício físico (saltos verticais).

Tabela 2. Média percentual (%) do colágeno tipo I (fibras grossas) para os animais que passaram pelo banho hidrotérmico com associação de exercícios físicos.

Grupos	Média (%) do Colágeno Tipo I (Área Dourada)
Controle	86,20 ± 3,1
I	81,39 ± 3,13
II	72,17 ± 4,48
±	
III	59,03 ± 4,42
IV	48,55 ± 5,41
V	38,11 ± 3,80
VI	11,11 ± 1,91

Nas análises do percentual pareado dentro dos grupos controle GC e I, GC e II, I e II, III e IV e V e VI para o colágeno tipo I (área da dourada) nota-se que os percentuais são altos nos grupos controle GC, I e III, mas abaixam-se de forma acentuada nos grupos II e IV, no grupo V o percentual mostra-se baixo e confirma-se ainda mais baixo no grupo VI, estes dados corroboram que a adição de exercício físico provoca com mais ênfase à destruição tecidual do colágeno, pois estes grupos foram os que passaram por exercícios físicos.

7.4. Análise morfológica qualitativa das imagens obtidas por microscopia de força atômica - AFM

A análise qualitativa e quantitativa dos tendões ocorreu de forma criteriosa mediante imagens obtidas por Microscopia de Força Atômica - AFM, que tem a finalidade de mostrar a topografia da amostra observada, e as lâminas foram montadas com cortes longitudinais com finalidade de analisar as fibras colágenas.

As figuras 51 - 54 representam os grupos controle GC, I, II e III respectivamente e revelam um tecido organizado com um padrão elevado de orientação e alinhamento longitudinal e supostamente com alta concentração de colágeno.

Figura 51. Imagem de tendão calcâneo obtida por microscopia de força atômica, grupo controle ($5,0 \times 5,0 \mu\text{m}$)

Figura 52. Imagem de tendão calcâneo obtida por microscopia de força atômica, grupo I ($5,0 \times 5,0 \mu\text{m}$)

Figura 53. Imagem de tendão calcâneo obtida por microscopia de força atômica, grupo II (2,0 x 2,0 μm)

Figura 54. Imagem de tendão calcâneo obtida por microscopia de força atômica, grupo III (2,0 x 2,0 μm)

As figuras 55, 56 e 57 são respectivamente pertencentes aos grupos, IV, V e VI, mostram um tecido desorganizado, subentendendo-se que nestes grupos há uma baixa

concentração de colágeno, com um padrão diminuído de orientação e alinhamento longitudinal.

Figura 55. Imagem de tendão calcâneo obtida por microscopia de força atômica, grupo IV (2,49 x 2,49 μm)

Figura 56. Imagem de tendão calcâneo obtida por microscopia de força atômica, grupo V (2,47 x 2,47 μm)

Figura 57. Imagem de tendão calcâneo obtida por microscopia de força atômica, grupo VI (5,0 x 5,0 μm)

As imagens obtidas mediante a Microscopia de Força Atômica - AFM mostram que o grupo controle GC, e os grupos I e II, tem uma alta concentração de agregação e alinhamento em paralelo das fibras colágeno, fato este que indica a presença de um material mais organizado. Isto também se repete ao grupo III, grupo este que passou pela temperatura de 42°C, mas sem associar os exercícios físicos (saltos verticais).

As mudanças observadas nas imagens dos grupos, IV, V e VI evidenciam um tecido com padrão desorganizado e menor alinhamento em paralelo das fibras colágenas em sua porção longitudinal, em comparação com aos grupos controle GC, I, II e III.

Estas observações qualitativas correlacionam-se com os dados obtidos de maneira quantitativa para as medidas de perimetria topográfica dos tendões calcâneos de ratos, mostrados na figura 58 na forma de gráfico Box-Plot, com valores expressos em micrômetros (μm), considerando os animais que passaram pelos banhos hidrotérmicos.

Figura 58. Representação Box-Plot das medidas de perimetria topográfica (μm) dos grupos controle GC, I, III e V, para os animais que passaram pelo banho hidrotérmico.

Para as análises estatísticas da perimetria topográfica dos tendões calcâneos de ratos utilizou-se o teste ANOVA One Way e pós-teste de Tukey, ($p < 0,05$). Os grupos analisados têm seus valores expressos em micrômetros (μm), mostrados na tabela 3 e a variável considerada foi somente os animais que passaram pelos banhos hidrotérmicos.

Com base nas informações da tabela 3 nota-se uma diferença significativa entre os valores dos grupos controle GC e I, grupo controle GC e III, grupo controle GC e V, I e III, III e V, mostrando que o aumento da temperatura diminui a perimetria topográfica dos tendões analisados.

Tabela 3. Valores da perimetria topográfica (μm), para os animais que passaram pelos banhos hidrotérmicos.

Grupos	Perimetria (μm)
Controle	$0,743 \pm 0,123$
I	$0,440 \pm 0,060^{\circ}$
III	$0,251 \pm 0,059^{\Delta}$
V	$0,144 \pm 0,022^{\Delta, \square}$
	$F = 240,077$ ($p = 0,000$)

$^{\circ}p < 0,05$ (comparado com GC); $^{\Delta}p < 0,05$ (comparado com GI); $^{\square}p < 0,05$ (comparado com GII)

A figura 59 mostra as medidas de perimetria topográfica dos tendões calcâneos de ratos de todos os grupos na forma de gráfico Box-Plot, sendo que a análise foi feita de forma pareada e a variável foi relacionar os banhos hidrotérmicos associado aos exercícios físicos (saltos verticais) em comparação aos grupos que só sofreram banho hidrotérmicos.

Figura 59. Representação Box-Plot das medidas de perimetria topográfica (μm) de todos os grupos pareados, para os animais que passaram pelos banhos hidrotérmicos associado ao exercício físico.

A tabela 4 expressa os resultados dos valores da perimetria topográfica em micrômetros (μm) de cada grupo estudado no presente trabalho para a variável animais que passaram pelos banhos hidrotérmicos associado ao exercício físico e nestas análises foram verificados os grupos aos pares utilizando o Teste T Independente para amostras (Independent Sample Teste T), ($p < 0,05$).

Tabela 4: Valores da perimetria topográfica (μm) de todos os grupos analisados para os animais que passaram pelos banhos hidrotérmicos associado ao exercício físico.

Grupos	Perimetria (μm)
Controle	$0,743 \pm 0,123$
I	$0,440 \pm 0,060$
	$p = 0,000$
I	$0,440 \pm 0,060$
II	$0,215 \pm 0,058$
	$p = 0,000$
III	$0,251 \pm 0,059$
IV	$0,136 \pm 0,024$
	$p = 0,000$
V	$0,144 \pm 0,022$
VI	$0,063 \pm 0,014$
	$p = 0,000$

Os resultados mostrados na tabela 4 e divulgados na forma de gráfico Box-Plot denotam que ocorreu diferença significativa entre o pareamento dos grupos controle GC e I, I e II, III e IV, V e VI. Os valores da perimetria topográfica apresentaram valores numéricos mais altos nos grupos que não sofreram ação da temperatura (GC, I). Porém no grupo II, cujos

animais não sofreram banhos hidrotérmicos, mas foram submetidos aos exercícios físicos, o valor apresentou-se baixo, fato este que pode ser associado que com o incremento do exercício há uma tendência de diminuição da perimetria do diâmetro da fibra tendínea, já que a diferença mostra-se de forma significativa no pareamento do grupo controle GC e I, I e II.

Para os grupos em que a temperatura se fez presente (III, IV, V e VI) os valores se mostram baixos quando comparados aos pares (III e IV, V e VI), e acentuaram-se mais quando a temperatura foi aumentada e esteve associada ao exercício físico (grupos estes IV e VI).

7.5. Análise qualitativa e quantitativa das medidas de birrefringência

As figuras 60 - 66 foram obtidas por meio de microscopia de luz polarizada para capturar as imagens dos corpos de provas (tendões) fixados nas lâminas e as mesmas foram posicionados na platina do microscópio à 45° (direita ou esquerda) em relação aos polarizadores, pois nesta angulação de orientação que corresponde ao eixo longo dos tendões, as fibras dos tendões exibem uma morfologia de enrugamento e ondulação que é denominada “*crimp*”, que possui um brilho altamente característico associado com o alto valor de retardo óptico, estes fatores são resultantes de alta concentração, orientação estado de agregação molecular e deposição de fibras colágenas.

Figura 60. Imagens de microscopia de birrefringência das fibras colágenas do grupo controle.

Nota-se que nas imagens das figuras 60, 61 e 62 que representam os grupos controle GC, I e II respectivamente, as fibras possuem uma alta organização molecular da proteína colágeno bem como agregação, indicando que o colágeno não sofreu desorganização em sua conformação biológica.

Figura 61. Imagens de microscopia de birrefringência das fibras colágenas do grupo I.

Figura 62. Imagens de microscopia de birrefringência das fibras colágenas do grupo II.

Nas imagens observadas por microscopia de birrefringência das figuras 63 - 66 os asteriscos vermelhos enfatizam áreas em que as fibras tendíneas perderam a organização estrutural e a continuidade tecidual do colágeno tendíneo.

Figura 63. Imagens de microscopia de birrefringência das fibras colágenas do grupo III.

Figura 64. Imagens de microscopia de birrefringência das fibras colágenas do grupo IV.

Figura 65. Imagens de microscopia de birrefringência das fibras colágenas do grupo V.

Figura 66. Imagens de microscopia de birrefringência das fibras colágenas do grupo VI.

A figura 67 mostra as medidas de birrefringência dos grupos analisados (grupo controle GC, I, III e V) em forma de gráfico Box-Plot, somente para a variável temperatura, e ilustra o comportamento de cada grupo, evidenciando que os grupos não são próximos entre si tendo uma diferença grande nos valores de birrefringência.

A partir da região central das amostras estudadas extraiu-se 100 medidas de retardos ópticos, sendo que os valores para as medidas de birrefringência foram expressos em nanômetros (nm) para cada grupo em diferentes pontos do tendão. A análise dos grupos controle GC, I, III e V ocorreram com aplicação de métodos estatísticos mediante um teste paramétrico, com análise de variância, havendo homogeneidade nas variâncias dos grupos.

Figura 67. Representação Box-Plot das medidas de birrefringência (nm) dos grupos controle GC, I, III e V para os animais que passaram pelos banhos hidrotérmicos.

Os resultados das medidas de birrefringência para a variável temperatura estão expressos na tabela 5 e utilizou-se o teste ANOVA One Way e pós-teste de Tukey, ($p < 0,05$) para a análise estatística.

Tabela 5. Valores de birrefringência (nm), obtidos mediante os retardos ópticos dos grupos analisados para os animais que passaram pelos banhos hidrotérmicos.

Grupos	Birrefringência (nm)
Controle	$74,73 \pm 6,42$
I	$60,93 \pm 8,16^{\circ}$
III	$42,53 \pm 9,18^{\Delta}$
V	$26,79 \pm 4,73^{\Delta, \square}$
	$F = 820,113 (p = 0,000)$

$^{\circ}p < 0,05$ (comparado com GC); $^{\Delta}p < 0,05$ (comparado com GI); $^{\square}p < 0,05$ (comparado com GII)

Os resultados expressados na tabela 5 que contêm somente informações para a variável temperatura exibiram que para as análises de medidas de birrefringência o grupo controle (GC) e grupo I têm as médias de valores de retardos ópticos altos, apontando que estes grupos estão muito próximos no seu estado de agregação e orientação molecular das fibras colágeno, fato este comprovado nas imagens 59 e 60. Estes grupos (GC e I), não foram submetidos ao banho hidrotérmico, entretanto para o grupo III (temperatura de 42°C) os valores começam a apresentar uma média de retardo óptico em declínio o que indica que nesta condição de temperatura há um início de desorganização do tecido e perda de continuidade na agregação molecular do colágeno, e se destaca ainda mais baixa no grupo V (temperatura de 45°C), fato que acentua-se quando se eleva a temperatura mostrando que ocorre desorganização do colágeno das fibras tendíneas. Isto confirma que quanto menores forem os resultados em nanômetros (nm) piores serão os efeitos com relação à organização estrutural das fibras de colágeno devido à aplicação de aquecimento local.

A figura 68, exibida na forma de gráfico Box-Plot, mostra as medidas de birrefringência de todos os grupos com a variável temperatura associada aos exercícios físicos em comparação aos grupos que só sofreram banho hidrotérmicos.

Os resultados das análises de birrefringência para a variável temperatura com adição de exercícios físicos estão mostrados na tabela 6. Nestas análises foram verificados os grupos aos pares utilizando o Teste Independente para amostras (Independent Sample Teste T), ($p < 0,05$).

Figura 68. Representação Box-Plot das medidas de birrefringência (nm) de todos os grupos para os animais que passaram pelos banhos hidrotérmicos associado ao exercício físico.

Foi constatado por meio dos dados da tabela 6 que ocorreu diferença significante entre o pareamento dos grupos controle GC e I, I e II, III e IV, V e VI.

Quando a variável é animais que passaram pelos banhos hidrotérmicos associado a exercícios físicos, as análises pareadas mostraram que houve diferença significante nas médias de valores de retardos ópticos. O grupo controle GC em relação ao I teve médias de valores de retardos ópticos altas, o mesmo ocorrendo para o pareamento entre o grupo I e II, o que evidencia um alto grau de orientação das fibras de colágenos, notadas nas imagens 60, 61 e 62.

Tabela 6: Valores de birrefringência (nm) dos grupos analisados para os animais que passaram pelos banhos hidrotérmicos associado ao exercício físico.

Grupos	Birrefringência (nm)
Controle	$74,73 \pm 6,42$
I	$60,93 \pm 8,16$
	$p = 0,000$
I	$60,93 \pm 8,16$
II	$51,04 \pm 8,17$
	$p = 0,000$
III	$42,53 \pm 9,18$
IV	$35,85 \pm 4,90$
	$p = 0,000$
V	$26,79 \pm 4,73$
VI	$20,91 \pm 3,40$
	$p = 0,000$

Para o pareamento entre os grupos III e IV os valores de R.O foram menores, o que indica que nestes grupos há um início de desorganização do estado de agregação molecular do colágeno e alteração da geometria helicoidal, fato este que se acentua com maior intensidade quando correlata-se os grupos V e VI. Todas estas observações citadas são observadas nas imagens 63- 66.

Os valores neste experimento indicam que com o aumento da temperatura há uma diminuição dos valores de retardos ópticos, mas este episódio é realçado quando os exercícios físicos (saltos verticais) são incluídos nos grupos (II, IV e VI), o que sugere uma

desorganização do colágeno mais evidente nestes grupos em relação aos grupos (GC, I, III e V), fato este que pode ser correlacionado com as análises das propriedades mecânicas.

7.6. Análise quantitativa dos ensaios mecânicos de tração

A figura 69 mostra curvas representativas de um ensaio de tração dos materiais em estudo.

Figura 69. Curvas representativas do ensaio mecânico de tração.

Na literatura consultada o trabalho de Yuan et al., (2003) avaliou o comportamento mecânico especificamente de tendões calcâneos de ratos *Sprague-Dawley*, o trabalho de Biancalana (2009), o animal utilizado foi ratos da raça *ZUCKER* e nos estudos de Romano et al.,(2010), coelhos foram os animais utilizados, porém em ambos os trabalhos foram observadas as análises mecânicas por meio de ensaio de tração de tendão.

Segundo Viidik (1996), as fibras colágenas determinam as características mecânicas, a organização tecidual e a estabilidade dos tendões e ligamentos, portanto as propriedades mecânicas são dependentes de vários fatores incluindo orientação das fibras e

fibrilas de colágeno, assim como seu comprimento e diâmetro (BIRK et al., 1997), enquanto que as propriedades físicas dos tendões dependem das ligações cruzadas intra e intermoleculares, assim as moléculas de colágeno apresentam a formação dessas ligações cruzadas que proporcionam ao tendão maior força de tensão (HAUNT et al., 1992).

Neste trabalho todos os tendões dos grupos I - VI foram submetidos ao ensaio de tração até o seu momento de ruptura e analisadas as propriedades mecânicas de força máxima (N), rigidez (N/m) e energia absorvida pelo corpo até a seu ponto de ruptura (mJ). Como já citado anteriormente vale lembrar que os animais do grupo controle (GC) serviram única e exclusivamente para análises histológicas.

As figuras 70, 71 e 72 são gráficos em forma de Box-Plot das análises das propriedades mecânicas pertencentes aos grupos que sofreram somente ação do banho hidrotérmico.

A figura 70 mostra os resultados dos valores médios encontrados para a força máxima de tração (N), a figura 71 os resultados de valores médios encontrados para rigidez (N/m) e A figura 72 mostra os valores médios encontrados para a energia absorvida pelo corpo até seu ponto de ruptura (mJ).

Figura 70. Representação Box-Plot dos valores da força máxima de tração (N) para os animais que passaram pelos banhos hidrotérmicos.

Figura 71. Representação Box-Plot dos valores da rigidez (N/m) para os animais que passaram pelos banhos hidrotérmicos.

Figura 72. Representação Box-Plot dos valores da energia absorvida pelo corpo até o ponto de ruptura (mJ) para os animais que passaram pelos banhos hidrotérmicos.

Os resultados numéricos para a variável temperatura sem submeter os animais a exercícios físicos de saltos verticais estão expressos na tabela 7. Foram analisados as propriedades mecânicas força máxima (N), rigidez (N/m) e energia absorvida pelo corpo até o seu ponto de ruptura (mJ), utilizando o teste ANOVA One Way e pós teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 7: Valores das propriedades mecânicas dos grupos analisados para os animais que passaram pelos banhos hidrotérmicos obtidos por meio do ensaio de tração.

Grupos	Força (N)	Rigidez (N/m)	Energia absorvida pelo corpo até a força máxima (mJ)
I	$89,19 \pm 5,96$	$22,77 \pm 5,02$	$269,09 \pm 107,57$
III	$50,56 \pm 7,14^{\Delta}$	$22,89 \pm 4,38$	$205,31 \pm 65,76$
V	$30,83 \pm 3,97^{\Delta, \square}$	$13,32 \pm 3,62^{\Delta, \square}$	$74,88 \pm 40,51^{\Delta, \square}$
	$F = 265,904$ ($p = 0,000$)	$F = 16,292$ ($p = 0,000$)	$F = 17,175$ ($p = 0,000$)

$^{\Delta}p < 0,05$ (comparado com GC); $^{\square}p < 0,05$ (comparado com G III)

Os resultados da força máxima (N) que representa a carga no limite máximo dos grupos experimentais (I, III e V) indicaram que houve uma diferença significativa ($p < 0,05$) na análise simultânea em relação aos grupos I e III, I e V e III e V.

Os valores médios encontrados para a rigidez (N/m) evidenciaram que os grupos I e III não apresentaram diferença entre si, mas os grupos I e V demonstraram diferença significativa ($p < 0,05$), fato que se repetiu entre os grupos III e V.

Para a propriedade de energia absorvida pelo corpo até seu ponto de ruptura (mJ) os valores médios encontrados exibiram que os grupos I e III não apresentaram diferença significativa. Porém, os grupos I e V, e III e V tiveram uma diferença significativa.

As figuras 73, 74 e 75 são gráficos expressados na forma de Box-Plot das análises das propriedades mecânicas pertencentes aos grupos que sofreram ação do banho hidrotérmico associado ao exercício físico.

A figura 73 mostra os resultados de valores médios encontrados para a força máxima (N), a figura 74 mostra os resultados de valores médios encontrados para a propriedade de rigidez (N/m) e a figura 75 mostra os valores médios encontrados para a propriedade de energia absorvida pelo corpo até seu ponto de ruptura (mJ).

Figura 73. Representação Box-Plot dos valores da força máxima (N) para os animais que passaram pelo banho hidrotérmico associado ao exercício físico.

Figura 74. Representação Box-Plot dos valores da rigidez (N/m) para os animais que passaram pelos banhos hidrotérmicos associado ao exercício físico.

Figura 75. Representação Box-Plot dos valores da energia absorvida pelo corpo até o ponto de ruptura (mJ) para os animais que passaram pelos banhos hidrotérmicos associado ao exercício físico.

Na tabela 8 estão os resultados obtidos para os grupos que tiveram o banho hidrotérmico com adição de exercícios físicos. Foram analisados as propriedades mecânicas força máxima (N), rigidez (N/m) e energia absorvida pelo corpo até o ponto de ruptura (mJ), utilizando o Teste T Independente para amostras (Independent Sample Teste T), ($p < 0,05$).

Baseados nos dados apresentados na tabela 8 foram analisados apenas os grupos aos pares (dentro do mesmo grupo), observando os grupos submetidos e não submetidos ao banho hidrotérmico e com exercício e sem exercícios físicos (saltos verticais).

Tabela 8: Valores numéricos das propriedades mecânicas dos grupos analisados aos pares para os animais que passaram pelos banhos hidrotérmicos com associação dos exercícios físicos obtidos por meio do ensaio de tração.

Grupos	Força (N)	Rigidez (N/m)	Energia absorvida pelo corpo até a força máxima (mJ)
I	89,19 ± 5,96	22,77 ± 5,02	269,09 ± 107,57
II	76,17 ± 13,42	31,83 ± 6,22	234,72 ± 86,51
	p = 0,008	p = 0,001	p = 0,419
III	50,56 ± 7,14	22,89 ± 4,38	205,31 ± 65,76
IV	44,23 ± 2,90	17,39 ± 3,55	165,75 ± 51,77
	p = 0,013	p = 0,004	p = 0,130
V	30,83 ± 3,97	13,32 ± 3,62	74,88 ± 40,51
VI	21,24 ± 5,60	9,58 ± 2,11	32,32 ± 24,83
	p = 0,000	p = 0,012	p = 0,011

Nos resultados da tabela 7 ficou evidente que só a variável temperatura (aumento da temperatura) altera as propriedades mecânicas dos tendões, portanto com tal confirmação o propósito da análise dentro dos grupos foi verificar se a variável temperatura mais exercício acentua as alterações mecânicas das amostras.

Nos estudos de ensaio mecânico de tração de Carazzato et al., (1995) foi avaliada a resistência da transição junção músculo-tendínea do tríceps sural de coelhos após a injeção local de corticóides e anestésicos, demonstrando que essas substâncias enfraqueceram esse tecido.

Carazzato et al., (1995) relataram sobre o ensaio de resistência à tração, descrevendo que o músculo gastrocnêmio de ratos são menos resistentes quando submetidos à

fadiga por meio de estimulação elétrica para demonstrar que os músculos fatigados são menos resistentes.

Os resultados de força máxima (N) do presente trabalho corroboram com os estudos de Carazzato et al., (1995), pois os valores indicaram uma diferença estatística significativa entre os grupos I e III, I e V, III e V (variável temperatura) e I e II, III e IV, V e VI (variável temperatura e exercício físico), o que indica que a temperatura interfere, diminuindo a força máxima (N) e a temperatura aliada ao exercício acentua ainda mais esta diminuição de força.

Para a rigidez (N/m), os resultados mostrados na tabela 8 evidenciam que o tendão não teve variação em sua propriedade de rigidez (N/m) entre os grupos I e III. Para os grupos I e V e III e V, houve diferença estatisticamente significativa.

O fato de se aumentar a temperatura diminui a força máxima (N), mas não diminui a rigidez (N/m) quando se compara o grupo I e III, mas quando se aumenta a temperatura de 42°C (grupo III) para 45°C (grupo V) ambas as propriedades diminuem seus valores.

Para a variável temperatura somada aos exercícios de saltos verticais houve uma diferença estatística significativa entre os grupos I e II, III e IV, V e VI, indicando que a temperatura com exercícios influencia na rigidez tendínea. O exercício contribuiu para o aumento da rigidez entre o pareamento do grupo I e II, porém o pareamento dos grupos III e IV, V e VI indica que o exercício colaborou para a diminuição da rigidez tecidual tendínea.

Já para a energia absorvida até o seu momento de ruptura (mJ) para a variável temperatura os valores mensurados não apresentaram valores estatisticamente significativos entre os grupo I e III, contudo para os grupos I e III e III e V os valores expressados na tabela 7 mostraram resultados significantes o que evidenciou que a alta temperatura também provocou uma diminuição energia absorvida pelo corpo de prova até o momento de sua

ruptura fato que subentende-se que com a diminuição da área diminui também a energia absorvida pelo corpo até o seu ponto de ruptura, portanto para romper o corpo de prova utilizou-se menos energia.

Para a variável temperatura associada com exercícios de saltos verticais os resultados mostrados na tabela 8 não apresentaram uma diferença estatisticamente significante entre os grupos I e II e III e IV, mas para os grupos V e VI os valores explicitaram uma diferença significativa, salientando que houve uma diminuição de área analisada, provocando uma diminuição de energia até o seu ponto de ruptura.

Oliveira (2005) e Caiozzo (2002) revelaram que as alterações nas propriedades mecânicas de tecidos biológicos, decorrentes de diminuição ou aumento da demanda funcional, são resultantes de alterações histológicas.

Tais fatos são corroborados de uma forma geral nas imagens histológicas (Hematoxilina e Eosina – H.E, Picro-Sirius Red, Microscopia de Força Atômica – AFM e Microscopia de Birrefringência) dos grupos controle GC, I, II e III em comparação com os grupos IV, V e VI.

8 CONCLUSÃO

As hipóteses 1 e 2 previam que o aumento da temperatura provoca alterações nas propriedades mecânicas e histológicas. A hipótese pôde ser confirmada pelas observações:

As análises histológicas qualitativas com coloração de Hematoxilina e Eosina - H.E mostraram que houve pouca diferença nas estruturas das fibras do grupo controle GC em relação ao grupo I, II e III, entretanto ao se analisar os grupos pareados III e IV, V e VI foi constatado a desorganização das fibras colágenas nos grupos em que o banho hidrotérmico fez-se presente em associação ao exercício físico.

A análise histológica coradas por Picro-Sirius Red demonstrou que em temperaturas altas (42 e 45°C) associadas ao exercício físico de saltos verticais há menor porcentagem de colágeno tipo I (fibras grossas).

A Microscopia de Força Atômica - AFM e as medidas de perimetria topográfica (μm) mostraram que quando se expõe os tendões a temperaturas elevadas há uma diminuição da perimetria topográfica dos tendões, que acentuou-se quando se adiciona exercício de saltos verticais pós-aquecimento induzido.

As medidas de birrefringência mostraram que em altas temperaturas há início de desorganização e perda de continuidade estrutural da fibra do tendão. Esta desorganização é mais evidente quando o exercício de salto vertical esteve presente.

As hipóteses 3 e 4 previam que o aumento da temperatura associado ao exercício físico (saltos verticais) provoca alterações nas propriedades mecânicas e histológicas. A hipótese pôde ser confirmada pelas observações:

Nas análises das propriedades mecânicas de força máxima de ruptura constatou-se que todos os grupos experimentais tiveram sua força diminuída, reduzindo a sua capacidade

de suportar carga. Para a rigidez, os grupos que passaram por menor temperatura não tiveram sua rigidez alterada, mas os grupos que tiveram a maior temperatura houve diminuição. A associação da temperatura ao salto vertical mostrou valores ainda menores.

Conclui-se, portanto que o aumento da temperatura aplicada ao tendão calcâneo por convecção causa mudanças significativas na estrutura do colágeno comprovadas pelas análises histológicas e que a associação temperatura/exercício físico (saltos verticais) provoca alterações (danos) mais evidentes do que o uso de apenas uma das modalidades.

.

REFERÊNCIAS¹

ALTER, M. J. **Ciência da Flexibilidade**. 3º ed São Paulo: Artmed, 2010, cap .4, p. 50-71

ANDREWS, J. R.; HARRELSON, G. L.; WILK, K. E. **Reabilitação Física das Lesões Desportivas**. 3º ed. Elsevier, 2005, cap. 6, p.107-108.

BARBOSA, T. Introdução à Biomecânica. Disponível em:<<http://www.ipb.pt/~barbosa/biomecanica/introdução.htm>, 2004. Acesso em 15 Abr. 2001.

BENJAMIN, M.; TOUMI, H.; RALPHS, J. R.; BYDDER, G.; BEST, T. M.; MILZ S. Where tendons and ligaments meet bone: attachment sites (‘entheses’) in relation to exercise and/or mechanical load. **J Anat.** 208:471–490, 2006.

BENJAMIN, M.; RALPHS, J. R. The cell and development biology of tendons and ligaments. **Int. Rev Cytol**, v. 196, p. 85-130, 2000.

BERNARDES FILHO, R.; MATTOSO, L. H. C. Estudo de Polímeros por Microscopia de Força Atômica. Comunicado técnico. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA**. v. 53, 2003.

BIANCALANA, A. **Análise morfológica, biomecânica e bioquímica de tendão de ratos zucker (fa/fa) obesos**. Tese de Doutorado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 2009.

BLIGH, J. Temperature regulation in mammals and other vertebrates. In: Neuberger, A. and Tatum, E. L. Editors, **Frontiers of Biology**, North Holland, London, p. 436, 1973.

BIRK, D. E.; ZICBAND, E. I.; WOODRUF, S.; WINKELMANN, D. A.; TRELSTAD, R. L. Collagen fibrillogenesis in situ: fibril segments become long fibrils as the developing tendon matures. **Developmental Dynamics**, v. 208, p. 291-298, 1997.

BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo Patologia**. 8º ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2011, cap. 3, p. 52-110.

BRODSKY, B.; PERSIKOV, A. V. Molecular structure of the collagen triple helix. **Adv. Protein Chem**, v. 70, p. 301-339, 2005.

¹De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

CAIOZZO, V. J. Plasticity of skeletal muscle phenotype mechanical consequences. **Muscle & Nerves, New York**, v. 26, p. 740 – 768, 2002.

CALLISTER, W. D. Ciência e Engenharia dos Materiais: Uma Introdução, 5º ed., LTC, São Paulo, 2002.

CARAZZATO, J.G.; BARROS FILHO, T. E. P.; CAMARGO, O.P.; PÉCORA, J. R.; OLIVI, R.; SILVA, J. S. Estudo experimental da resistência muscular em condições normais e sob fadiga. **Revista Brasileira de Ortopedia**, Belo Horizonte, v.20, n.3, p.103 – 105, 1995.

CARVALHO, L. C.; POLIZELLO, J. C.; PADULA, N.; FREITAS, F. C.; SHIMANO, A. C.; MATTIELLO-SVERZUT, A. C. Propriedades mecânicas do gastrocnêmio eletroestimulado pós-imobilização. **Acta Ortopédica Brasileira**. [online]. v. 17, n.5, p. 269-272, 2009.

CARVALHO, C. M. M. **Efeitos da imobilização do exercício físico em algumas propriedades mecânicas do músculo esquelético**. Dissertação de Mestrado – Escola de Engenharia de São Carlos/Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo-USP, p. 59, 2001.

CORMACK, D. H. **Fundamentos de Histologia**, 2º ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2003, cap. 8, p. 141-142, 2003.

COVIZI, D. Z.; FELISBINO, S. L.; GOMES, L.; PIMENTEL, E. R.; CARVALHO, H. F. Regional adaptations in three rat tendons. **Tissue Cell**. 33:483–490, 2001.

CULAW, E. M.; CLARK, C. H.; MERRILEES, M. J. Connective tissue: Matrix composition and its relevance to physical therapy. **Physical Therapy**, v. 79, n. 3, p. 308-319, 1999.

CURWIN, S. L.; ROY, R. R.; VAILAS, A. C. Regional and age variations in growing tendon. **J. Morphol**, 221(3), p. 309-320, 1994a.

DAVIDSON, M. W.; ABRAMOWITZ, M. Optical microscopy. <http://microscopy.fsu.edu>. Acesso em: 17 Abr. 2005.

DAYAN, D.; HISS, Y.; HIRSBERG, A.; BUBIS, J. J.; WOLMAN, M. Are the polarization colors of Picro-Sirius Red – staining collagen determined only by the diameter of the fibers? **Histochemistry**. v. 93, p. 27-29, 1989.

DOHERTY, C. B.; DOHERTY, S. D.; ROSEN, T. Thermotherapy in dermatologic infections. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 62, p. 909-927, 2009.

PMid:20466169. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2009.09.055>

DRAPER, D. O.; KNIGHT, K.; FUJIWARA, T.; CASTEL, J. C. Temperature change in human muscle during and after pulsed short-wave diathermy. **Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy**, v. 29(1), p. 13-22, 1999. PMid:10100117.

DIXON, M. W. **Massagem miofascial**, 1º ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2007, cap. 3, p. 28-39.

DÖLKEN, M. **Fisioterapia em ortopedia**. Editora Santos, 2008, cap. 3 p. 70.

ENGLES, M. Tissue response. In Donatelli, R. A., Wooden, M. J. Orthopaedic Physical Therapy. 3º ed., **Churchill Livingstone**, Philadelphia, p. 1-24, 2001.

ENWEMEKA, C. S.; SPIEHOLZ, N. I.; NELSON, A. J. The effect of early functional activities on experimentally tendomized Achilles tendons in rats. **American Journal of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 67, n. 6, p. 264-269, 1988.

ESQUISATTO, M. A.; JOAZEIRO, P. P.; PIMENTEL, E. R.; GOMES, L. The effect of age on the structure and composition of rat tendon fibrocartilage. **Cell Biol Int.** 31:570–577, 2007.

FRATESCHI, M. E. B. J. M. **Efeitos da imobilização e remobilização em algumas propriedades mecânicas do osso**. Dissertação de Mestrado – Programa Interunidades em Bioengenharia EESC/FMRP/IQSC, Universidade de São Paulo – USP - Ribeirão Preto, 2002.

GARCIA, E. A. C. **Biofísica**, 1º ed. São Paulo, Sarvier. 2002, cap. 11, p.181-187.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de Histologia**, 2º ed, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2003, cap. 6, p. 89 – 104.

GOULD III, J. A. **Biomecânica básica na terapia esportiva e ortopédica**. In: 1º ed. Fisioterapia na ortopedia e na medicina do esporte. São Paulo, Manole. 1993, cap. 2, p. 65-83.

GUYTON, A. C., HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12º ed, Rio de Janeiro, Elsevier, 2006, cap 73, p. 913-924.

HALL, S. J. **Biomecânica Básica**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 2000, cap 2, p. 64-65

HARRIS, C. A.; PEDUTO, A. J. Achilles tendon imaging. **Australian Radiology**, v. 50, p. 513-525, 2006.

HARTEGERINK, P.; FESSELL, D. P.; JACOBSON, J. A.; van HOLSBEEK, M. T. Full-versus partial-thickness Achilles tendons tears: Sonographic accuracy and characterization in 26 cases with surgical correlation. **Radiology**. v. 220, p. 406-412, 2001.

HATTRUP, S.; JOHNSON, K. A review of rupture of Achilles tendon. **Foot Ankle**, v. 6, p. 34-38, 1995.

HAUNT, R. C.; LANCASTER, R. K.; DECAMP, C. E. Mechanical properties of the canine patellar tendon: some correlations with age and the content of collagen. **J. Biomech.** 25: 163-173, 1992.

HECHT, E. Óptica. Tradução e Prefácio: Rebordão, J. M. N. V. 2º Ed: **Fundação Calouste Gubelkain**, p. 282-346, 1991.

JAMES, H.; WANG, C. Mechanobiology of tendon - Review. **Journal of Biomechanics**, v. 39 1563–1582, 2006.

JÄRVINEN, T. A. H.; JOZSA, L.; KANNUS, P., JÄRVINEN, T. L.; JÄRVINEN, M. Organization and distribution of intramuscular connective tissue in normal and immobilized skeletal muscle. An immunohistochemical, polarization and scanning electron microscopic study. **J Muscle Res Cell Motil.** v. 23, n. 3, p. 245-254, 2002.

JOBLING, R.; D' SOUZA, R.; BAKER, N.; LARA-CORRALES, I.; MENDOZA-LONDONO, R.; DUPUIS, L.; SAVARIRAYAN, R.; AL-KOKKO, L.; KANNU, P. The collagenopathies, review of clinical phenotypes and molecular correlations. **Curr. Rheumatol. Rep.** 16(1): 394. 2014

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 11º ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2008, cap. 5, p. 92.

KHAN, K. M.; COOK, J. L.; KANNUS, P.; MAFULLI, N.; BONAR, S. F. Time to abandon the “tendinitis” myth. **British Medical Journal**, 324 (738), p. 626–627, 2002.

KANNUS, P. Structure of tendon connective tissue. **Scand J. Med. Sci. Sports**, v. 10, p. 312-320, 2000.

KARAA, S.; ZHANG, J.; YANG, F. A numerical study of a 3D bioheat transfer problem with different spatial heating. **Mathematics and Computers in Simulation**, v. 68, p. 375-388. 2005. <http://dx.doi.org/10.1016/j.matcom.2005.02.032>

KESLER, G.; KOREN, R.; KESLER, A.; KRISTT D.; GAL, R. Differences in histochemical characteristics of gingival collagen after ER:YAG laser periodontal plastic surgery. **J Clin Laser Med Surg**; v. 18, p. 203-207, 2000.

KILLIAN, M. L.; CAVINATTO, L.; GALATZ, M. L.; THOMOPOULOS, S. The role of mechanobiology in tendon healing. **J Shoulder Elbow Surg**, v. 21, p. 228-237, 2012.

KITCHEN, S. **Eletroterapia Baseada em Evidências**. Manole, 2003, cap. 6, p. 89-90.

KNIGHT, C. A.; RUTLEDGE, C. R.; COX, M. E.; ACOSTA, M.; HALL, S. J. Effect of superficial heat, deep heat, and active exercise warm-up on the extensibility of the plantar flexors. **Physical Therapy**, v. 81, n. 6, p. 1206-1214, 2001.

KODAMA, F. Y. Efeitos da imobilização, remobilização livre por meio de exercício físico nas propriedades mecânicas e histológicas do músculo de ratos de duas faixas etárias. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências e Tecnologia – FCT/UNESP, 2011.

LEITÃO, A.; LEITÃO, V. A. **Clínica de reabilitação**. São Paulo, Editora Atheneu, 1995, cap. 6, p. 353.

LEPPILAHTI, J.; ORAVA, S. Total Achilles tendon rupture. A review. **Sports Med**, v. 25, p. 79-100, 1998.

LIMA, S. C.; CAIERÃO, Q. M.; DURIGAN, J. L. Q. Curto período de imobilização provoca alterações morfométricas e mecânicas no músculo do rato. **Rev. Bras. Fisioter**, São Carlos, v. 11, n. 4, p. 297-302, 2007

LOW, J.; REED, A. **Eletroterapia explicada: princípios e prática** São Paulo, 3º ed, Manole, 2001, cap. 6, 187-228.

McCOMIS, G.; NAWOCZENSKI, D.; De HAVEN, K. Functional bracing for rupture of the Achilles tendon. Clinical results and analysis of ground-reaction forces and temporal data. **J Bone Joint Surg [Am]**, v. 79, p. 1799-1808, 1997.

MACHADO, C. M. **Eletroterapia Prática**. São Paulo: Com. E. Reprise, 1991, cap. 3, p. 79-98.

MAGGI, L.E.; OMENA, T. P.; VON KRUGER, M. A.; PEREIRA, W. C. A. Software didático para modelagem do padrão de aquecimento dos tecidos irradiados por ultra-som fisioterapêutico. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 12(3), p. 204-214, 2008. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-35552008000300008>

MAFULLI, N.; AJIS, A.; LONGO, U. G. Chronic rupture of tendo-Achilles. **Foot Ankle Clin**; v.12, p. 583–596, 2007.

MAGN USSON, S. P.; HANSEN, P.; KJAER, M. Tendon properties in relation to muscular activity and physical training. **Scand J. Med. Sci. Sports**, v. 13 (4) p. 211-223, 2003.

MALHEIRO, O. C. M.; GIACOMINI, C. T.; JUSTULIN JR, L. A.; DELELLA, F. K.; DAL-PAI-SILVA, M.; FELISBINO, S. L. Calcaneal tendon regions exhibit different MMP-2 activation after vertical jumping and treadmill running. **The Anatomical Record**, v. 292, p. 656–1662, 2009.

MATHEUS, J. P.; GOMIDE, L. B.; OLIVEIRA, J. G. B.; VOLPON, J. B.; SHIMANO, A. C. Efeito da estimulação elétrica neuro muscular durante a imobilização nas propriedades mecânicas do músculo esquelético. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 13, p. 55-59, 2007.

MATHEUS, J. P. C.; MILANI, J. G. P. O.; GOMIDE, L. B.; VOLPON, J. B. SHIMANO, A. C. Análise biomecânica dos efeitos da crioterapia no tratamento da lesão muscular aguda. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 14, n. 4, 2008a.

MOREAU, A. L. D. **Microscopia de força atômica em materiais biológicos: biossensores e nanoferramentas**. Tese de Doutorado, Instituto de Física “Gleb Wataghin” Universidade Estadual de Campinas, 2011.

MOURÃO Jr, C. A.; ABRAMOV, D. M. **Curso de biofísica**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 2009, cap 10, p. 218-234.

NADLER, A. F.; WEIGAND, K.; KRUSE, R. J. The Physiologic Basis and Clinical Applications of Cryotherapy and Thermotherapy for the Pain Practitioner. **Pain Physician**, v. 7, p. 395-399, 2004.

NAKAGAKI, W. R.; BIANCALANA, A.; BENEVIDE, J. P.; GOMES, L. Biomechanical and biochemical properties of chicken calcaneal tendon under effect of age nonforced active exercise. **Connect. Tissue Res**, v. 48, p. 219-228, 2007.

NARDY, J. A. Disponível em: <<http://www.rc.unesp.br/gce/petrologia/nardy/motipoext.html>> Acesso em: 23 Jul. 2006.

NORDIN, M.; FRANKEL, V. H. **Biomecânica básica do sistema músculo esquelético**. 3º ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 2003, cap. 4, p. 86-107.

O'BREIN M. The anatomy of the Achilles tendon. **Foot Ankle Clin**, v. 10, p. 225–238, 2005.

OKUYAMA, K; OKUYAMA, K; ARNOTT, S; TAKAYANAGI, M ; KAKUDO, M. Crystal and molecular structure of a collagen-like polypeptide (Pro-Pro-Gly). **Journal of Molecular Biology**, v.152, p.427, 1981.

OLIVEIRA, J. G. P. **Efeitos da imobilização e reabilitação aquática em propriedades mecânicas do músculo gastrocnêmio de ratas treinadas e sedentárias**. Dissertação de Mestrado – Programa Interunidades em Bioengenharia EESC/FMRP/IQSC, Universidade de São Paulo - São Carlos, 2005.

PAAVOLA, M. Achilles tendinopathy. **Journal of Bone and Joint Surgery**, Boston, v. 84-A, n. 11, p. 2062-2076, 2002.

PAIVA, A. O.; CLERICI, J. H.; COSTA, N.; FERNANDES, M. H. V. Evaluation of influence of albumin on the adhesion of bioactive layer by Atomic Force Microscopy. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, 2004.

PAJALA, A.; KANGAS, J.; OHTONEN, P.; LEPPILAHTI, J. Rerupture and deep infection following treatment of total Achilles tendon rupture. **The Journal of Bone and Joint Surg Am**, v.84-A (11), p. 2016-2021, 2002.

PARIZOTTO, N. A. **Ação do laser hélio-neônio sobre o processo de reparo tecidual: um estudo do colágeno por microscopia eletrônica de varredura, microscopia de varredura, microscopia de força atômica e espectroscopia por infravermelho**. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação, Universidade Estadual de Campinas, 1998.

PIEZ, K. A.; REDDI, A. H. Extracellular matrix biochemistry. In: Molecular and aggregate structures of collagens. **Elsevier**, New York, p. 1-40, 1984.

PESSAN, V. J. G. **Ensaio de flexão em três pontos nas faces anterior e posterior de fêmures de ratas, em duas fases diferentes de crescimento**. Dissertação de Mestrado-Programa Interunidades em Bioengenharia EESC/FMRP/IQSC, Universidade de São Paulo - USP - Ribeirão Preto, p. 42, 1996. .

PLAPER, P. G.; CAMANHO, G. L.; SALDIVA, P. H. N. Avaliação numérica das ondulações das fibras colágeno em ligamento patelar humano (tendão patelar). **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 36, n. 8, p. 317-321, 2001.

POLIZELLO, J. C.; CARVALHO, L. C.; FREITAS, F. C. Propriedades mecânicas do gastrocnêmio de ratas, imobilizado e posteriormente submetido a diferentes protocolos de alongamento. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 15, n.3, 2009.

RAIMOND, P. B. H.; TUCKWELL, D. S.; PLUMB, D. A. A novel and highly conserved collagen (pro α (XXVII)) with a unique expression pattern and unusual molecular characteristics establishes a new clade within the vertebrate fibrillar collagen family. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 33, p. 31067-31076, 2003.

RAMOS, R. S. Biomecânica conceito atual. **Revista Brasileira de Ortopedia**, Belo Horizonte, v. 14, n. 4, p. 141 – 143, 1979.

RILEY G. The pathogenesis of tendinopathy. **A molecular perspective. Rheumatology**, v. 43, p. 131-142, 2004. doi:10.1093/rheumatology/keg448

ROBERTSON, V.; WAR, W.; LOW, J.; REED, A.; Eletroterapia explicada: princípios e prática. **Elservier**. p. 287, 2009.

ROBERTSON, V.J.; WARD, A. R.; JUNG, P. The effect of heat on tissue extensibility: a comparison of deep and superficial heating. **Archives of Physical Medicine & Rehabilitation**, v. 86, p. 819-825, 2005. PMID:15827938.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.apmr.2004.07.353>

ROCHA, M. N. D. **Propriedades mecânicas do músculo esquelético de ratas wistar pós imobilização e exercício físico em esteira**. Dissertação de Mestrado – Programa Interunidades em Bioengenharia EESC/FMRP/IQSC, Universidade de São Paulo.- USP - São Carlos, 2006.

ROCHA, M. A. **Ensaio mecânico da região epifísio-metafisária: estudo experimental em fêmures de coelhos em crescimento**. Tese de Doutorado Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade São Paulo – USP – Ribeirão Preto, 1998.

ROGATTO, G. P.; OLIVEIRA, C. A. M.; FARIA M. C.; LUCIANO, E. Respostas metabólicas agudas de ratos wistar ao exercício intermitente de saltos. **Motriz**, v. 10, n.2, p. 61-66, 2004.

ROMANO, C. V. G.; BARBIERI, C. H.; MAZZER, N.; BATISTA, V. J. ; SHIMANO, A. C.; RONCAGLIA, F. B. O ultra-som terapêutico não aumentou as propriedades mecânicas de tendões flexores após reparo. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 18, n.1, pp. 10-14, 2010.

ROSSI, J. D. M. B. A.; LEIVAS, T. P; MORÉ, A. D. O.; CAMANHO, J. L.; MONTENEGRO, N. B.; MACHADO, J. W. R. Ligamento cruzado anterior e tendão patelar: estudo mecânico e correlações clínicas. **Revista Brasileira de Ortopedia**. v. 25, n. 6, 1990.

SARID, D.; Scanning Force Microscopy; With Application to Electric, Magnetic, and Atomic Forces - Oxford Series on Optical Sciences, **Oxford University Press, Oxford**, 1991.

SENE, G. L.; SHIMANO, A. C. PICADO, C. H. Recuperação mecânica muscular com laser. **Acta Ortop Bras**, v. 17, n. 2, p. 46-49, 2008.

SHIMANO, A. C.; SHIMANO, M. M. **Ensaio tecnológicos de materiais biológicos**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA, 2000, Florianópolis. Anais. Santa Catarina: Sociedade Brasileira de Engenharia Biomédica. p. 15 – 20, 2000.

SHRIVASTAVA, D.; VAUGHAN, J. T. A generic bioheat transfer thermal model for a perfused tissue. **Journal of Biomechanical Engineering**, v. 131(7), p. 1-12, 2009. PMID:19640142. PMCID:2737815. <http://dx.doi.org/10.1115/1.3127260>

SILVA, F. S.; FRANÇA, A. S.; PINOTTI, M. Simulação unidimensional da transferência de calor na articulação do joelho canino durante os processos de aquecimento e de resfriamento terapêuticos. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**, v. 27, n. 3, p. 163-174, 2011.

SILVER, F. H.; FREEMAN, J. W.; SEEHRA, G. P. Collagen selfassembly and the development of tendon mechanical properties. **Journal of Biomechanics**, v. 36, 1529–1553, 2003b.

SOUZA, S. A. **Ensaio mecânicos de materiais metálicos** 3º ed. São Paulo. Edgard Blücher, 1977, cap 2, 3-58.

SMITH, R. K.; BIRCH, H. L.; GOODMAN, S.; HEINEGARD, D.; GOODSHIP, A. E. The influence of ageing and exercise on tendon growth and degeneration–hypotheses for the initiation and prevention of strain-induced tendinopathies. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, cap. 133, p. 1039-1050, 2002. doi:10.1016/S1095-6433(02)00148-4

STRYER, L. **Bioquímica**. 4ºed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 1996, cap.4 p. 128.

THOMPSON, J.; BARAVARIAN, B. Acute and chronic Achilles tendon ruptures in athletes. **Clin Podiatr Med Surg.** 28, p. 117–135, 2011.

TROBEC, R.; STERK, M.; ALMAWERD, S.; VESELKO, M. Computer simulation of topical knee cooling. **Computers in Biology and Medicine**, v. 38, p.1076-1083, 2008. PMID:18823623. <http://dx.doi.org/10.1016/j.compbimed.2008.08.004>

VIDAL, B. C. Image analysis of the tendon helical superstructure using interference and polarized microscopy. **Micron**, in press, 2003

VIDAL, B. C. **Matrix extracelular**. In: VIDAL, B. C.; MELLO, M. L. S. *Biologia Celular*. Rio de Janeiro e São Paulo: Atheneu, 1987a, p. 273-304

VIDAL, B. C. **Métodos em Biologia Celular**. In: VIDAL, B. C.; MELLO, M. L. S. *Biologia Celular*. Rio de Janeiro e São Paulo: Atheneu, 1987b, p. 5-40.

VILARTA, R.; VIDAL, B. C. Anisotropic and biomechanical properties of tendons modified by exercise and denervation: Aggregation and macromolecular order in collagen bundles. **Matrix**, v. 9, p. 55-61, 1989.

VIIDIK, A. Tendons and ligaments In: Comper WD. *Extracellular matrix: Tissue function*, v. 1, p. 303-327, 1996.

WANG, J. H. C.; GUO, Q.; LI, B. Tendon biomechanics and mechanobiology—A Minireview of Basic Concepts and Recent Advancements. **Journal of Therapy**, v. 5, n. 2, p. 133-141, 2012.

WREN, T. A. L.; YERBY, S. A.; BEAUPRÉ, G. S.; CARTER, D. R. Mechanical properties of the human Achilles tendon. **Clinical Biomechanics**, v. 16, p. 122 - 129, 2001.

WRIGHT, N. T.; HUMPHREY, J. D. Denaturation of collagen via heating: An irreversible rate process. **Annu Rev. Biomed Eng**, v. 4, p. 109-128, 2002.

WANG, J. H. C.; GUO, Q.; LI, B. Tendon Biomechanics and Mechanobiology—A Minireview of Basic Concepts and Recent Advancements. **Journal of Therapy**, v. 5, n. 2, p. 133-141, 2012.

WOO, S. L.; LEE, T. Q.; ABRAMOWITCH, S. D.; GILBERT, T. W. Structure and function of ligaments and tendons. In: Mow VC, Huiskes R, editors. **Basic orthopaedic biomechanics and mechano-biology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 301-342, 2005.

WOO, S. L-Y; SMITH, B. A.; JOHNSON, G. A. Biomechanics of Knee ligaments. In: FU, F. H.; HARNER, C. D. Knee Surgery. 1^o ed. **Williams & Wilkins, Baltimore**, p. 155-187, 1994.

XU, Y.; MURREL, G. A. The basic science of tendinopathy. **Clin Orthop Relat Res**, 466, p.1528-1538, 2008. doi:10.1007/s11999-008-0286-4

YOUNG, B; HEATH, J. W. **Histologia Funcional**, 4^o ed, Gaunabara Koogan, Rio de Janeiro, 2001, cap 10, p. 192.

YUAN, J.; MURRELL, G. A. C.; WEI, A. Q; APPLEYARD, R. C.; P. DEL SOLDATO, P.; WANG, M. X. **Inflammation Research**, v. 52, p. 230–237, 2003.

ZHANG, W.; MOSKOWITZ, R. W.; NUKI, G.; ABRAMSON, S.; ALTMAN, R. D.; ARDEN N. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, Part II: OARSI evidence-based, expert consensus guidelines. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 16(2), p. 137-162, 2008. PMid:18279766. <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2007.12.013>

ANEXO A

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Relatório Final do trabalho intitulado "**Efeito sinérgico da associação/exercício aquecimento nas propriedades mecânicas e estruturas do tendão calcâneo**", Processo FOA nº 2011-02314, sob responsabilidade de Mário Jefferson Quirino Louzada e colaboração de Rubens dos Santos Rosa foi aprovado pela CEUA em 7 de abril de 2014.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Synergistic effect of the combination exercise/heat on the mechanical and structural properties of the Achilles tendon**", Protocol FOA nº 2011-02314, under the supervision of Mário Jefferson Quirino Louzada and collaboration of Rubens dos Santos Rosa Silva had its the Final Report approved by the CEUA on April 7, 2014.

Prof. Dr. Edilson Ervolino

Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br