



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

LETÍCIA PRADO DE OLIVEIRA

“EFEITO DO TRATAMENTO TÓPICO E POR VIA ORAL COM
SINVASTATINA NA CICATRIZAÇÃO DE RUPTURA DO
TENDÃO DE AQUILES”

“EFFECT OF TOPICAL AND ORAL TREATMENT WITH
SIMVASTATIN IN THE HEALING OF RUPTURE OF THE
ACHILLES TENDON”

CAMPINAS
2017

LETÍCIA PRADO DE OLIVEIRA

**“EFEITO DO TRATAMENTO TÓPICO E POR VIA ORAL COM
SINVASTATINA NA CICATRIZAÇÃO DE RUPTURA DO TENDÃO DE
AQUILES”**

**“EFFECT OF TOPICAL AND ORAL TREATMENT WITH
SIMVASTATIN IN THE HEALING OF RUPTURE OF THE ACHILLES
TENDON”**

*Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do título de
Doutora em Biologia Celular e Estrutural na Área
de Biologia Tecidual.*

*Thesis presented to the Institute of Biology of the
University of Campinas in partial fulfillment of the
requirements for the degree of PhD in Cell and
Structural Biology in the area of Tecidual Biology.*

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA
ALUNA LETÍCIA PRADO DE OLIVEIRA E
ORIENTADA PELO PROF. DR. EDSON ROSA
PIMENTEL.

Orientador: PROF. DR. EDSON ROSA PIMENTEL

**CAMPINAS
2017**

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2013/04071-0

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

OL4e Oliveira, Letícia Prado, 1988-
Efeito do tratamento tópico e por via oral com sinvastatina na cicatrização de ruptura do tendão de Aquiles / Letícia Prado de Oliveira. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

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

1. Matriz extracelular. 2. Inflamação. 3. Tenotomia. 4. Remodelação tecidual. 5. Sinvastatina. 6. Colágeno. I. Pimentel, Edson Rosa, 1949-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Effect of topical and oral treatment with simvastatin in the healing of rupture of the Achilles tendon

Palavras-chave em inglês:

Extracellular matrix

Inflammation

Tenotomy

Tissue remodeling

Simvastatin

Collagen

Área de concentração: Biologia Tecidual

Titulação: Doutora em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Edson Rosa Pimentel [Orientador]

Aline Mara dos Santos

Evanisi Teresa Palomari

Gláucia Maria Tech dos Santos

Tatiana Carla Tomiosso

Data de defesa: 10-07-2017

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 10 de julho de 2017

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel

Profa. Dra. Aline Mara dos Santos

Profa. Dra. Evanisi Teresa Palomari

Profa. Dra. Gláucia Maria Tech dos Santos

Profa. Dra. Tatiana Carla Tomiosso

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

*Dedico este trabalho a Deus e a Nossa Senhora
Desatadora dos Nós que sempre me guiaram e
iluminaram meus caminhos, principalmente nos
momentos mais difíceis e desafiadores que vivi durante
meu doutorado.*

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não seria possível sem a ajuda e presença de muitas pessoas por isso, tenho muito a agradecer,

Primeiramente a Deus pelo dom da vida, pela fé, por possibilitar que eu esteja concluindo meu doutorado.

A minha família que sempre me apoiou e soube entender minha ausência em tantos momentos.

Ao meu namorado Caio Vidotto que sempre me apoiou e me ajudou durante o desenvolvimento da tese. Obrigada por seu amor, companheirismo e amizade!

Ao meu querido amigo e “*roommate*” Cristiano Pedrozo Vieira pela amizade fiel, cumplicidade, companheirismo e por tantos bons momentos que vivemos juntos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel por ter me conduzido desde o mestrado até o doutorado com calma, serenidade e profissionalismo.

Ao técnico Francisco Ângelo Mallatesta por seu apoio durante a realização dos experimentos

Aos colaboradores, sem os quais este trabalho não seria possível.

Aos membros da banca pela atenção, disponibilidade e por aceitarem o convite.

Ao Programa de Pós-graduação de Biologia Celular e Estrutural.

À secretária do programa de pós-graduação, Líliam Alves Senne Panagio pela competência, agilidade e disposição para ajudar em todos os momentos.

À FAPESP pela bolsa de doutorado concedida ao longo deste trabalho.

A todos que de uma maneira ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Considerando que o tratamento com estatinas é favorável em vários tipos de lesões, este trabalho investigou a influência da administração por via oral e da aplicação local de sinvastatina no tendão de Aquiles após lesão. Ratos Wistar foram tratados durante 7 e 21 dias após a tenotomia parcial e divididos nos seguintes grupos: N tendão intacto; L₇ e L₂₁ tendão lesionado; SL₇ e SL₂₁ tendão lesionado tratado com administração local de esponja de colágeno embebida com solução de sinvastatina (2,2 mg/50µl); VL₇ e VL₂₁ tendão lesionado com administração local de esponja de colágeno embebida com solução aquosa de carboximetilcelulose a 0,5% como veículo; SO₇ e SO₂₁ tendão lesionado tratado com sinvastatina por via oral; VO₇ e VO₂₁ tendão lesionado tratado com carboximetilcelulose 0,5% por via oral. Foi realizado ELISA para interleucina 1 beta (IL-1β) 24h após a lesão e fator de transformação do crescimento beta (TGF-β). As análises funcionais foram realizadas pelo sistema de Catwalk. Para as análises bioquímicas foi realizada zimografia para metaloproteinases 2 e 9 (MMP-2 e MMP -9), western blotting para decorin, colágeno I e III e dosagem de glicosaminoglicanos (GAGs). Para as análises morfológicas, cortes de tendões foram corados com azul de toluidina (AT) e a organização dos feixes de colágeno foi analisada através da birrefringência. Para observar a ultraestrutura, os tendões foram analisados através de microscopia eletrônica de transmissão. O grupo tratado com sinvastatina por via oral exibiu menores concentrações de IL-1β 24h após a lesão. O grupo SO₇ apresentou redução de TGF-β comparado ao grupo VO₇. A marcha dos animais foi melhor nos grupos SO₇ e SO₂₁. Todos os grupos analisados em 7 e 21 dias apresentaram uma redução de colágenos I e III em relação ao grupo normal. Houve um aumento da MMP-2 ativa nos grupos L₇, VL₇, VO₇, SO₇ e nos grupos L₂₁ e SO₂₁. Ambas as isoformas de MMP-9 nos grupos SO₇ e SO₂₁ apresentaram valores semelhantes grupo normal. As fibras de colágeno do grupo SO₂₁ exibiram uma melhor organização e compactação quando comparados com os demais grupos lesionados neste mesmo período. Nossos resultados sugerem que o tratamento por via oral com sinvastatina foi benéfico na recuperação da marcha dos animais, na organização das fibras de colágeno e, além disso, parece exercer modulação de IL-1β, TGF-β e da atividade de MMPs durante a cicatrização do tendão. Sendo assim, é possível que a sinvastatina administrada por via oral seja empregada como terapia após uma ruptura de tendão.

ABSTRACT

Treatment with statins has a positive effect on the healing of injuries of many different types of tissue. In this context, the present study investigated the relative benefits of the oral administration and local application of simvastatin to the Achilles tendon following partial tenotomy. Wistar rats were treated for 7 and 21 days after partial tenotomy, and were assigned to the following groups: N (intact tendon), L₇ and L₂₁ injured tendon (no treatment); SL₇ and SL₂₁ injured tendon treated with local application of a collagen sponge soaked in simvastatin (2.2 mg/50 µl); VL₇ and VL₂₁ injured tendon treated with local application of a collagen sponge soaked in an aqueous solution of 0.5% carboxymethylcellulose (CMC) as vehicle; SO₇ and SO₂₁ injured tendon treated by oral administration of simvastatin; VO₇ and VO₂₁ injured tendon treated by oral administration of 0.5% CMC. The interleukin 1 beta (IL-1β) and transforming growth factor beta (TGF-β) were analysed by ELISA. Functional analyses were run in the Catwalk system. The biochemical analyses were zymography for metalloproteases 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9), western blotting for decorin, collagen I and III, and the dosage of glycosaminoglycans (GAGs). In the morphological analyses, sections of the tendon were stained with toluidine blue (TB), and the organization of the collagen bundles was analyzed by birefringence. For observing the ultrastructure, the tendons were analyzed by transmission electron microscopy. The group treated orally with simvastatin presented a lower concentration of IL-1β one day after the lesion. The SO₇ group presented a reduction of TGF-β in comparison with VO₇. The gait of the animals was better in the SO₇ and SO₂₁ groups. All the groups analyzed at 7 and 21 days presented a reduction of collagen (types I and III) in relation to the normal group. There was an increase in the active MMP-2 isoform in the L₇, VL₇, VO₇, SO₇ groups, and in the L₂₁ and SO₂₁ groups. In the SO₇ and SO₂₁ groups, the values recorded for both MMP-9 isoforms were similar to those of the normal group. In addition, the collagen fibrils and fibers in the SO₂₁ group were better organized in comparison with the other injured groups after the same period of time. Our results indicate that oral treatment with simvastatin was beneficial for the recovery of the gait of the animals and the organization of the collagen fibers. Oral treatment with statins also appears to have a modulating effect on IL-1β, TGF-β and the activity of the MMPs during tendon healing. While further research is necessary, the oral administration of simvastatin appears to be a potentially useful treatment for tendon injuries.

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	7
1. INTRODUÇÃO	11
1.1 Anatomia do tendão de Aquiles	11
1.2 Estrutura do tendão	12
1.3 Componentes celulares do tendão e matriz extracelular	14
1.4 Lesão e reparo do tendão	16
1.5 Estatinas	18
1.5.1 Farmacologia	18
1.5.2 Efeitos pleiotrópicos	19
2. OBJETIVOS GERAIS	21
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1 Animais	22
3.2 Procedimentos para a transecção parcial do tendão de Aquiles	22
3.3 Grupos Experimentais	22
3.5 Análise bioquímica	24
3.5.1 Extração da Matriz Extracelular	24
3.5.4 ELISA para IL-1 β e TGF- β	25
3.5.5 Zimografia	25
3.5.2 Dosagem GAGs	26
3.5.3 Western Blot para decorin e colágenos I e III	26
3.4 Análise Morfológica	27
3.4.1 Análise em Microscopia de luz	27
3.4.2 Análise ultraestrutural em microscopia eletrônica de transmissão	27
3.6 Análise Funcional	28
3.6.1 Avaliação da pressão exercida pela pata dos ratos	28
3.7 Análises estatísticas	28
4. RESULTADOS	29
4.1 Perfil de IL-1 β e TGF- β	29
4.2. Atividade de MMP-2 e MMP-9	30
4.3 Perfil de GAGs, decorin e aspecto morfológico do tendão	32
4.4 Presença e organização de colágeno	36
4.5 Análise funcional	39
5. DISCUSSÃO	41

6. CONCLUSÕES.....	46
7. REFERÊNCIAS	47

1. INTRODUÇÃO

Apesar de ser o tendão mais forte e resistente do organismo, o tendão de Aquiles também é o mais acometido por rupturas (ROSENZWEIG; AZAR, 2009), que ocorrem em uma área pouco vascularizada, localizada 2 a 5 centímetros acima de sua inserção (O'BRIEN, 2005). Frequentemente este tipo de lesão ocorre durante atividades físicas extenuantes, mas fatores relacionados ao envelhecimento, mudanças estruturais, bioquímicas e biomecânicas podem desempenhar um papel significativo (KADER *et al.*, 2005).

Com o avanço da idade, os tendões gradualmente perdem sua elasticidade e resistência. Em idosos e indivíduos que não se exercitam regularmente, há perda de água, proteoglicanos, glicoproteínas, elastina, além de um retardo da atividade de tenócitos o que pode causar um desequilíbrio na matriz do tendão e predispor rupturas (HAYEM, 2001). A ruptura do tendão de Aquiles tem uma maior prevalência entre homens (MOVIN *et al.*, 2005). Além disso, com grande parte da população geral participando de atividades físicas, as injúrias em tendões têm aumentado, apresentando alta morbidade (JAMES *et al.*, 2008).

As lesões no tendão podem ser incapacitantes, gerando dor, perda da produtividade no trabalho, além de necessitar de tratamentos dispendiosos (THOMOPOULOS *et al.*, 2015). O reparo do tendão é um processo lento e complicado, resultando em um tecido com biomecânica inferior ao tecido saudável (JAMES *et al.*, 2008). Por esse motivo, pesquisadores investigam diversos tratamentos visando acelerar o processo de reparo, de forma que o tendão recupere sua integridade mecânica e também a homeostase de sua matriz extracelular.

Nos últimos anos, estudos realizados com estatinas têm demonstrado benefícios na recuperação de fraturas, aumentando a área do calo ósseo e a resistência biomecânica (SKOGLUND; ASPENBERG, 2007; WANG *et al.*, 2007). Há também relatos positivos do uso de estatinas na cicatrização de feridas, evidenciando seu efeito anti-inflamatório, imunomodulatório e angiogênico (REGO *et al.*, 2007; TOKER *et al.*, 2009; STOJADINOVIC *et al.*, 2010). Entretanto, existem poucos dados a respeito do uso de estatinas como agentes terapêuticos no reparo de tendões.

1.1 Anatomia do tendão de Aquiles

O tendão de Aquiles (Figura 1) é constituído pela fusão das aponeuroses dos músculos gastrocnêmio (cabeça medial e lateral) e sóleo que formam a parte posterior da perna

(panturrilha), possui ponto de inserção no osso calcâneo e ocupa o terço inferior da perna (JUNGE, *et al.*, 1987).



Figura 1. Esquema da anatomia do tendão de Aquiles. Fonte: <http://clinicaecirurgiadope.com.br/artigos/23>

A região de inserção do tendão com o osso é chamada de junção osteotendínea e é caracterizada por uma transição gradual de tecido fibrocartilagenoso a ósseo lamelar. Em contrapartida, área de conexão entre o tendão e o músculo é denominada junção musculotendínea, sendo que durante a transmissão da força de contração do músculo para o tendão esta região é submetida a um grande estresse mecânico (O'BRIEN, 2005).

O suprimento de sangue para o tendão se dá pela junção musculotendínea onde os vasos do perímio ficam contínuos com os fascículos do tendão (SHARMA; MAFFULLI, 2005); e pela junção osteotendínea e fica limitada no ponto de inserção do tendão (KADER *et al.*, 2005; KANNUS, 2000).

1.2 Estrutura do tendão

O colágeno tipo I é o componente fibroso mais abundante no tendão. Em menor proporção há também o colágeno tipo III que está presente no endotendão e no epitendão (KANNUS, 2000).

O colágeno está organizado em níveis crescentes de complexidade (Figura 2) começando a partir do tropocolágeno, uma molécula em fita tripla helicoidal que se polimeriza para formar as fibrilas de colágeno que por sua vez vão se agregar e formar fibras de colágeno, visíveis ao microscópio de luz (SHARMA; MAFFULLI, 2005).

As fibras de colágeno são agrupadas em feixes e circundadas por uma bainha de tecido conjuntivo frouxo, denominada endotendão que é contínuo com o epitendão, sendo que este constitui a camada mais externa do tendão. O endotendão é composto por fibras de colágeno do tipo III que proporciona via de acesso para nervos, vasos sanguíneos e vasos linfáticos importante no aporte de nutrientes para os tenócitos. Cada feixe de fibras de colágeno circundado pelo endotendão recebe o nome de fascículo que é a unidade funcional básica do tendão (KANNUS, 2000).

Os fascículos são revestidos pelo epitendão que contém fibras elásticas e colágenas arranjadas irregularmente (RAISER, 2001). Este por sua vez, é revestido pelo paratendão que possui duas camadas: uma em contato direto com o epitendão e outra superficial. Entre o epitendão e o paratendão encontra-se uma fina camada de fluido para permitir o movimento do tendão com redução da fricção (KADER *et al.*, 2005).

O arranjo do endotendão, epitendão e paratendão proporciona mínima resistência ao movimento de deslizamento através dos tecidos adjacentes e é necessário que seja preservado a fim de manter a função do tendão (RAISER, 2001).

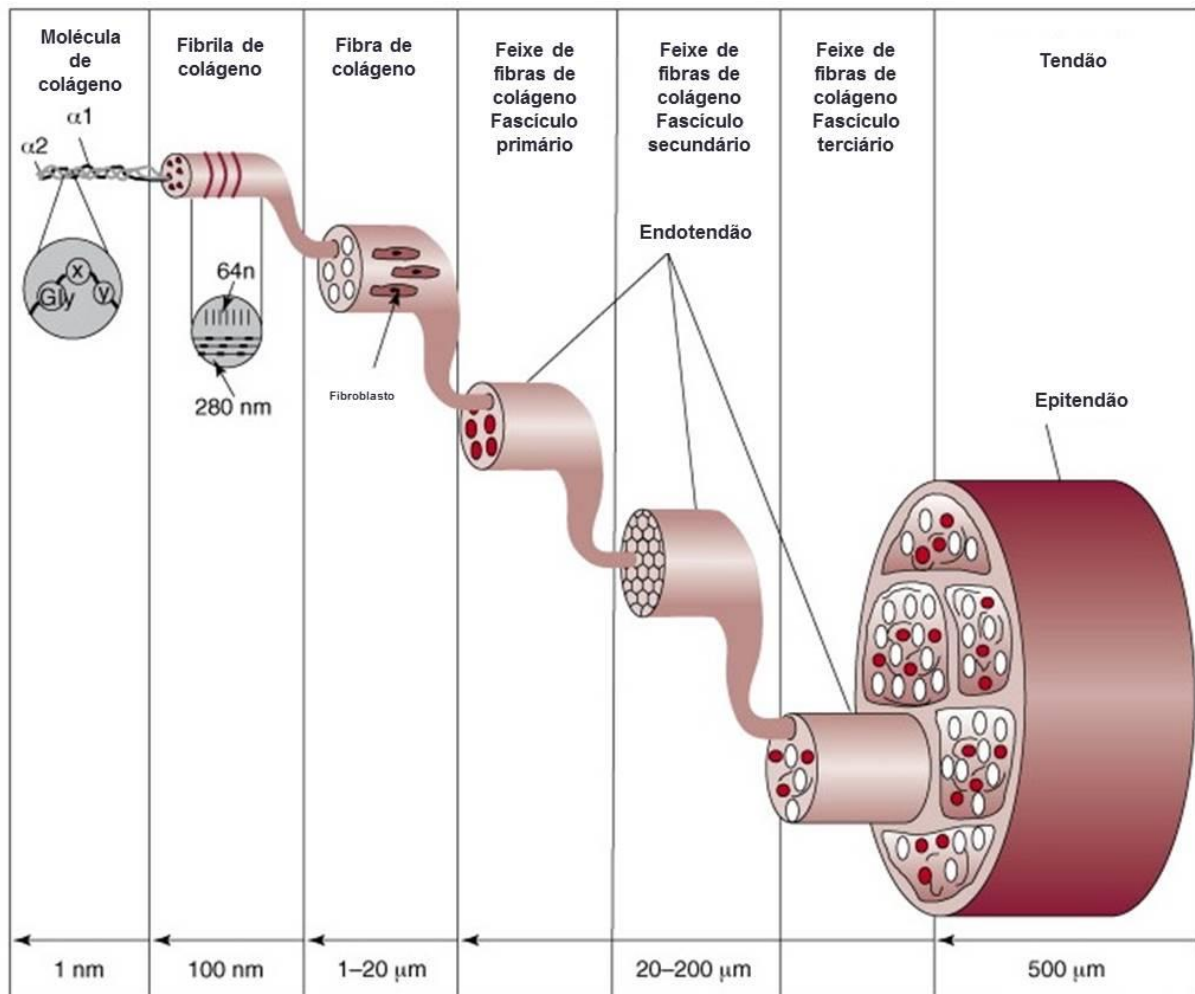


Figura 2. Estrutura hierárquica do tendão. Modificado de LIU *et al.*, 2008.

1.3 Componentes celulares do tendão e matriz extracelular

Os elementos celulares do tendão são os tenoblastos, que possuem numerosas organelas citoplasmáticas e maior atividade metabólica, e tenócitos, que são células mais maduras e com uma atividade metabólica reduzida (SHARMA; MAFFULLI, 2005). Estas células são finas e fusiformes, orientadas longitudinalmente entre as fibras de colágeno, desempenham o papel fundamental de manter a matriz extracelular e sintetizar o colágeno que constitui a unidade estrutural básica do tendão (RAISER, 2001).

A matriz extracelular que constitui o tendão possui dois componentes principais: os elementos fibrosos: principalmente colágenos tipos I e III e elastina que confere estabilidade e elasticidade aos tendões (KANNUS, 2000); e a substância amorfa que é um meio de difusão de nutrientes e gases consistindo de GAGs, proteoglicanos como decorin e agregam, glicoproteínas estruturais e água que corresponde em torno de 55% do peso do tendão e é responsável por facilitar o deslizamento e reduzir o atrito entre as fibras de colágeno (JAMES

et al., 2008). Os proteoglicanos são formados por um esqueleto proteico covalentemente ligado a uma ou mais cadeias de GAGs e ao interagirem com moléculas de água formam uma estrutura tipo gel, agindo como um material de adesão entre as microfibrilas de colágeno (DAHLGREN, 2007).

O componente fibroso mais importante do tendão é o colágeno tipo I (JAMES *et al.*, 2008). Uma molécula de colágeno é longa, rígida e apresenta uma fita tripla helicoidal, onde três cadeias polipeptídicas de colágeno, duas cadeias α -1 e uma cadeia α -2, estão enroladas entre si (O'BRIEN, 2005). Cada cadeia possui uma sequência de aminoácido de glicina Gly-X-Y, onde as posições X e Y geralmente são ocupadas por prolina e hidroxiprolina respectivamente. A glicina, por ser o menor aminoácido, é o único capaz de ocupar a posição axial da tripla hélice, de modo que qualquer outro aminoácido acarretará desorganização da estrutura helicoidal (PIEZ; REDDI, 1984).

Em um tendão normal há equilíbrio entre processos anabólicos e catabólicos. Para a manutenção da homeostasia da matriz extracelular dos tendões existem dois grupos importantes de enzimas: metaloproteinases (MMPs) e inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) (DAHLGREN, 2007). MMPs são enzimas proteolíticas, secretadas na forma de pró-enzimas, ativadas no meio extracelular, dependentes de zinco para sua ação. De acordo com o tipo de substrato, existem quatro grupos em que as MMPs estão distribuídas: collagenases (MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-18) que degradam colágeno fibrilar; gelatinases (MMP-2 e MMP-9) que degradam fragmentos de colágeno; estromelisinases (MMP-3, MMP-10, MMP-11) que têm como seu substrato proteoglicanos, fibronectina e colágeno III, IV e V; e metaloproteinases tipo membrana (MT-MMPs) (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24, MMP-25) que são enzimas ligadas na membrana plasmática de células e estão envolvidas principalmente no processo de migração celular (MAGRA; MAFULLI, 2005).

A atividade das MMPs é altamente controlada por clivagem extracelular da pró-enzima e inibição da enzima ativa pela TIMPs, que apresentam a capacidade de ligarem-se ao sítio ativo das MMPs, inativando-as. Sendo assim, o equilíbrio entre a atividade de MMPs e TIMPs é fundamental para garantir um processo de remodelamento eficaz e também para preservar a integridade da matriz extracelular (RILEY *et al.*, 2002).

1.4 Lesão e reparo do tendão

A etiologia da ruptura do tendão de Aquiles é exaustivamente pesquisada, mas os mecanismos exatos ainda permanecem desconhecidos (KADER *et al.*, 2005). A cicatrização do tendão é um processo lento, que leva de muitas semanas a vários meses (JAMES *et al.*, 2008). Apesar de remodelamento intensivo durante os meses seguintes à lesão, a regeneração completa do tendão nunca é alcançada (MAFFULLI; MOLLER, 2005).

Após uma lesão aguda, inicia-se o processo de reparo, o qual passa por três fases distintas, denominadas fases inflamatória, proliferativa e de remodelamento que pode durar muitos meses (HOPE; SAXBY, 2007; THOMOPOULOS *et al.*, 2015). A fase inflamatória dura de 4 a 7 dias. As células inflamatórias migram para o sítio da lesão dentro de horas após o trauma (PLATT, 2005). Esta fase é caracterizada por infiltrados de eritrócitos, neutrófilos, macrófagos e plaquetas. Fatores vasoativos e quimiotáticos são liberados, aumentando a permeabilidade vascular, dando início a angiogênese além de recrutar mais células inflamatórias e estimular a proliferação de tenócitos (SHARMA; MAFFULLI, 2005). A rede de capilares é reestabelecida no local da reparação a fim de aumentar a irrigação no sítio da lesão, visto que a síntese de colágeno é um processo altamente dependente de oxigênio (HOPE; SAXBY, 2007).

A fase proliferativa ocorre entre o 7º e o 14º dia (PLATT, 2005). Esta fase de reparo é caracterizada por atividade sintética profusa. Os tenócitos depositam uma matriz temporária, mecanicamente inferior, composta principalmente de colágeno III (VOLETI *et al.*, 2012). Durante este período, proteínas não colagênicas e proteoglicanos também são sintetizados em altas taxas (HOPE; SAXBY, 2007).

A fase de remodelamento acontece a partir do 14º dia, se prolonga por algumas semanas e é caracterizada por um alinhamento, orientação e organização das fibrilas de colágeno (THOMOPOULOS *et al.*, 2015). O colágeno do tipo III é substituído por colágeno do tipo I com mais cross-links e maior resistência à tração. Ainda nesta fase, o tecido anteriormente com uma maior proporção de células, é substituído por um tecido predominantemente fibroso (JAMES *et al.*, 2008). A fase final de remodelamento é a maturação onde há um declínio gradual da vascularização do tendão e também da atividade sintética dos tenócitos. Ao mesmo tempo, ocorre um aumento constante da espessura dos feixes de colágeno, entretanto, vale ressaltar que as propriedades biomecânicas não são totalmente recuperadas (HOPE; SAXBY, 2007; VOLETI *et al.*, 2012).

As MMPs são importantes reguladores do remodelamento da matriz extracelular (SHARMA; MAFFULLI, 2005). Durante o processo de reparo do tendão, há um aumento da atividade de MMPs que está relacionado com a degradação de colágeno desnaturado. Várias enzimas compõe o grupo das MMPs, sendo que a MMP-9 e MMP-13 apenas participam da degradação de colágeno, enquanto que a MMP-2, MMP-3 e MMP-14 participam da degradação e remodelamento do colágeno (RILEY *et al.*, 2002).

Uma lesão no tendão desencadeia uma resposta inflamatória no local, envolvendo a indução de muitas citocinas e fatores de crescimento. A interleucina 1-beta (IL-1 β) é uma citocina pró-inflamatória que tem sido implicada na dor e inflamação, seus níveis estão aumentados principalmente nos primeiros dias após uma lesão no tendão. IL-1 β estimula mediadores inflamatórios como cicloxigenase, prostaglandinas e diversas MMPs, além de inibir a produção de colágeno I, o que pode acelerar a degradação da matriz extracelular, fazendo com que ocorra uma perda na resistência do tendão. (JAMES *et al.*, 2008; SCHULZE-TANZIL *et al.*, 2011; KILLIAN *et al.*, 2012)

O fator de transformação do crescimento beta (TGF-beta) desempenha papéis importantes na cicatrização do tendão, estimulando a produção de matriz extracelular, incluindo aumento na produção de colágeno I e III. É ativo também durante a inflamação e tem uma variedade de efeitos, incluindo a regulação da migração e proliferação celular, também tem sido implicado na patogênese da formação excessiva de cicatrizes. Existem três isoformas de TGF- β (TGF- β 1, - β 2, - β 3) são secretadas como precursores latentes inativos que requerem ativação antes da ligação aos receptores de TGF- β (CHANG *et al.*, 2000; DOCHEVA *et al.*, 2015).

O reparo do tendão pode ainda vir acompanhado por complicações como adesões e fibrose. A adesão é o principal problema clínico e ocorre quando há uma perturbação na bainha sinovial na hora da injúria ou no momento da cirurgia, facilitando a invasão do sítio da lesão por células do tecido ao redor (SHARMA; MAFFULLI, 2005). Consequentemente, é observada uma incapacidade funcional, devido à perda do mecanismo de deslizamento. Para prevenir a formação de aderências várias modalidades de tratamento têm sido exploradas, tais como a modulação da resposta inflamatória, emprego de fatores de crescimento que promovem a cicatrização, agentes farmacológicos e a introdução de barreiras mecânicas entre o tendão e o tecido de proliferação (VOLETI *et al.*, 2012).

Considerando todos os eventos que ocorrem após uma lesão no tendão, a dificuldade na recuperação e as complicações que podem ocorrer durante este processo, se faz necessário

buscar terapias mais efetivas que contribuam para o sucesso do reparo do tendão. Em nosso grupo de pesquisa já são realizados diversos estudos que visam promover uma cicatrização mais efetiva de tendões lesionados, utilizando extratos de plantas, acupuntura, aplicação de laser de baixa frequência (ALMEIDA *et al.*, 2012; ARO *et al.*, 2013, 2015; GUERRA *et al.*, 2013, 2014). No presente trabalho foi testado o uso de sinvastatina durante a cicatrização do tendão.

1.5 Estatinas

1.5.1 Farmacologia

As estatinas são uma classe de medicamentos prescritos para redução de LDL-colesterol, do inglês *Low Density Lipoproteins* que significa lipoproteínas de baixa densidade. Os níveis plasmáticos elevados de LDL-colesterol são extremamente prejudiciais e aumentam potencialmente o risco de infarto. Neste sentido, as estatinas demonstraram reduzir a morbidade e mortalidade em pacientes com doenças cardiovasculares (SCHACHTER, 2004).

As estatinas atuam através de inibição enzimática na via de síntese do colesterol. A 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA redutase) é uma enzima que catalisa a conversão da HMG-CoA a ácido mevalônico, precursor do colesterol. Por atuar na via de biosíntese do colesterol, a HMG-CoA redutase é alvo para a intervenção farmacológica com as estatinas. Em nível celular, portanto, as estatinas inibem a conversão da HMG-CoA para mevalonato e como consequência, a síntese celular do colesterol. (MAGALHÃES, 2005)

Devido à redução do colesterol intracelular há um estímulo na membrana celular para a produção de LDL-receptores. Com o aumento do número de receptores de LDL vai haver uma maior capacidade, por parte das células, de captarem o LDL circulante e consequentemente, de baixar os seus níveis plasmáticos (BERSOT, 2012).

Atualmente, sete estatinas estão aprovadas para uso clínico: atorvastatina, fluvastatina, lovastatina, pitavastatina, pravastatina, rosuvastatina e sinvastatina. A lovastatina e sinvastatina são administradas como pró-fármacos e, são hidrolisadas no fígado, sendo convertida a forma hidroxiácida que possui atividade farmacológica. As demais estatinas são administradas na sua forma ativa (CAMPO; CARVALHO, 2007).

Mesmo sendo medicamentos bastante eficazes eles apresentam alguns efeitos adversos. Os mais frequentes (1 a 3% dos pacientes) são: dores abdominais, náuseas, dispepsia, cefaléias dentre outros. Outros efeitos esporádicos são exantemas, reações de

hipersensibilidade, perturbações do sono, trombocitopenia, leucopenia. Entretanto, efeitos adversos mais graves podem ocorrer eventualmente e compreendem hepatotoxicidade e miopatias que podem ser assintomáticas.

Embora a incidência de miopatias seja muito baixa (cerca de 0,01%) ela aumenta proporcionalmente com as concentrações plasmáticas de estatinas (OMAR *et al.*, 2001). Mais raramente uma elevação extrema de CPK (creatina fosfoquinase) pode ocorrer e estar associada à rabdomiólise e à insuficiência renal (OMAR *et al.*, 2001; GOODMAN; GILMAN, 2006).

No Brasil a sinvastatina (Figura 3) está elencada entre os medicamentos da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (BRASIL, 2015), é parcialmente subsidiada pelo governo e tem um custo bem pequeno para os usuários do Programa Farmácia Popular do Brasil (BRASIL, 2016). Em alguns municípios, a sinvastatina é fornecida de maneira totalmente gratuita. Sendo assim, estas políticas públicas facilitam o acesso de toda população a este medicamento.

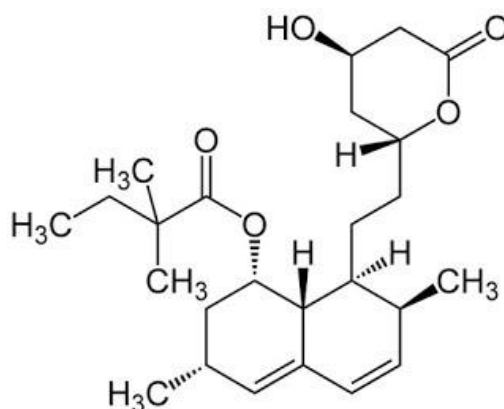


Figura 3. Estrutura molecular da sinvastatina. POLONINI *et al.*, 2010

1.5.2 Efeitos pleiotrópicos

Estudos têm demonstrado e tornado evidente que muitos dos benefícios clínicos associados com as estatinas são independentes da redução dos níveis de LDL-colesterol (SUKHOVA *et al.*, 2002; SCHONBECK ; LIBBY, 2004; GOTTO ; FARMER, 2003). Esses efeitos, ditos pleiotrópicos, têm sido estudados visando uma possível utilização destes fármacos no tratamento de outras patologias (LIAO ; LAUFS, 2005) como hipertensão arterial, (YANG *et al.*, 2005), doença de Alzheimer (CAMPO ; CARVALHO, 2007), na

sepsis (GIUSTI-PAIVA *et al.*, 2004), osteoporose (JADHAV ; JAIN, 2006), cicatrização de feridas (REGO *et al.*, 2007; TOKER *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2015) e recuperação de fraturas ósseas (SKOGLUND ; ASPENBERG, 2007; WANG *et al.*, 2007; ISSA *et al.*, 2015).

Muitos pesquisadores ainda têm voltado sua atenção para o efeito antiinflamatório das estatinas tanto em modelos *in vitro* quanto *in vivo* (JAIN ; RIDKER, 2005). Há várias propostas de mecanismos pelos quais as estatinas desempenham este papel, diminuindo a secreção de citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-8, TNF- α , inibindo a expressão de moléculas de adesão (MACH, 2002; JOWKAR ; NAMAZI, 2010; SUZUKI-BANHESSE *et al.*, 2015), diminuindo IFN- γ induzido por MHC-II que por sua vez, desencadeia uma menor ativação de células T (JAIN ; RIDKER, 2005). Na cicatrização de feridas além de exercer efeitos antiinflamatórios, imunomodulatórios e antibacterianos (WANG *et al.*; 2015), as estatinas desempenham um papel importante na angiogênese aumentando a secreção de fator de crescimento endotelial vascular (JOWKAR ; NAMAZI, 2010) e também promovem maior epitelização (STOJADINOVIC *et al.*, 2010).

No estudo do tratamento com estatinas em fratura óssea, estes agentes promoveram proliferação de osteoblastos, estimularam a formação de osso, melhorando o processo de reparo, modulando de maneira positiva o reparo de fraturas, e beneficiando a regeneração óssea (SKOGLUND *et al.*, 2002; SARAF *et al.*, 2007; SKOGLUND ; ASPENBERG, 2007; WANG *et al.*, 2007; SHAH *et al.*, 2015), além de aumentar a resistência biomecânica em vista de animais que não receberam tratamento (SKOGLUND ; ASPENBERG, 2007).

Em face da diversidade de efeitos benéficos das estatinas, alguns pesquisadores estudam o papel destes medicamentos no reparo de tendões e ligamentos (ESENKAYA *et al.*, 2010; ESENKAYA ; UNAY, 2011; OKA *et al.*, 2013; DOLKART *et al.*, 2014). Em um destes estudos foi observado que a atorvastatina pode influenciar positivamente a cicatrização do tendão através do estímulo da proliferação, migração e adesão de tenócitos pelo aumento da atividade da ciclooxigenase 2 (DOLKART *et al.*, 2014). Outro estudo sugere que a administração local de sinvastatina promove recuperação do ligamento através do aumento da angiogênese e osteogênese na fase inicial da inflamação (OKA *et al.*, 2013). Sendo assim, neste estudo, será avaliada a administração oral e local de sinvastatina na cicatrização do tendão de Aquiles de ratos.

2. OBJETIVOS GERAIS

O presente estudo tem como objetivo verificar alterações morfológicas e bioquímicas após tratamento local e via oral com sinvastatina na cicatrização tendão de Aquiles de ratos após ruptura parcial.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a eficácia do tratamento local e via oral com sinvastatina em lesões de ruptura parcial em tendão de Aquiles;
2. Quantificar IL-1 β e TGF- β de tendões dos grupos experimentais;
3. Detectar a presença e a atividade de MMP-2 e MMP-9;
4. Analisar o perfil de GAGs e decorin;
5. Quantificar colágenos I e III no tendão de animais dos diferentes grupos;
6. Analisar a organização estrutural e ultraestrutural dos feixes de colágeno de tendões parcialmente transeccionados em resposta ao tratamento com sinvastatina;
7. Realizar uma análise funcional por meio de “*Walking Track Test*”.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Os cuidados com os animais estiveram de acordo com a Convenção Européia para a Proteção dos Animais Vertebrados utilizados para fins experimentais ou outros fins científicos e é consistente com os princípios éticos da experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Campinas, SP, Brasil e arquivado sob o nº 2935-1.

Os animais utilizados foram ratos Wistar, machos, com 60 dias de idade, pesando em média 300 gramas e foram mantidos com livre acesso a água e ração durante todo período experimental.

3.2 Procedimentos para a transecção parcial do tendão de Aquiles

Os animais foram anestesiados com injeção intra-peritoneal de Ketamina (90 mg/Kg) e Xylazina (10 mg/Kg). Após remoção da pele, o tendão de Aquiles da pata direita foi exposto e foi realizada incisão parcial transversal a uma distância de 3 mm de sua inserção no calcâneo (Figura 4). Após o procedimento a pele foi suturada.

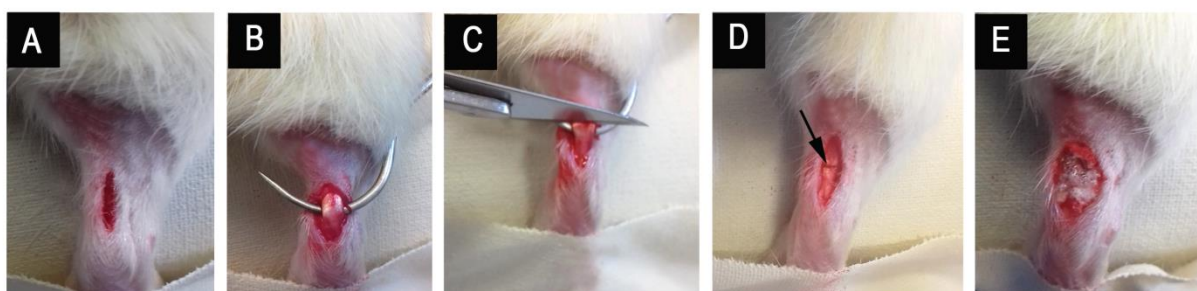


Figura 4. Procedimentos para incisão parcial do tendão de Aquiles. d) Seta indica a incisão parcial do tendão de Aquiles. e) Esponja de colágeno Hemospon® utilizada no tratamento local.

3.3 Grupos Experimentais

Foi utilizado n=5 para as análises bioquímicas e funcionais, n=4 para as análises morfológicas. Os animais foram divididos em 11 grupos experimentais, da seguinte maneira:

Grupo N → Tendão intacto; **Grupo L₇** → Tendão parcialmente transecionado, eutanaziados 7 dias após lesão; **Grupo SL₇** → Tendão parcialmente transecionado, tratado

com sinvastatina no local da lesão, eutanaziados 7 dias após lesão; **Grupo VL₇**→ Tendão parcialmente transeccionado, tratado com veículo no local da lesão, eutanaziados 7 dias após lesão; **Grupo SO₇**→ Tendão parcialmente transeccionado, tratado com sinvastatina via oral, eutanásia 7 dias após lesão; **Grupo VO₇**→ Tendão parcialmente transeccionado, tratado com veículo via oral, eutanásia 7 dias após lesão; **Grupo L₂₁**→ Tendão parcialmente transeccionado, eutanásia 21 dias após lesão; **Grupo SL₂₁**→ Tendão parcialmente transeccionado, tratado com sinvastatina no local da lesão, eutanásia 21 dias após lesão; **Grupo VL₂₁**→ Tendão parcialmente transeccionado, tratado com veículo no local da lesão, eutanásia 21 dias após lesão; **Grupo SO₂₁**→ Tendão parcialmente transeccionado, tratado com sinvastatina via oral, eutanásia 21 dias após lesão; **Grupo VO₂₁**→ Tendão de Aquiles parcialmente transeccionado, tratado com veículo via oral, eutanásia 21 dias após lesão. Os grupos foram esquematizados conforme a figura 5.

Vale ressaltar que para a análise de IL- β foram realizadas nos grupos 24h após lesão: **Grupo L₁**→ Tendão parcialmente transeccionado, eutanásia 24h após lesão; **Grupo SL₁**→ Tendão parcialmente transeccionado, tratado com sinvastatina no local da lesão, eutanásia 24h após lesão; **Grupo VL₁**→ Tendão parcialmente transeccionado, tratado com veículo no local da lesão, eutanásia 24h após lesão; **Grupo SO₁**→ Tendão parcialmente transeccionado, tratado com sinvastatina via oral, eutanásia 24h após lesão; **Grupo VO₁**→ Tendão de Aquiles parcialmente transeccionado, tratado com veículo via oral, eutanásia 24h após lesão; **Grupo N**→ Tendão intacto.

O tratamento local da lesão do tendão seguiu o protocolo descrito por Calixto *et al.* (2011). Foi preparada uma solução de sinvastatina na concentração de 2,2 mg/ 50 μ l em carboximetilcelulose 0,5 %. Esponjas de colágeno (Hemospon[®] – Technew) foram utilizadas como o carreador do medicamento. Estas esponjas foram embebidas com 56 μ l da solução de sinvastatina ou 56 μ l de carboximetilcelulose (CMC) 0,5 % (veículo). No momento da lesão as esponjas foram colocadas no sítio da ruptura para que o medicamento fosse liberado neste local durante 7 e 21 dias.

Para calcular a dose de sinvastatina utilizada por via oral, foi utilizado o cálculo de extrapolação alométrica (PACHALY; BRITO, 2001), levando em consideração a taxa metabólica do animal. Dessa forma, foi necessário ter como referência um animal modelo cujos parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos do medicamento de interesse sejam conhecidos. Neste estudo, tomamos como animal modelo o homem e como animal alvo, ratos da linhagem Wistar. O cálculo é realizado da seguinte maneira: Calculou-se o peso

metabólico do animal modelo e do animal alvo seguindo a fórmula: $PM = M^{0,75}$ onde M é a massa em quilogramas do animal; dividiu-se a dose total indicada para o animal modelo (80 mg) por seu peso metabólico; multiplica o resultado da operação anterior pelo peso metabólico do animal alvo; o resultado é a dose total (mg) para o animal alvo; dividiu-se a dose total pela massa do animal alvo (Kg); o resultado final é a dose para o animal alvo em mg/Kg.

Vale ressaltar que a dosagem de 80 mg utilizada no cálculo da dose foi assim estabelecida, pois é a dose máxima empregada na terapêutica em humanos. A sinvastatina foi solubilizada em carboximetilcelulose 0,5% utilizada como veículo.

Ao final de 7 e 21 dias os animais foram eutanasiados por overdose de anestesia inalatória com Isoflurano, e os tendões retirados para análises morfológicas e bioquímicas.



Figura 5. Esquema dos grupos experimentais

3.5 Análise bioquímica

3.5.1 Extração da Matriz Extracelular

Os tendões foram lavados com PBS (NaCl 0,15 M em tampão fosfato de sódio 5 mM pH 7,4 com EDTA 50 mM) e depois foram secos com papel de filtro e pesados. A extração foi realizada com 50 volumes de cloreto de guanidina (GuHCl) 4 M contendo 0,05 M EDTA, 1mM de PMSF em tampão Acetato 0,05 M pH 5.8 (HEINEGARD; SOMMARIN, 1987), durante durante 24 horas, com temperatura de 4° C em constante agitação. Após este período, o material foi centrifugado em 20.000 r.p.m., durante 60 minutos, a 4 °C em centrífuga

Beckman J2-21 (Rotor JA-20). O sobrenadante foi utilizado para dosagem GAGs e western blotting.

3.5.4 ELISA para IL-1 β e TGF- β

Os procedimentos de ELISA foram realizados de acordo com Guerra e colaboradores (2016). O tendão de Aquiles foi removido e incubado em tampão de extração (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 0,2 M, Triton X-100 a 0,1%, CaCl₂ 10 mM e inibidor de protease 100 μ L/10 mL) a 4°C durante 3h. O material foi centrifugado (13.000 x g, 20 min, 4 °C) e o sobrenadante foi utilizado para as dosagens com kits de ELISA para a IL-1 β (R & D Systems, N ° de catálogo RLB00) e TGF- β (R & D Systems, n ° de catálogo MB100B) de acordo com as instruções do fabricante. IL-1 β foi analisada 24h após a lesão e TGF- β foi analisado 7 e 21 dias após a lesão. A absorbância foi medida a 450 nm.

3.5.5 Zimografia

Os tendões foram tratados segundo Marqueti *et al.* (2006). Extração: os tendões congelados foram imersos em solução tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 0,2 M, Triton X-100 0,1%, CaCl₂ 10 mM e um coquetel inibidor de protease 1%. A extração foi realizada por aproximadamente 2 horas a temperatura de 4 °C. Após este procedimento, a amostra foi centrifugada a 4000 rpm (4 °C) por 20 minutos. O sobrenadante foi coletado e armazenado. O precipitado foi ressuspenso com 1/3 do volume do tampão utilizado na primeira extração, a solução foi incubada por 5 minutos a 60 °C. Novamente foi feita uma centrifugação a 4000 rpm (4 °C) por 20 minutos e o sobrenadante coletado. Os produtos das duas extrações foram então misturados.

Aplicação das amostras: em gel de poliacrilamida 10% e 0,1% de gelatina, foram aplicadas 1 μ g e 20 μ g de proteínas por amostra para observar MMP-2 e MMP-9 respectivamente.

Eletroforese (100V aproximadamente 1:30h): foi realizada a 4 °C. Após a corrida, o gel foi lavado com 2,5% de Triton X-100 e incubado overnight em solução de Tris-HCL 50 mM (pH 7,4) NaCl 0.1 M e azida sódica 0,03% a 37 °C. Após incubação, o gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue por aproximadamente 2h, e posteriormente descorado com solução contendo metanol 30% e ácido acético 10% para observação das bandas negativas das proteínas correspondendo à atividade das enzimas. Finalmente, foi colocado na solução

encolhedora (metanol 30% e glicerol 3%). A densitometria das bandas referentes às isoformas das MMP-2 e MMP-9 foi realizada através do programa Scion Image software Alpha 4.0.3.2 (Scion Corporation USA).

3.5.2 Dosagem GAGs

Amostras dos extratos em cloreto de guanidina dos grupos experimentais foram utilizadas para quantificar os GAGs totais dos grupos experimentais. A quantificação foi determinada usando o método de azul de dimetilmetileno (DMMB) (FARNDAL *et al.*, 1986) usando condroitim sulfato como padrão. A absorbância utilizada foi de 540 nm.

3.5.3 Western Blot para decorin e colágenos I e III

Para detecção de colágeno tipo I e III, foram precipitadas 20 µg de proteínas totais provenientes do extrato em guanidina e para detecção de decorin foram precipitadas 80 µg de proteínas, utilizando uma solução contendo tampão acetato de sódio 1 M pH 7,4 (100 µL) e 9 volumes de etanol (1350 µL), durante 24 horas à 4 °C. Após três lavagens (com 150 µL de tampão acetato de sódio 1 M pH 7,4 e 1350 µL de etanol), o precipitado obtido foi seco à 37°C e ressuspenso em tampão de amostra redutor contendo β-mercaptoetanol 5% (0,5 M Tris-HCl pH 6,8, Glicerol 26%, SDS 20%, Azul de Bromofenol 0,1%). Em seguida, as proteínas do tendão foram submetidas à eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (7,5%) para colágenos I e III e (12%) para decorin, transferidas para membrana de nitrocelulose, (Towbin *et al.*, 1979). O bloqueio foi realizado utilizando-se leite desnatado (Molico 5%) em TBS 1x com 0,1% Tween 20, por 1h sob agitação à temperatura ambiente. A incubação com anticorpo primário foi durante 12h à 4 °C, diluído em TBS 1x sob agitação. As lavagens das membranas foram novamente feitas em TBS 1x (3x5'). A incubação com anticorpo secundário, foi durante 1h sob agitação em temperatura ambiente. As lavagens das membranas foram novamente feitas em TBS 1x (3x5'). A revelação foi realizada com DAB (dimetilaminobenzaldeído). A densitometria de banda foi realizada utilizando o software Scion Image Alpha 4.0.3.2 (Scion Corporation). **Anticorpos primários:** anti-colágeno tipo I (mouse monoclonal, Sigma c2456), anti-colágeno tipo III (mouse monoclonal, Sigma c7805), anti-decorin H-80 (rabbit policlonal, Santa Cruz SC-22753), anti-β-tubulina clone D66 (mouse monoclonal, Sigma T0198), anti-β-actina (mouse monoclonal, Sigma A3854). **Anticorpos secundários:** anti-mouse (goat anti-mouse – IgG – HRP A8786 - Sigma-Aldrich), anti-rabbit (goat anti-rabbit- IgG - HRP A2306 - Sigma-Aldrich).

3.4 Análise Morfológica

3.4.1 Análise em Microscopia de luz

Os tendões foram fixados usando uma solução de formaldeído a 4% em tampão de Millonig (0,13 M fosfato de sódio, 0,1 M de NaOH, pH 7,4) durante 24 horas a 4 °C. Em seguida, os tendões foram lavados em água, desidratados com etanol, diafanizados com xilol e embebidos em parafina (Histosec). Foram obtidos cortes longitudinais seriados de 7 µm de espessura. Para uma visualização geral do tecido alguns cortes foram corados com Hematoxilina-eosina e outros com Azul de Toluidina (AT) (0.025%) em tampão McIlvaine (0.03 M ácido cítrico, 0.04 M fosfato de sódio dibásico - pH 4.0). As secções foram analisadas com microscópio de luz Olympus BX53, objetiva 20x.

A birrefringência foi analisada com microscópio de polarização Olympus BX53, objetiva 20x e as imagens foram capturadas e analisadas usando o analisador de imagens cellSens Dimension 1.6. Para a aquisição das imagens os cortes foram posicionados a 45° em relação ao polarizador e ao analisador. Foi avaliada a frequência do valor da média de cinza em pixels nas áreas analisadas. Quanto maior o valor em pixels, maior é a intensidade da birrefringência e, portanto, maior é a organização das fibras de colágeno. As medidas de cada grupo experimental foram feitas após a imersão dos cortes em água, uma condição na qual a birrefringência total é altamente detectável (VIDAL, 1980, 1986; VIDAL ; MELLO, 2010).

3.4.2 Análise ultraestrutural em microscopia eletrônica de transmissão

Os tendões foram fixados em solução contendo 2,5% de glutaraldeído e paraformaldeído 2% dissolvidos em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,4, durante 2h à temperatura ambiente. Em seguida o material foi lavado com tampão e pós-fixado em tetróxido de ósmio 1% durante 1h a 4 °C. Após esta etapa, os fragmentos foram lavados em tampão, tratados com acetato de uranila 1% por 18h à 4 °C e por fim, lavados novamente com o tampão. Após estes procedimentos todas as peças foram desidratadas em séries crescentes de etanol e dupla passagem pela acetona. Em seguida, foram embebidas em misturas de acetona/resina epon (2:1, 1:1 e 1:2) e resina epon pura. A inclusão foi feita em resina Epon 48h a 58 °C.

Os cortes semifinos foram obtidos com navalha de vidro e os ultrafinos com navalha de diamante, em ultramicrotomo Ultracut UCT (Leica). As telinhas obtidas foram

contrastadas em solução de acetato de uranila 2% em álcool 50% e citrato de chumbo 0,2% em NaOH 0,1 N. As telinhas foram observadas ao microscópio eletrônico de transmissão LEO 906 (Leica) e as imagens capturadas para documentação.

3.6 Análise Funcional

3.6.1 Avaliação da pressão exercida pela pata dos ratos

Inicialmente foi realizada uma avaliação da pressão da pata direita de cada animal através do “*Walking Track Test*” (*CatWalk*), (<http://www.noldus.com/animal-behavior-research/products/catwalk>), com o intuito de obter um padrão normal da pressão exercida pela pata antes da lesão. Os ratos foram submetidos à avaliações funcionais, sendo realizadas em dias alternados no período de 7 e 21 dias após a lesão.

O “*Walking Track Test*” consta de uma passarela com assoalho de vidro (100cm comprimento x 15cm largura x 0,6cm espessura) instalado em uma sala escura onde os ratos foram habituados a andar ao longo do percurso. Uma lâmpada fluorescente marca somente onde houve pressão das patas dos ratos caminhando. O assoalho desse corredor foi monitorado por uma câmera Pulnix TM-765E CCD equipada com uma objetiva (Cosimar 8,5 mm) que detecta a média de intensidade em pixels. A intensidade do sinal varia de acordo com a pressão aplicada pela pata do animal. Os sinais adquiridos foram digitalizados pelo PCImage-SG quadro à quadro (Matrix vision GmH, Oppenheimer, Alemanha). O programa *CatWalk* adquire, armazena e posteriormente analisa os vídeos dos ratos caminhando, fornecendo parâmetros para posterior quantificação e análise em planilhas específicas.

3.7 Análises estatísticas

Exceptuando os dados das medidas de birrefringência que foram analisados pelo teste de Mann-Whitney, os demais dados provenientes de métodos quantitativos foram analisados utilizando a análise de variância ANOVA (nível de significância de 5%), seguido pelo teste de Tukey para comparações múltiplas através do programa estatístico GraphPad Prism®, versão 3.0. Foram apresentados os valores médios $\pm$ desvio padrão dos resultados de cada grupo.

4. RESULTADOS

4.1 Perfil de IL-1 β e TGF- β

A análise através de ELISA realizada para IL-1 β (Figura 6) mostrou que todos os grupos lesionados apresentaram aumento significativo desta interleucina quando comparados com o grupo N. Os grupos L₁ e SL₁ apresentaram uma redução significativa de IL-1 β quando comparados com o grupo VL₁. O grupo SO₁ apresentou uma redução significativa de IL-1 β quando comparado com o grupo VO₁. Além disso, podemos observar que o grupo SO₁ apresentou a concentração de IL-1 β mais próxima daquela encontrada no grupo N.

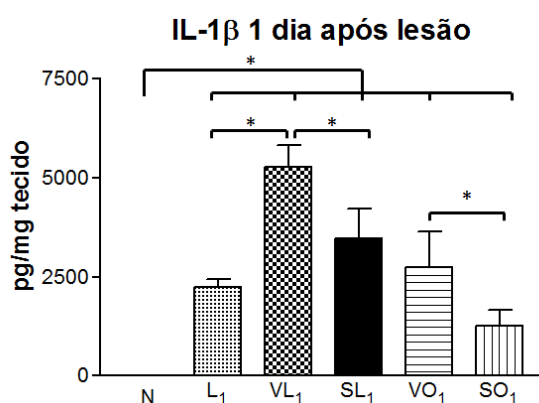


Figura 6. ELISA para IL-1 β (pg/g de tecido) nos diferentes grupos analisados 24h após lesão. * $p < 0.05$

Nos dois períodos analisados (7 e 21 dias), a quantificação de TGF- β (Figura 7) demonstrou um aumento significativo desta citocina em todos os grupos lesionados quando comparados com o grupo N. Sete dias após a lesão o grupo SO₇ exibiu uma redução significativa de TGF- β em comparação com o grupo VO₇. O grupo SL₂₁ apresentou menores quantidades de TGF- β em relação ao grupo VL₂₁.

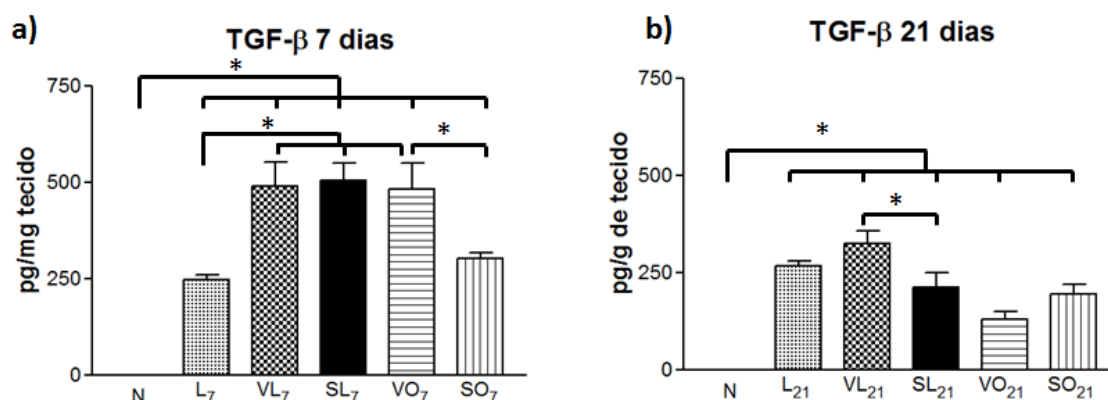


Figura 7. ELISA para TGF- β (pg/g de tecido) nos diferentes grupos analisados. a) Grupos analisados 7 dias após lesão. b) Grupos analisados 21 dias após lesão. * $p < 0.05$

4.2. Atividade de MMP-2 e MMP-9

A zimografia para gelatinases permitiu analisar as diferentes isoformas de MMP-2 e MMP-9 dos grupos experimentais (Figura 8). A densitometria de bandas das isoformas de MMP-2 (Figura 9) revelou um aumento significativo da MMP-2 ativa nos grupos L₇, VL₇, VO₇ e SO₇ em relação ao grupo normal. O grupo SL₇ exibiu uma redução da atividade de MMP-2 ativa, sendo o grupo com valor mais próximo do grupo normal. Análises dos grupos de 21 dias revelaram um aumento de pro-MMP-2 nos grupos VO₂₁ e SO₂₁ em relação ao grupo normal. A MMP-2 ativa permaneceu significativamente com valores aumentados nos grupos L₂₁ e SO₂₁ quando comparados ao grupo normal. Os grupos VL₂₁ e SL₂₁ apresentaram uma redução de MMP-2 ativa.

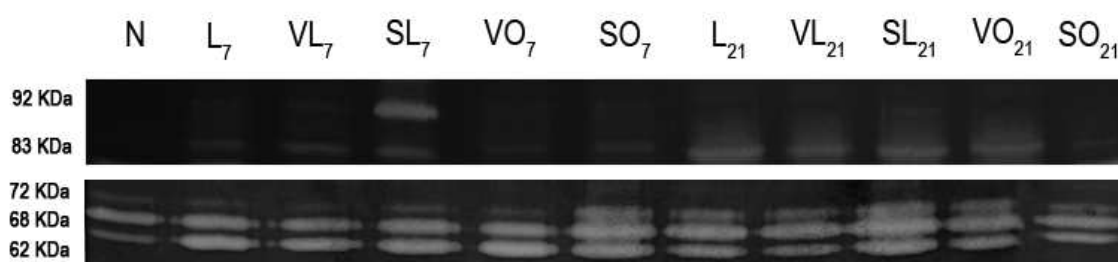


Figura 8. Zimografia para MMP-9 e MMP-2. Observe a presença de MMP-9 latente (92 KDa) e de MMP-9 ativa (83 KDa) em todos os grupos experimentais, exceto no grupo normal (N). Todos os grupos estudados exibiram pro-MMP-2 (bandas de 72 KDa e 68 KDa) e MMP-2 ativa (62 KDa).

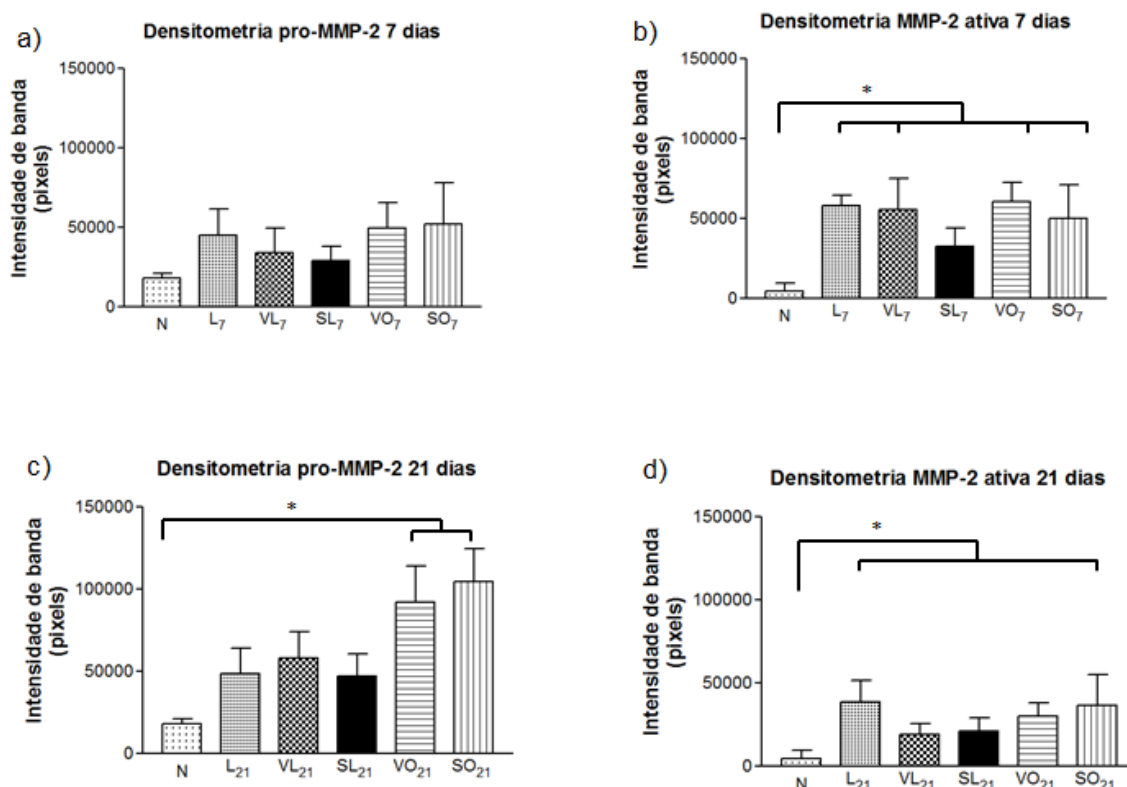


Figura 9. Densitometria de bandas correspondente às isoformas de MMP-2. a e b: grupos analisados 7 dias após a lesão. c e d grupos analisados 21 dias após a lesão. * $p < 0.05$

A densitometria de bandas das isoformas de MMP-9 (Figura 10) revelou um aumento significativo da MMP-9 latente nos grupos VL₇ e SL₇ em relação aos grupos normal e L₇. O grupo SL₇ exibiu um aumento da atividade de MMP-9 latente em relação ao grupo VL₇. A atividade de MMP-9 ativa foi maior nos grupos L₇, VL₇, SL₇ e VO₇ em relação ao grupo normal. Ambas as isoformas de MMP-9 no grupo SO₇ apresentaram valores próximos aos valores do grupo normal. Análises de densitometria das isoformas de MMP-9 em 21 dias após lesão, revelaram um aumento da isoforma latente nos grupos L₂₁, VL₂₁, SL₂₁, VO₂₁ quando comparados com o grupo normal, sendo que o grupo SO₂₁ exibiu valor mais próximo do grupo normal. Todos os grupos analisados em 21 dias apresentaram maior atividade de MMP-9 ativa quando comparados com o grupo normal. O grupo SO₂₁ apresentou uma redução de MMP-9 ativa em relação aos grupos L₂₁ e VO₂₁.

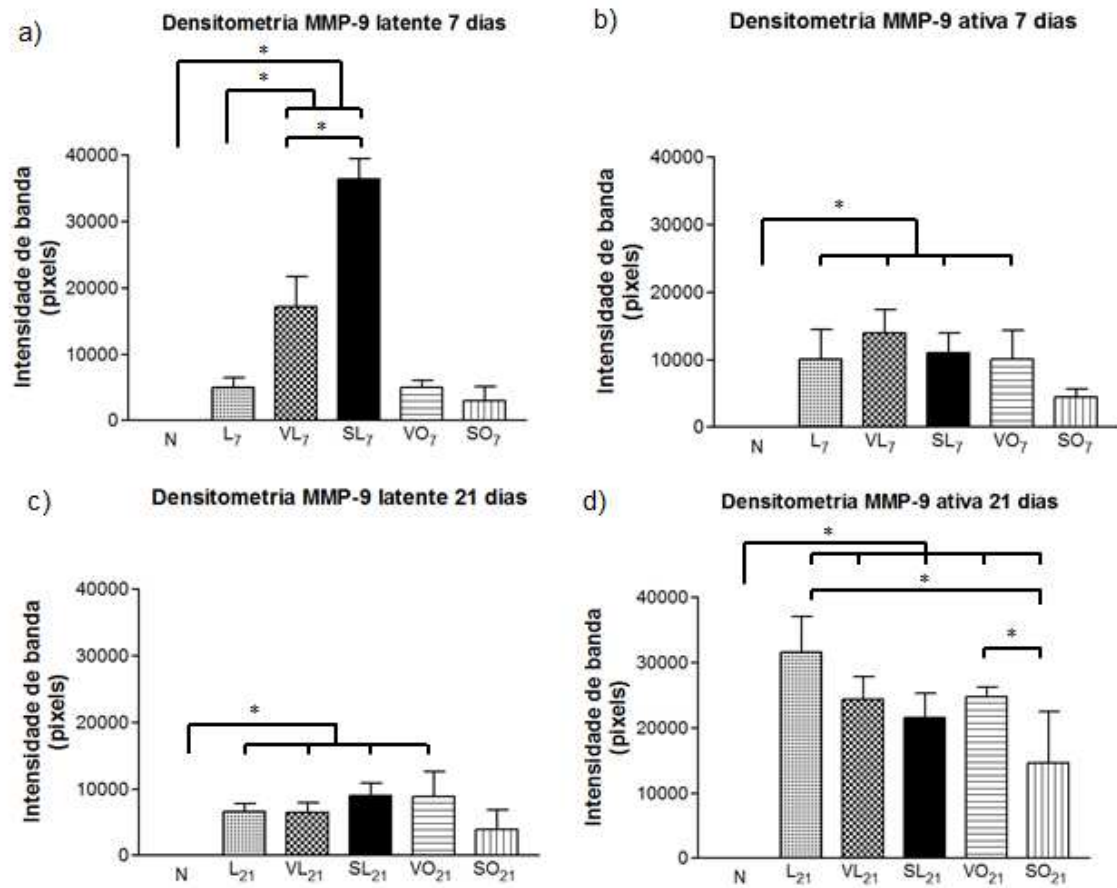


Figura 10. Densitometria de bandas correspondente às isoformas de MMP-9. a e b: grupos analisados 7 dias após a lesão. c e d grupos analisados 21 dias após a lesão. * $p < 0.05$

4.3 Perfil de GAGs, decorin e aspecto morfológico do tendão

As dosagens de glicosaminoglicanos (Figura 11) realizadas no período de 7 dias após lesão mostraram uma redução de GAGs nos grupos VL₇, SL₇ e SO₇ quando comparados ao grupo L₇. Além disso, foi possível observar diferenças entre os grupos N e SL₇ e também entre os grupos VO₇ e SO₇. Após 21 dias os grupos L₂₁, SL₂₁ e VO₂₁ exibiram um aumento de GAGs quando comparados com o grupo N.

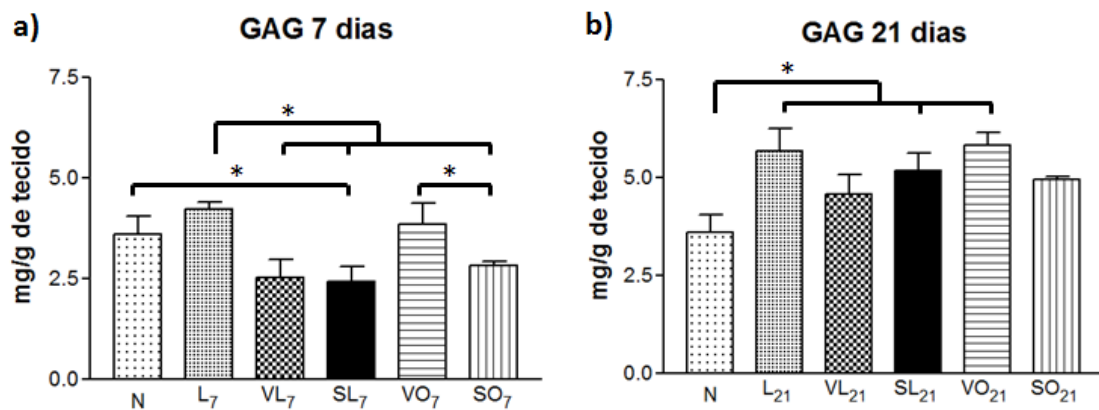


Figura 11. Concentração de GAGs (mg/g de tecido) nos diferentes grupos analisados. a) Grupos analisados 7 dias após lesão. b) Grupos analisados 21 dias após lesão. * $p < 0.05$

A figura 12 exibe o western blotting para decorin dos diferentes grupos analisados. Nos grupos de sete dias, as análises de densitometria de bandas de western blotting (Figura 13) evidenciaram uma redução de decorin em todos os grupos lesionados quando comparados ao grupo normal. Em 21 dias, a densitometria de bandas revelou que os grupos L₂₁, VL₂₁ e SL₂₁ apresentaram uma redução significativa de decorin quando comparados com o grupo normal. Já os grupos VO₂₁ e SO₂₁ apresentaram quantidades de decorin mais próximas daquela observada no grupo normal.

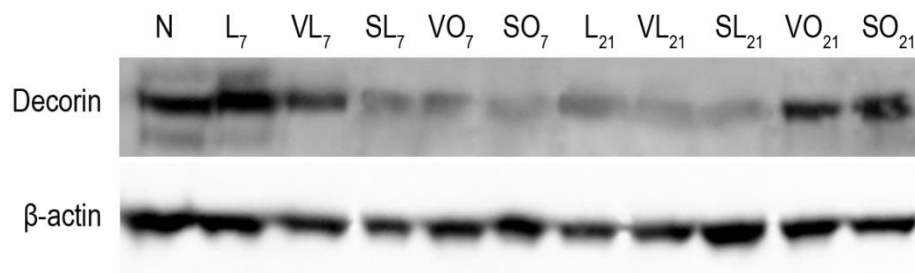


Figura 12. Western Blotting evidenciando a presença de decorin nos extratos de tendões dos diferentes grupos experimentais. β-actina foi utilizada como controle endógeno.

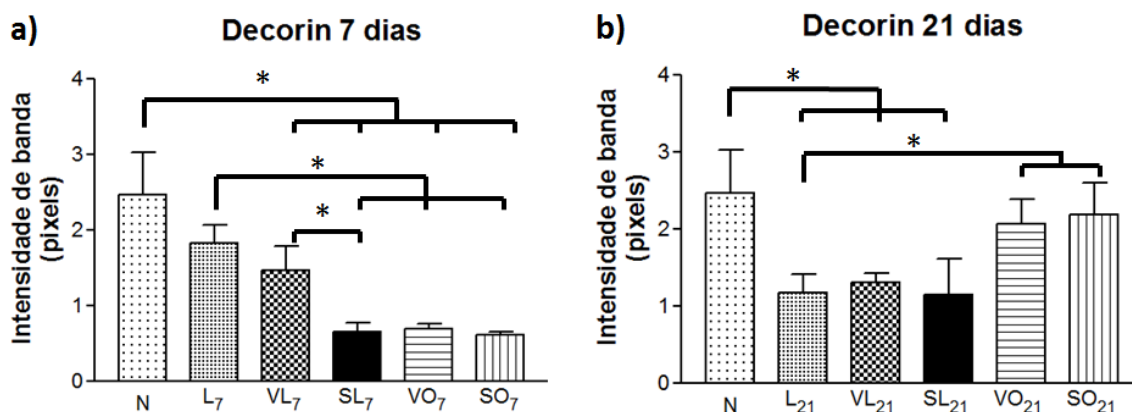


Figura 13. Densitometria de bandas de western blotting para decorin. a) Grupos analisados 7 dias após a lesão. b) Grupos analisados 21 dias após a lesão. * $p < 0.05$

Com relação ao aspecto morfológico dos tendões, sete dias após as lesões, os cortes de tendões dos grupos lesionados exibiram notório aumento na quantidade de células em relação ao tendão normal. Apesar desta observação, no grupo SL₇ o aumento da quantidade de células parece menos pronunciado (Figura 14). Ainda com relação aos grupos de sete dias, os grupos SO₇ e SL₇ aparentemente exibiram menor presença de GAGs, e isto está evidenciado na figura 14, onde se observa uma metacromasia menos acentuada nesses grupos.

Os grupos L₂₁, VL₂₁, VO₂₁ e SL₂₁ exibiram uma metacromasia bastante acentuada indicando alto conteúdo de GAGs e alta celularidade quando comparados com o grupo normal e SO₂₁. O grupo SO₂₁ apresentou um aspecto mais parecido com o grupo normal, com discreta metacromasia, e menor quantidade de células quando comparado com os demais grupos lesionados.

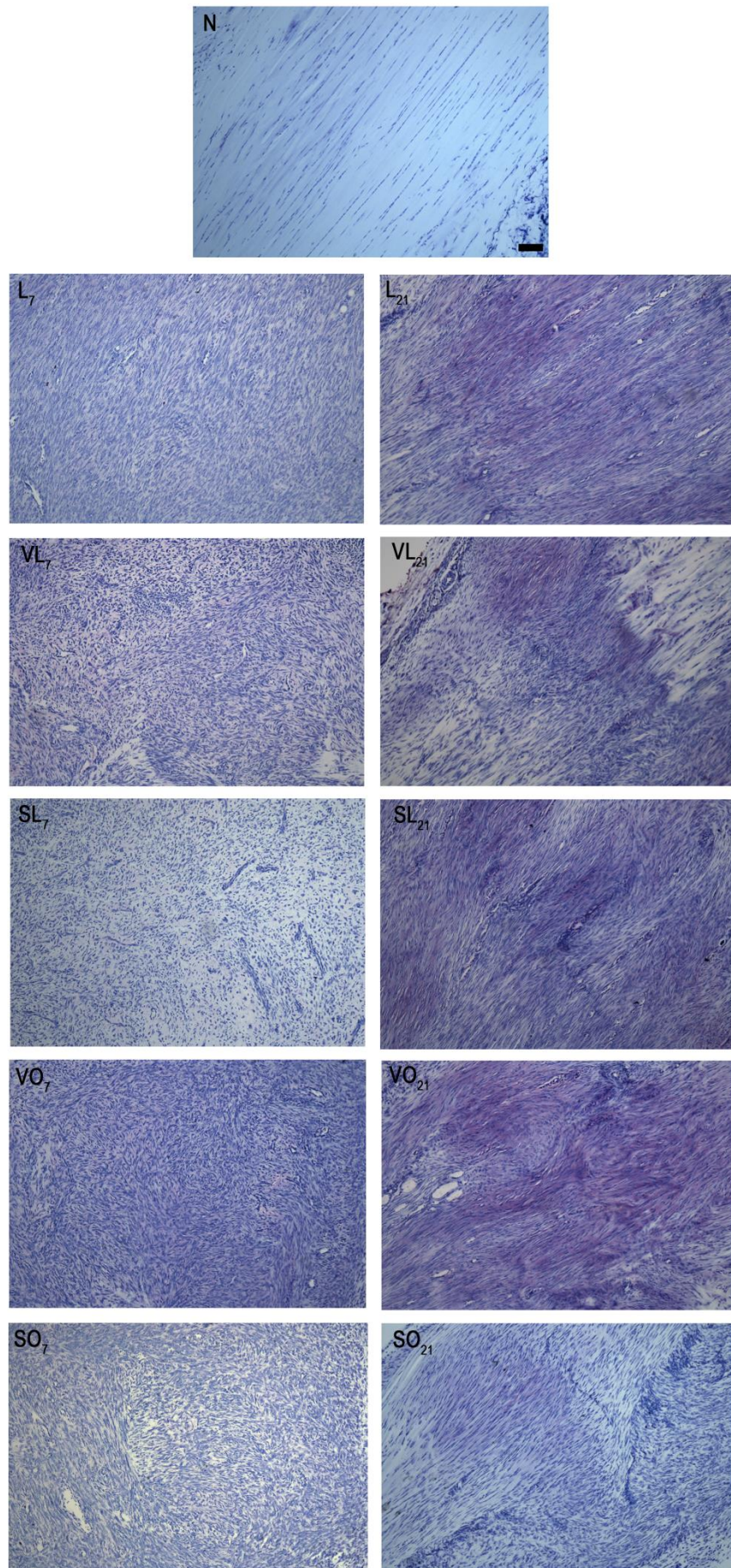


Figura 14. Cortes longitudinais de tendão corados com azul de toluidina (AT). Observar o grande número de células nos grupos lesionados após sete dias e a intensa metacromasia, especialmente nos grupos L₂₁, VL₂₁, SL₂₁, VO₂₁. Barra 100µm

4.4 Presença e organização de colágeno

A figura 15 exibe as bandas de western blotting para colágeno I e III. Em 7 e 21 dias as análises de densitometria de bandas de colágeno I (Figura 16) revelaram uma redução significativa em todos os grupos lesionados quando comparados com o grupo N. Os grupos VL₇, SL₇, VO₇ e SO₇ também exibiram um aumento significativo de colágeno I em relação ao grupo L₇. Os grupos SL₂₁, VO₂₁ e SO₂₁ exibiram menores quantidades de colágeno I em relação ao grupo L₂₁. Houve redução de colágeno I no grupo SL₂₁ em relação ao grupo VL₂₁; em contrapartida, o grupo SO₂₁ exibiu um aumento de colágeno I em relação ao grupo VO₂₁.

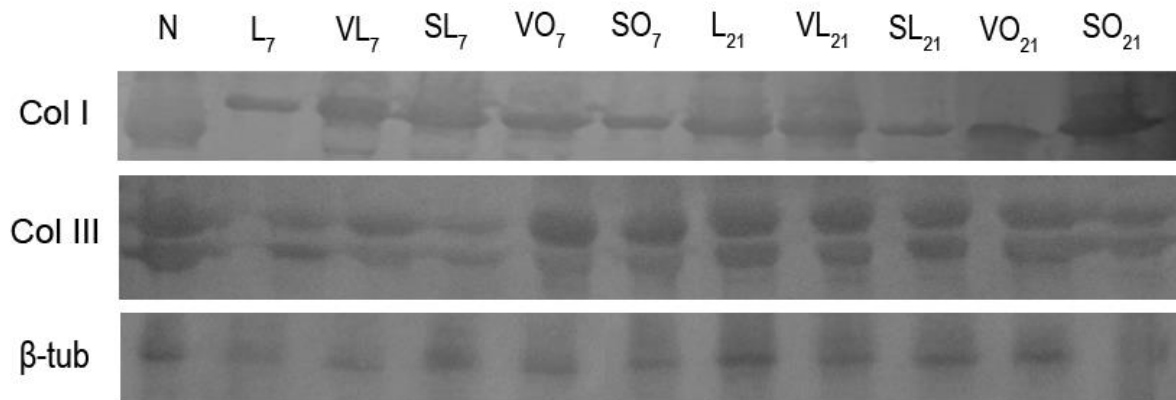


Figura 15. Western Blotting mostrando colágeno I e colágeno III dos extratos de tendões dos diferentes grupos experimentais. β-tubulina foi utilizada como controle endógeno. Col I: Colágeno I; Col III: Colágeno III; β-tub: β-tubulina.

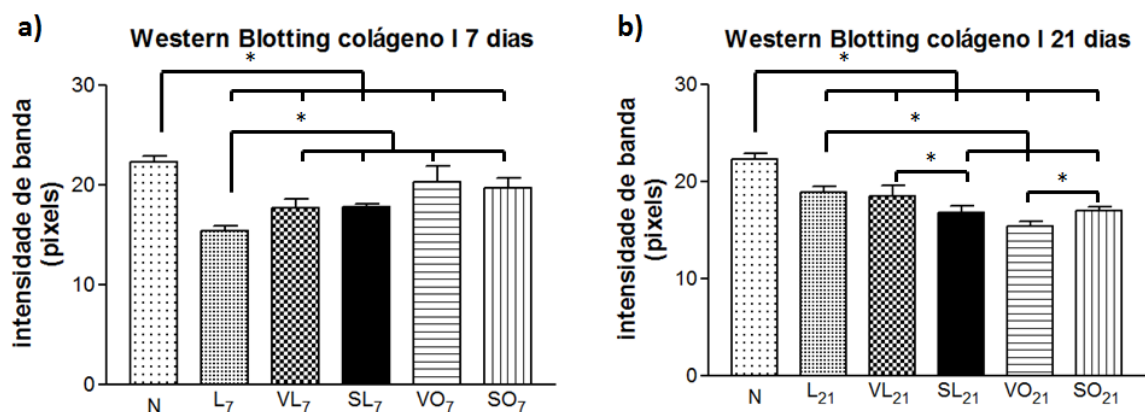


Figura 16. Densitometria de bandas de western blotting para colágeno I. a) Grupos analisados 7 dias após a lesão. b) Grupos analisados 21 dias após a lesão. * $p < 0.05$

A densitometria de bandas de Western blotting para colágeno III (Figura 17) revelou que todos os grupos analisados em 7 e 21 dias apresentaram menores quantidades de colágeno

do tipo III quando comparados com o grupo normal. Foi possível observar que em 21 dias os grupos VL₂₁ e VO₂₁ apresentaram quantidades significativamente maiores de colágeno III quando comparados com os grupos SL₂₁ e SO₂₁ respectivamente. As imagens das membranas correspondentes às bandas de colágeno I, colágeno III e controle endógeno de β -tubulina estão representadas na figura 15.

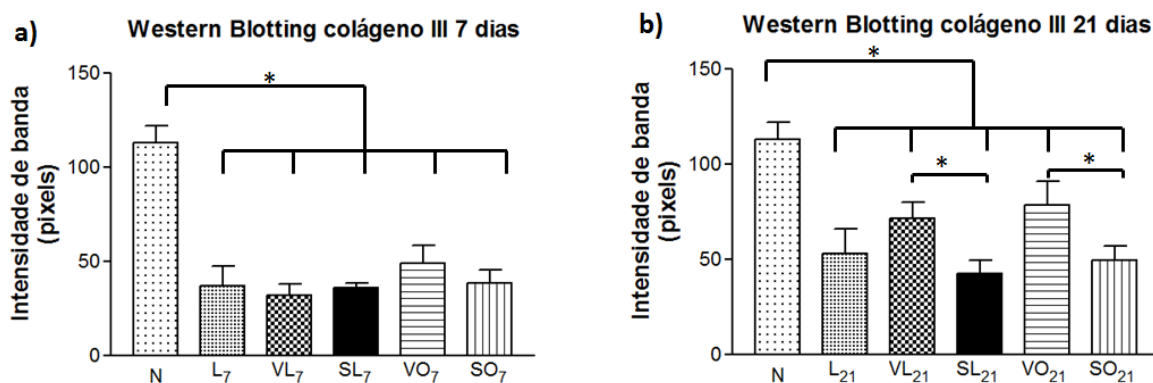


Figura 17. Densitometria de bandas de western blotting para colágeno III. a) Grupos analisados 7 dias após a lesão. b) Grupos analisados 21 dias após a lesão. * $p < 0.05$

A análise de birrefringência (Figura 18) mostrou que os tendões normais observados sob luz polarizada apresentam um alto brilho, característico de uma alta agregação e organização das fibras de colágeno no tecido. Após a lesão, as fibras de colágeno ficaram desorganizadas e os tendões apresentaram pouco ou nenhum brilho. Nos primeiros 7 dias não foram observadas diferenças entre os grupos, todos os feixes de colágeno estavam igualmente desorganizados. Aos 21 dias, foi observado que os grupos VL₂₁ e SO₂₁ apresentaram uma melhor organização das fibras de colágeno do que os demais grupos lesionados.

Foram realizadas medidas de birrefringência a partir das imagens capturadas para avaliar quantitativamente a organização do tecido. As medidas de birrefringência são mostradas na tabela 1. É possível observar que todos os grupos apresentaram diferenças significativas entre si. Os grupos L₂₁, SL₂₁ e VO₂₁ foram os que apresentaram maior desorganização da matriz extracelular. Por outro lado, os grupos VL₂₁ e SO₂₁ mostraram uma melhor organização das fibras de colágeno de acordo com as medidas de birrefringência.

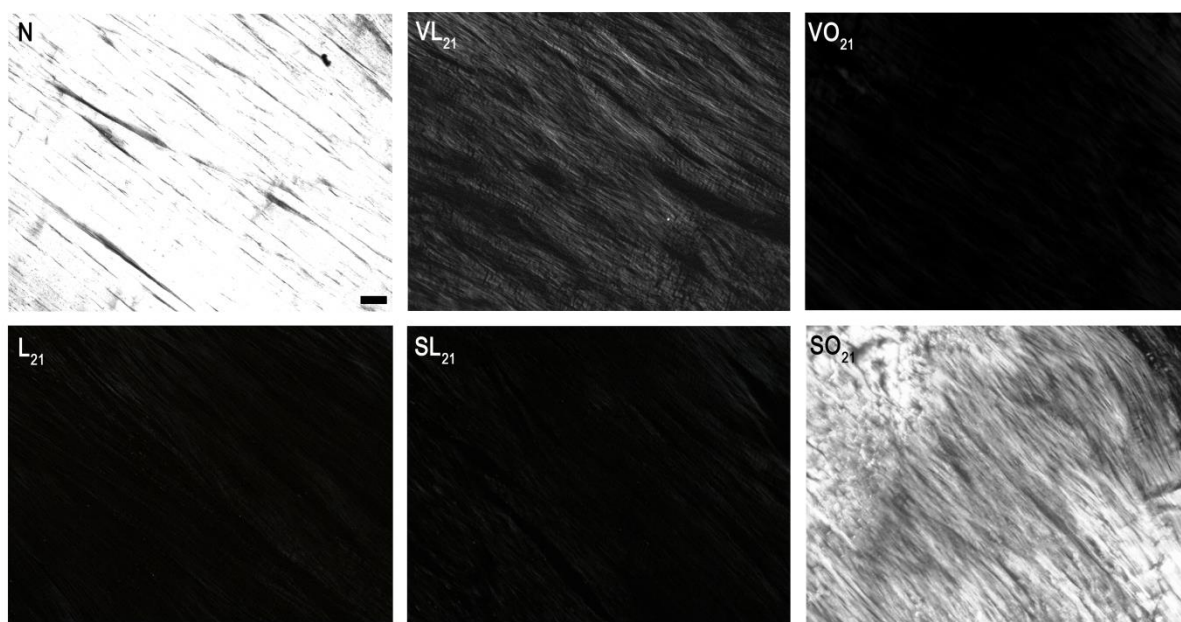


Figura 18. Cortes longitudinais de tendões de diferentes grupos observados em microscópio de polarização. O maior eixo dos tendões foi posicionado 45° em relação aos polarizadores. Barras 50µm

Tabela 1. Medidas de birrefringência nas regiões de transecção. O número de medidas (100) foi escolhido aleatoriamente em 12 cortes de 4 tendões de cada grupo. O grupo SO₂₁ apresentou maiores valores de birrefringência quando comparado com os grupos L₂₁ e VO₂₁.

Grupos	RO (média de cinza)	Comparações	Teste de Mann-Whitney (p)
N	229.31	*	
L ₂₁	12.86	L ₂₁ x SL ₂₁ *	0.0001
VL ₂₁	23.37	L ₂₁ x VL ₂₁ *	0.0001
SL ₂₁	15.02	SL ₂₁ x VL ₂₁ *	0.0001
VO ₂₁	9.75	L ₂₁ x VO ₂₁ *	0.0001
SO ₂₁	72.19	L ₂₁ x SO ₂₁ *	0.0001
		VO ₂₁ x SO ₂₁ *	0.0001

RO: Retardo ótico *p<0.05

O aspecto transversal das fibrilas de colágeno foi analisado através de microscopia eletrônica de transmissão nos grupos de 21 dias após lesão. As micrografias eletrônicas dos diferentes grupos experimentais estão representadas na figura 19. O grupo normal e o grupo SO₂₁ apresentaram fibrilas grossas e finas, com predominância de fibrilas grossas. Os grupos L₂₁, VO₂₁, SL₂₁ apresentaram somente fibrilas finas, entretanto, as fibrilas do grupo VO₂₁ parecem ter menos espaço entre si. O grupo VL₂₁ apresentou uma predominância de fibrilas finas, porém foi possível observar também fibrilas grossas entre as fibrilas finas.

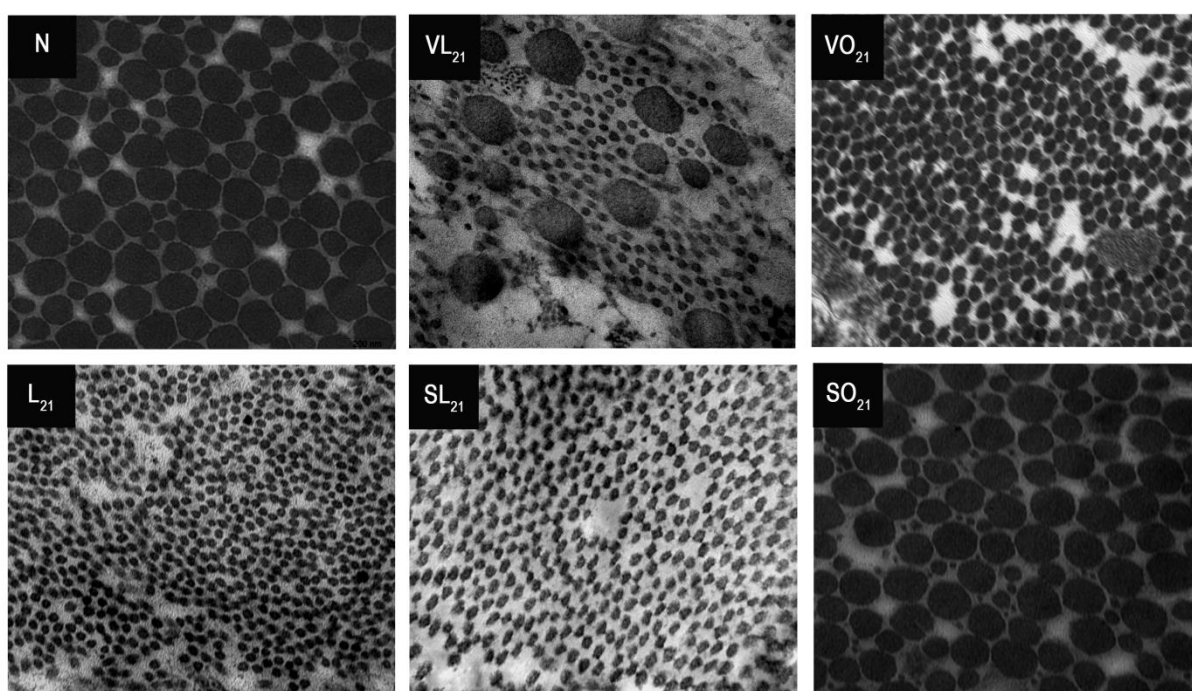


Figura 19. Eletromicrografias exibindo as fibrilas de colágeno dos diferentes grupos experimentais em corte transversal. Barra: 200nm

4.5 Análise funcional

Os resultados obtidos através do sistema de Catwalk (Figuras 20 e 21) mostraram uma resposta funcional positiva dos grupos que receberam sinvastatina por via oral durante 7 e 21 dias. SO₇ e SO₂₁ mostraram valores elevados de contato máximo da pata sobre a plataforma durante a caminhada. Como as avaliações foram realizadas em dias alternados, foi possível um acompanhamento mais frequente, de modo que foi notado que a partir do 13º dia, o grupo SO₂₁ apresentou valores similares aos grupos L₂₁ e VO₂₁. Não houve diferenças em relação aos animais que receberam sinvastatina no local da lesão. Tanto em 7 quanto em 21 dias, os

grupos que receberam sinvastatina no local da lesão apresentaram valores próximos dos grupos que foram somente lesionados e dos grupos que receberam veículo após a lesão.

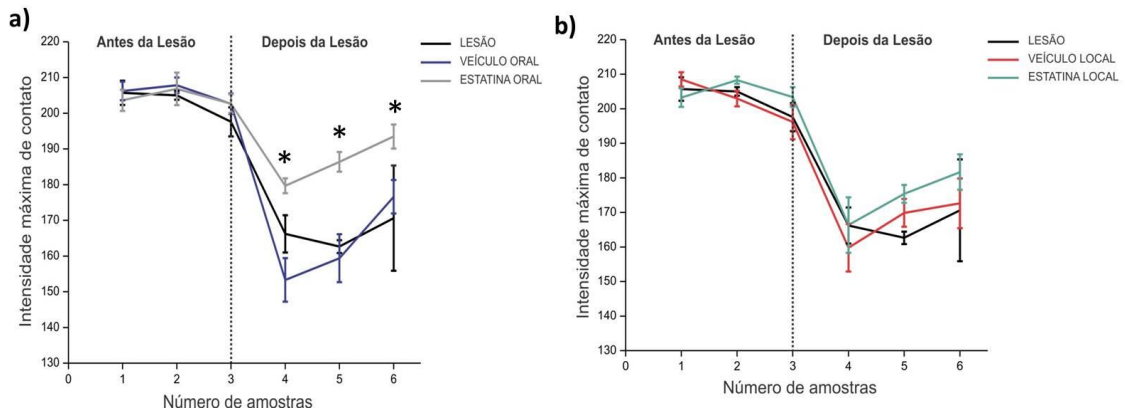


Figura 20. Intensidade máxima de contato durante a marcha dos ratos, obtida pelo sistema de Catwalk. As medidas foram realizadas em dias alternados durante 7 dias após a lesão. As medidas foram feitas no 2º, 4º e 6º dias após a lesão. a) Medidas realizadas em animais tratados com veículo ou sinvastatina por via oral. b) Medidas realizadas em animais tratados com veículo ou sinvastatina no local da lesão. * $p < 0.05$

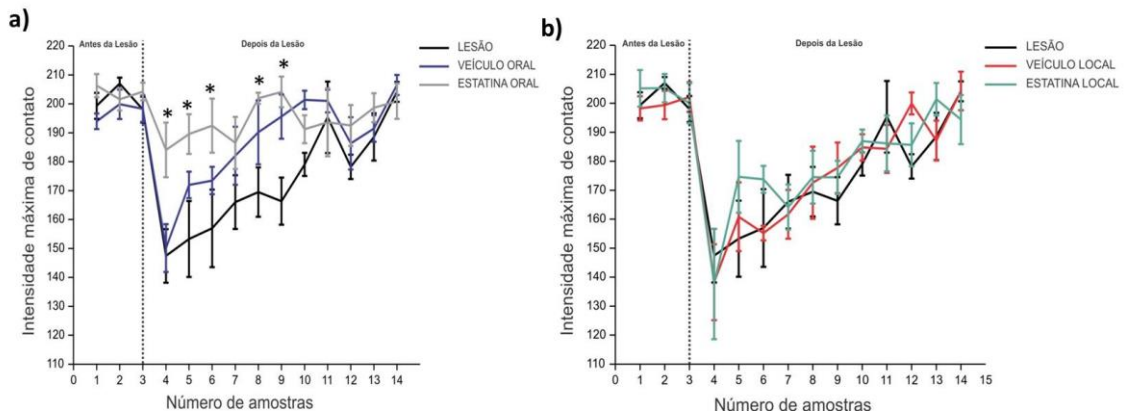


Figura 21. Intensidade máxima de contato durante a marcha dos ratos, obtida pelo sistema de Catwalk. As medidas foram realizadas em dias alternados durante 21 dias após a lesão. As medidas foram feitas no 2º, 4º, 6º, 8º, 10º, 12º, 14º, 16º, 18º e 20º dias após a lesão. a) Medidas realizadas em animais tratados com veículo ou sinvastatina por via oral. b) Medidas realizadas em animais tratados com veículo ou sinvastatina no local da lesão. * $p < 0.05$

5. DISCUSSÃO

No presente estudo foi avaliada a administração por via oral e a aplicação local de sinvastatina após transecção parcial do tendão de Aquiles durante 7 e 21 dias, a fim de determinar qual o efeito de diferentes vias de administração de sinvastatina nas fases inflamatória e de remodelamento do processo de reparo do tendão.

Recentemente, alguns pesquisadores vêm explorando o papel das estatinas no reparo de tendões e ligamentos (ESENKAYA *et al.*, 2010; ESENKAYA ; UNAY, 2011; OKA *et al.*, 2013; DOLKART *et al.*, 2014). Em um destes estudos foi observado que a atorvastatina pode influenciar positivamente a cicatrização do tendão através do estímulo da proliferação, migração e adesão de tenócitos pelo aumento da atividade da cicloxigenase 2 (DOLKART *et al.*, 2014). Outro estudo sugere que a administração local de sinvastatina promove recuperação do ligamento através do aumento da angiogênese e osteogênese na fase inicial da inflamação (OKA *et al.*, 2013).

Uma lesão no tendão desencadeia uma resposta inflamatória local, com o recrutamento de linfócitos, macrófagos e outras células inflamatórias que liberam citocinas pró-inflamatórias como, por exemplo, IL-1 β , TNF- α , IFN- γ e fatores de crescimento que vão mediar eventos importantes durante o processo de reparo do tendão (SHARMA; MAFFULLI, 2005; JAMES *et al.*, 2008; SCHULZE-TANZIL *et al.*, 2011; KILLIAN *et al.*, 2012). IL-1 β desempenha um papel importante na inflamação aguda, estimulando dor, proliferação celular, interações célula-célula, além de aumentar a produção de MMPs (REN; TORRES, 2008). A dosagem de IL-1 β foi realizada 24h após a lesão no tendão porque neste período é possível detectar grandes quantidades desta citocina (KOSHIMA *et al.*, 2007). Sendo assim, um dia após a lesão no tendão foi possível detectar uma redução de IL-1 β no grupo que recebeu tratamento com sinvastatina por via oral, sugerindo que o medicamento exerceu um efeito anti-inflamatório.

TGF- β é uma das citocinas que estimula a síntese de matriz extracelular, principalmente o colágeno, e é expressa em altos níveis durante as três fases do reparo de tendões (CHANG *et al.*, 2000; DOCHEVA *et al.*, 2015). Alguns autores defendem que altos níveis de TGF- β é indicativo de uma cicatrização eficiente (MOLLOY *et al.*, 2003; HOU *et al.*, 2005; GUERRA *et al.*, 2016), entretanto outros acreditam que níveis elevados podem estar relacionados à deposição excessiva e desordenada de colágeno além de formação de adesões e fibrose (CHANG *et al.*, 2000; CAMPBELL *et al.*, 2004; PENN *et al.*, 2012). Em nosso estudo, é possível inferir que a sinvastatina administrada por via oral tenha inibido a

síntese e liberação de TGF- β e de colágeno, onde o grupo SO₇ apresentou menores quantidades desta citocina em relação aos demais grupos tratados e, além disso, as análises dos grupos de 21 dias mostraram que houve uma tendência de redução de TGF- β no grupo SO₂₁, o que possivelmente levou a consequências positivas na síntese e deposição de colágeno, promovendo uma cicatrização mais eficaz.

O processo de remodelamento do tendão envolve síntese e degradação de colágeno (ANDARAWIS-PURI *et al.*, 2015). No western blotting para colágenos I e III foi observado que todos os grupos lesionados após 7 e 21 dias apresentaram menores quantidades destes dois tipos de colágenos em relação ao controle. Apesar disso, o grupo SO₇ teve uma tendência de aumento de colágeno III em relação aos demais grupos lesionados, sugerindo um possível estímulo da síntese deste componente. Sendo assim, o tratamento por via oral com sinvastatina parece auxiliar na fase inicial de recuperação do tendão.

O papel das estatinas no metabolismo do colágeno está sendo estudado e alguns trabalhos sugerem que estes medicamentos estão associados com a redução da expressão, síntese e deposição de colágeno I (TZIAKAS *et al.*, 2008; SCHAAFSMA *et al.*, 2011). Os grupos SL₂₁ e SO₂₁ permaneceram com níveis reduzidos de colágeno I e III em relação ao grupo L₂₁. Portanto, após 21 dias de tratamento com sinvastatina, é possível que os colágenos I e III apresentem uma redução de sua expressão, síntese e deposição na matriz extracelular dos tendões. Ainda assim, o grupo SO₂₁ foi aquele, dentre os lesionados, que apresentou melhor organização das fibras de colágeno, sugerindo que a sinvastatina por via oral foi benéfica na fase de remodelamento.

As MMPs são enzimas proteolíticas responsáveis por degradar diversas moléculas, com um papel importante no remodelamento da matriz extracelular, e após uma lesão no tendão seus níveis estão alterados (SHARMA ; MAFULLI, 2006; KAROUSOU *et al.*, 2008). A expressão e atividade de MMPs são reguladas por fatores de crescimento, citocinas, interações célula-célula e célula-matriz, podendo ser regulada, também por Inibidores Teciduais de Metaloproteinases (TIMPs) (SCHULZE-TANZIL *et al.*, 2011; DAVIS *et al.*, 2013). Há um aumento de MMP-2 após uma lesão no tendão e esta enzima participa tanto da degradação quanto do remodelamento do colágeno (SHARMA ; MAFULLI, 2006). Aparentemente, a redução dos níveis da isoforma ativa de MMP-2 nos grupos que receberam sinvastatina no local da lesão, não foi um fator benéfico para a recuperação do tendão, visto que as análises de birrefringência mostraram que o grupo SL₂₁ apresentou uma menor organização das fibras de colágeno. Por outro lado, o grupo SO₂₁ exibiu um aumento dos

níveis de MMP-2 ativa e as fibras de colágeno neste mesmo grupo também exibiram uma melhor organização. Portanto, o aumento de MMP-2 no grupo tratado por via oral com sinvastatina pode influenciar positivamente a organização dos feixes de colágeno.

A MMP-9 é uma enzima presente em processos inflamatórios e, após lesões no tendão esta enzima participa da degradação de colágeno sendo que pico de sua produção se dá entre 7 e 14 dias após uma injúria tendínea (SHARMA ; MAFULLI, 2005; JONES *et al.*, 2006). Os grupos que receberam sinvastatina no local da lesão apresentaram níveis aumentados de MMP-9, ao passo que os grupos que receberam sinvastatina por via oral 7 e 21 dias subsequentes à lesão exibiram redução da atividade de MMP-9. Desta forma, fica evidente que o aumento de MMP-9 nos grupos que receberam sinvastatina no local da lesão, não foi benéfico, tendo em vista que não houve uma melhora na organização das fibras de colágeno nestes grupos. É importante destacar ainda, que os grupos SL₇ e SL₂₁ também apresentaram redução dos níveis de colágeno III e sendo assim, nossos resultados sugerem que a sinvastatina no local da lesão promoveu uma maior degradação de colágeno e, com isso, não contribuiu para uma boa recuperação do tendão.

O papel das estatinas na regulação de MMPs tem sido extensivamente estudado nos últimos anos, em diversos processos patológicos como câncer, asma, aterosclerose, doenças auto-imunes (GREENWOOD *et al.*, 2006; FALCONE *et al.*, 2013; YU *et al.*, 2013; CHEN ; CHANG, 2014; RAZAVIAN *et al.*, 2014). Alguns estudos demonstram que as estatinas reduzem expressão e atividade de MMPs pela redução de intermediários da via de produção do colesterol, que são importantes para modificações pós-traducionais de proteínas que participam das vias de sinalização de produção de MMPs (TURNER *et al.*, 2005; BARTER *et al.*, 2010; IZIDORO-TOLEDO *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2015). Por outro lado, alguns autores sugerem que estes medicamentos aumentam a atividade de MMPs (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Provavelmente o mecanismo envolvido no aumento da expressão e atividade de MMPs esteja relacionado com regulação da fosforilação de moléculas sinalizadoras pela sinvastatina (LEE *et al.*, 2012). Desta maneira, de acordo com estes estudos, dependendo da via de sinalização as estatinas podem inibir ou aumentar a atividade de MMPs. Durante a cicatrização do tendão, o grupo SO₂₁ exibiu um aumento da atividade de MMP-2 e uma redução da atividade de MMP-9. Sendo assim, é possível que a sinvastatina tenha exercido uma modulação da atividade das MMPs durante a fase inflamatória e de remodelamento.

Um dos primeiros eventos que acontecem após uma lesão no tendão é a migração de células inflamatórias para o local da injúria e algum tempo depois, há um aumento da síntese

de proteínas não-colagênicas, colágeno e glicosaminoglicanos pelos tenócitos, na tentativa de reestabelecer a matriz extracelular do tendão lesionado (SHARMA; MAFFULLI, 2005; HOPE; SAXBY, 2007). Os grupos VL₇, SL₇ e SO₇ exibiram menores quantidades de GAGs indicando que possivelmente, nestes grupos, os GAGs estavam sob um processo de degradação logo nos primeiros dias após a lesão. Por outro lado, em 21 dias todos os grupos lesionados apresentam quantidades aumentadas de GAGs, sugerindo que a síntese deste componente foi estimulada. Entretanto, ao observar os resultados de decorin, apenas os grupos VO₂₁ e SO₂₁ apresentaram aumento deste proteoglicano, indicando que os tenócitos elevaram a síntese de GAGs para tentar reestabelecer a produção de proteoglicanos, mas nos grupos L₂₁, VL₂₁ e SL₂₁ a produção normal de decorin não foi recuperada.

O crescimento lateral das fibrilas de colágeno é regulado principalmente pelo decorin, um proteoglicano abundante no tendão e pertencente à família dos pequenos proteoglicanos ricos em leucina (SLRP – *small leucine rich proteglycan*) (VOGEL; TROTTER, 1987; KALAMAJSKI; SOLDBERG, 2010). Neste trabalho as fibrilas de colágeno foram analisadas na fase de remodelamento, 21 dias após a lesão, período em que as fibrilas de colágeno se encontram em um estágio mais avançado de maturação. Especula-se que o decorin age predominantemente nesta fase (DUNKMAN *et al.*, 2014). No tendão normal foram observadas grandes quantidades de decorin e as fibrilas de colágeno são predominantemente mais grossas. Por outro lado, os grupos lesionados L₂₁, VL₂₁, SL₂₁ e VO₂₁ apresentaram menores quantidades de decorin e as fibrilas de colágeno são predominantemente finas, indicando que, nestes grupos, não houve um rearranjo adequado da matriz extracelular. Já o grupo SO₂₁ apresentou maiores quantidades de decorin e um padrão de fibrilas mais parecido com aquele observado no grupo normal, sugerindo que a sinvastatina por via oral tem um papel importante na síntese e remodelamento da matriz extracelular após uma lesão no tendão.

Apesar de existir fortes evidências que comprovam que a aplicação local de sinvastatina tem um efeito benéfico na recuperação de fraturas ósseas e na cicatrização de feridas (SKOGLUND; ASPENBERG, 2007; WANG *et al.*, 2007; REGO *et al.*, 2007; TOKER *et al.*, 2009), os resultados de birrefringência demonstraram que o tratamento local com sinvastatina não foi eficaz na recuperação da organização das fibras de colágeno do grupo SL₂₁. Por outro lado, o grupo VL₂₁ que recebeu a esponja de colágeno embebida com carboximetilcelulose apresentou uma melhora discreta da organização das fibras de colágeno quando comparado com os outros grupos lesionados. O colágeno é biodegradável, possui

propriedades biológicas importantes e vem sendo empregado como biomaterial na regeneração de diversos tecidos (SPEER *et al.*, 1979; ANSELME *et al.*, 1990; DE VRIES *et al.*, 1994; STONE *et al.*, 1997; KAMPEN *et al.*, 2013). Sendo assim, nossos resultados sugerem que a esponja de colágeno absorvível utilizada neste estudo teve um efeito positivo na organização do colágeno.

Nossos resultados demonstraram que o tratamento por via oral com sinvastatina teve efeitos favoráveis na avaliação funcional, tendo em vista que os animais dos grupos SO₇ e SO₂₁ exerceram uma pressão maior da pata na plataforma durante a marcha, com valores mais próximos daqueles obtidos antes da lesão. Estes resultados são consistentes com os achados de IL-1 β um dia após a lesão, uma vez que esta citocina apresenta um papel fundamental na mediação da dor durante a inflamação aguda. Os níveis reduzidos de IL-1 β no grupo que recebeu sinvastatina por via oral indicam que o medicamento foi responsável por apresentar um efeito anti-inflamatório e analgésico nos primeiros dias após a lesão.

Em nosso estudo, o tratamento com sinvastatina no local da lesão não foi eficaz como o tratamento por via oral na recuperação da marcha dos animais. Nossa hipótese inicial foi que a sinvastatina por se tratar de um pró-fármaco, deve ser ingerida por via oral na forma de beta lactona, e só depois hidrolisada em sua forma ativa no fígado (CORSINI *et al.*, 1995) para então exercer seus efeitos analgésico e anti-inflamatório. Entretanto, a sinvastatina também sofre hidrólise e é ativada por uma carboxiesterase presente no plasma (VREE *et al.*, 2003). No plasma de ratos, Nishimuta e colaboradores (2014) concluíram que a hidrólise de pró-fármacos é bastante evidente. Portanto, outra hipótese que podemos levantar é que a quantidade de sinvastatina aplicada no local da lesão foi muito alta e grande parte continuou em sua forma inativa ou ainda, mesmo que a sinvastatina tenha sido quase totalmente ativada pela enzima plasmática, é possível que tenha exercido um efeito irritativo no local da lesão, prejudicando uma recuperação eficaz do tecido. Portanto, mais estudos com aplicação local de sinvastatina após lesão do tendão são necessários, no entanto, os resultados deste trabalho fornecem uma base para futuras investigações.

6. CONCLUSÕES

- O tratamento com sinvastatina no local da lesão não favorece uma cicatrização eficaz do tendão;
- Nossos resultados fornecem evidências que a sinvastatina administrada por via oral tem um grande potencial para ser utilizada como terapia após lesões em tendões;
- Na fase de remodelamento, a sinvastatina por via oral tem efeito modulatório tanto na síntese, degradação e deposição do colágeno bem como na atividade de MMPs, o que resulta em uma melhor organização das fibras de colágeno;
- O tratamento por via oral com sinvastatina apresenta uma resposta funcional positiva, principalmente nos primeiros dias após a lesão, devido ao seu efeito anti-inflamatório e analgésico.

7. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, M. S.; ARO, A. A.; GUERRA, F. R.; VIEIRA, C.P.; VIDAL, B. C.; PIMENTEL, E. R. Electroacupuncture increases the concentration and organization of collagen in a tendon healing model in rats. **Connect Tissue Res.** 53(6):542-7, 2012.
- ANDARAWIS-PURI, N.; FLATOW, E. L.; SOSLOWSKY, L. J. Tendon basic science: Development, repair, regeneration, and healing. **J Orthop Res.** 33(6):780-4, 2015.
- ANSELME K, BACQUES C, CHARRIERE G, HARTMAN DJ, HERBAGE D, GARRONE R. Tissue reaction to subcutaneous implantation of a collagen sponge. A histological, ultrastructural, and immunological study. **J Biomed Mater Res.** 24:689-703, 1990.
- ASAI, J.; TAKENAKA, H.; HIRAKAWA, S.; SAKABE, J.; HAGURA, A.; KISHIMOTO, S.; MARUYAMA, K.; KAJIYA, K.; KINOSHITA, S.; TOKURA, Y.; KATOH N. Topical simvastatin accelerates wound healing in diabetes by enhancing angiogenesis and lymphangiogenesis. **Am J Pathol.** 181(6):2217-24, 2012.
- ARO, A. A.; FREITAS, K. M.; FOGLIO, M. A.; CARVALHO, J. E.; DOLDER, H.; GOMES, L.; VIDAL, B. C.; PIMENTEL, E. R. Effect of the *Arrabidaea chica* extract on collagen fiber organization during healing of partially transected tendon. *Life Sci.* 19;92(13):799-807, 2013.
- ARO, A. A.; PEREZ, M. O.; VIEIRA, C. P.; ESQUISATTO, M. A.; RODRIGUES, R. A.; GOMES, L.; PIMENTEL, E. R. Effect of *Calendula officinalis* cream on achilles tendon healing. **Anat Rec.** 298(2):428-35, 2015.
- BARSANTE, M. M.; ROFFE, E.; YOKORO, C. M.; TAFURI, W. L.; SOUZA, D. G.; PINHO, V.; CASTRO, M. S. A.; TEIXEIRA, M. M. Anti-inflammatory and analgesic effects of atorvastatin in a rat model of adjuvant-induced arthritis. **European Journal of Pharmacology.** 516:282 – 289, 2005.

BARTER, M. J.; HUI, W.; LAKEY, R. L.; CATTERALL, J. B.; CAWSTON, T. E.; YOUNG, D. A. Lipophilic statins prevent matrix metalloproteinase-mediated cartilage collagen breakdown by inhibiting protein geranylgeranylation. **Ann Rheum Dis.** 69(12):2189-98, 2010.

BERSOT, T. P. Terapia Farmacológica para hipercolesterolemia e dislipidemia. In: GILMAN, A. G. (eds.) *As bases Farmacológicas da Terapêutica*. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 12ª Ed. 2012. cap. 31, p. 877-908.

BLANCO-COLIO, L. M.; TUÑÓN, J.; MARTÍN-VENTURA, J. L.; EGIDO, J. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of statins. **Kidney International.** 63:12–23, 2003.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry.** 72: 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. *Relação Nacional de Medicamentos Essenciais : RENAME 2014*. 9. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2015. 228p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Portaria nº 111, de 28 de janeiro de 2016. Dispõe sobre o Programa Farmácia Popular do Brasil (PFPB). *Diário Oficial da União*; Poder Executivo, 2016.

CALIXTO, J. C.; LIMA, C. E. V. C.; FREDERICO, L.; LIMA, R. P. S. C.; ANBINDER, A. L. The influence of local administration of simvastatin in calvarial bone healing in rats.

Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery. v.39, p. 215-220, 2011.

CAMPBELL, B. H.; AGARWAL, C.; WANG, J. H. TGF-beta1, TGF-beta3, and PGE(2) regulate contraction of human patellar tendon fibroblasts. **Biomech Model Mechanobiol.** 2(4):239-45, 2004.

CAMPO, V. L.; CARVALHO, I. Estatinas hipolipêmicas e novas tendências terapêuticas; **Quim Nova.** 2: 425-430, 2007.

CHANG, J.; THUNDER, R.; MOST, D.; LONGAKER, M. T.; LINEAWEAVER, W. C. Studies in flexor tendon wound healing: neutralizing antibody to TGF-beta1 increases postoperative range of motion. **Plast Reconstr Surg.** 105(1):148-55, 2000.

CHEN, Y. J.; CHANG, L. S. Simvastatin induces NFκB/p65 down-regulation and JNK1/c-Jun/ATF-2 activation, leading to matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) but not MMP-2 down-regulation in human leukemia cells. **Biochem Pharmacol.** 92(4):530-43, 2014.

CORSINI, A.; MAGGI, F. M.; CATAPANO, A.L. Pharmacology of competitive inhibitors of HMG-CoA reductase. **Pharmacol. Res.** 31:9–27. 1995.

DAHLGREN, L. A. Pathobiology of Tendon and Ligament Injuries. **Clinical Techniques in Equine Practice.** p. 168 – 173, 2007.

DAVIS, M. E.; GUMUCIO, J. P.; SUGG, K. B.; BEDI, A.; MENDIAS, C. L. MMP inhibition as a potential method to augment the healing of skeletal muscle and tendon extracellular matrix. **J Appl Physiol.** 115(6):884-91, 2013.

DE VRIES, H. J. C.; MIDDELKOOP, E.; MEKKES, J. R.; DUTRIEUX, R. P.; WILDEVUUR, C. H. R.; WESTERHOF, W. Dermal regeneration in native non cross-linked collagen sponges with different extracellular matrix molecules. **Wound Repair Regen.** 2:37-

47, 1994.

DOCHEVA, D.; MÜLLER, S. A.; MAJEWSKI, M.; EVANS, C. H. Biologics for tendon repair. **Adv Drug Deliv Rev.** 84:222-39, 2015.

DOLKART, O.; LIRON, T.; CHECHIK, O.; SOMJEN, D.; BROSH, T.; MAMAN, E.; GABET, Y. Statins enhance rotator cuff healing by stimulating the COX2/PGE2/EP4 pathway: an in vivo and in vitro study. **Am J Sports Med.** 42(12):2869-76, 2014.

DUNKMAN, A.A.; BUCKLEY, M.R.; MIENALTOWSKI, M.J.; ADAMS, S.M.; THOMAS, S.J.; KUMAR, A.; BEASON, D.P.; IOZZO, R.V.; BIRK, D.E.; SOSLOWSKY, L.J. The Injury Response of Aged Tendons in the Absence of Biglycan and Decorin. **Matrix Biol.** Apr; 35: 232–238, 2014.

ESENKAYA, I.; SAKARYA, B.; UNAY, K.; ELMALI, N.; AYDIN, NE. The influence of atorvastatin on tendon healing: an experimental study on rabbits. **Orthopedics.** 9;33(6):398, 2010.

ESENKAYA, I.; UNAY, K. Tendon, tendon healing, hyperlipidemia and statins. **Muscles Ligaments Tendons J.** 1(4): 169–171, 2011.

FALCONE, D.; GALLELLI, L.; DI VIRGILIO, A.; TUCCI, L.; SCARAMUZZINO, M.; TERRACCIANO, R.; PELAIA, G.; SAVINO, R. Effects of simvastatin and rosuvastatin on RAS protein, matrix metalloproteinases and NF- κ B in lung cancer and in normal pulmonary tissues. **Cell Prolif.** 46(2):172-82, 2013.

GAZZERRO, P.; PROTO, M. C.; GANGEMI, G.; MALFITANO, A. M.; CIAGLIA, E.; PISANTI, S.; SANTORO, A.; LAEZZA, C.; BIFULCO, M. Pharmacological Actions of Statins: A Critical Appraisal in the Management of Cancer. **Pharmacol Rev.** 64:102–146, 2012.

GELSE, K.; PÖSCHL, E.; AIGNER, T. Collagens--structure, function, and biosynthesis. **Adv Drug Deliv Rev.** 28;55(12):1531-46, 2003.

GIUSTI-PAIVA, A.; MARTINEZ, M. R.; FELIX, J. V. C.; ROCHA, M. J. A.; CARNIO, E. C.; ELIAS, L. L. K.; ANTUNES-RODRIGUES, J. Simvastatin decreases Nitric Oxide overproduction and reverts the impaired vascular responsiveness induced by endotoxic shock in rats. **Schok.** 21 (3): 271-275, 2004.

GOTTO, A.; FARMER, J. Heart Protection Study: expanding the boundaries for high-risk coronary disease prevention. **Am J Cardiol.** 92: 3i-9i, 2003.

GREENWOOD, J.; STEINMAN, L.; ZAMVIL, S. S. Statin therapy and autoimmune disease: from protein prenylation to immunomodulation. **Nat Rev Immunol.** 6(5):358-70, 2006.

GUERRA, F. D.; VIEIRA, C. P.; ALMEIDA, M. S.; OLIVEIRA, L. P.; CLARO, A. C. F.; SIMÕES, G. F.; OLIVEIRA, A. L. R.; PIMENTEL, E. R. Pulsed LLLT improves tendon healing in rats: a biochemical, organizational, and functional evaluation. **Lasers Med Sci.** 29(2):805-11, 2013.

GUERRA F. R.; VIEIRA CP, ALMEIDA MS, OLIVEIRA LP, DE ARO AA, PIMENTEL ER. LLLT improves tendon healing through increase of MMP activity and collagen synthesis. **Lasers Med Sci.** 28(5):1281-8, 2013.

GUERRA, R.F.; VIEIRA, C. P.; OLIVEIRA, L. P.; MARQUES, P. P.; ALMEIDA, M. S.; PIMENTEL, E. R. Low-level laser therapy modulates pro-inflammatory cytokines after partial tenotomy. **Lasers Med Sci.** 31(4):759-66, 2016.

HAYEM, G. Tenology: a new frontier. **Joint Bone Spine.** v.68, p.19-25, 2001.

HEINERGARD, D. ; SOMMARIN. Isolation and characterization of proteoglycans. **Methods in Enzymol.** 144: 319-373, 1987.

HOPE, M.; SAXBY, T. S. Tendon Healing. **Foot Ankle Clin N Am.** v.12, p.553–567, 2007.

HOU, Y.; MAO, Z.; WEI, X.; LIN, L.; CHEN, L.; WANG, H.; FU, X.; ZHANG, J.; YU, C. The Roles of TGF-beta1 Gene Transfer on Collagen Formation During Achilles Tendon Healing. **Biochem Biophys Res Commun.** 383 (2), 235-239, 2009.

ISSA, J. P.; INGRACI DE LUCIA, C.; DOS SANTOS KOTAKE, B. G.; GONÇALVES GONZAGA, M.; TOCCHINI DE FIGUEIREDO, F. A.; MIZUSAKI IYOMASA, D.; MACEDO, A. P.; ERVOLINO, E. The effect of simvastatin treatment on bone repair of femoral fracture in animal model. **Growth Factors.** 33(2):139-48, 2015.

IZIDORO-TOLEDO, T. C.; GUIMARÃES, D. A.; BELO, V. A.; GERLACH, R. F.; TANUS-SANTOS, J. E. Effects of statins on matrix metalloproteinases and their endogenous inhibitors in human endothelial cells. **Naunyn-Schmied Arch Pharmacol.** 383:547–554, 2011.

JADHAV, S. B.; JAIN, G. K. Statins and osteoporosis: new role for old drugs. **Journal of Pharmacy and Pharmacology.** v.58, p.3-18, 2006.

JAIN, M. K.; RIDKER, P. M. Anti-Inflammatory Effects of Statins: Clinical Evidence and Basic Mechanisms. **Nature Reviews | Drug Discovery.** v.4, p.977-987, 2005.

JAMES, R.; KESTURU, G.; BALIAN, G.; CHHABRA, A. B. Tendon: Biology, Biomechanics, Repair, Growth Factors, and Evolving Treatment Options. **JHS.** Vol 33A, p. 102-112, 2008.

JÄRVINEN, T. A. H.; KANNUS, P.; MAFFULLI, N.; KHAN, K. M. Achilles Tendon Disorders: Etiology and Epidemiology. **Foot Ankle Clin N Am.** 10:255– 266, 2005.

JONES, C.G., CORPS, A.N., PENNINGTON, C.J., CLARK, I.M., EDWARDS, D.R., BRADLEY, M.M., HAZLEMAN, B.L., RILEY, G.P. Expression profiling of metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in normal and degenerate human Achilles tendon. **Arthritis Rheum.** 54 (3), 832–842, 2006.

JOWKAR, F.; NAMAZI, M. R. Statins in dermatology. **International Journal of Dermatology.** 49, 1235–1243, 2010.

JUNGE, C., AMBRÓSIO, J.D. ; DEL SOL, C.M.: Contribuição para o estudo do tendão calcâneo no homem. **Anais Anat Nor.** 5: 185-187, 1987.

JUNQUEIRA, L. C. ; CARNEIRO, J. Histologia Básica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 11ª Ed. 2008. cap. 5, p. 91-123.

KADER, D.; MOSCONI, M.; BENAZZO, F.; MAFFULLI, N. Achilles Tendon Rupture. Tendon Injuries. Part II. p. 187-200, 2005.

KALAMAJSKI, S.; OLDBERG, A. The role of small leucine-rich proteoglycans in collagen fibrillogenesis. **Matrix Biol.** 29(4):248-53, 2010.

KAMIO, K.; LIU, X.D.; SUGIURA, H.; TOGO, S.; KAWASAKI, S.; WANG, X.; AHN, Y.; HOGABOAM, C.; RENNARD, S.I. Statins inhibit matrix metalloproteinase release from human lung fibroblasts. **Eur Respir J.** 35: 637–646, 2010.

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

320, 2000.

KAROUSOU, E., RONGA, M., VIGETTI, D., PASSI, A., MAFFULLI, N. Collagens, proteoglycans, MMP-2, MMP-9 and TIMPs in human Achilles tendon rupture. **Clin. Orthop. Relat. Res.** 466, 1577–1582, 2008.

KHAN; K. M.; COOK, J. L.; BONAR, F.; HARCOURT, P.; ASTROM, M. Histopathology of common tendinopathies. Update and implications for clinical management. **Sports Med.** 27: 393-408, 1999.

KHOSHNEVISZADEH, M.; ASHKANI-ESFAHANI, S.; NAMAZI, M.R.; NOORAFSHAN, A.; GERAMIZADEH, B.; MIRI, R. Topical simvastatin enhances tissue regeneration in full-thickness skin wounds in rat models. **Iran J Pharm Res.** 13(1):263-9, 2014.

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

KOSHIMA, H.; KONDO, S.; MISHIMA, S.; CHOI, H. R.; SHIMPO, H.; SAKAI, T.; ISHIGURO, N. Expression of interleukin-1beta, cyclooxygenase-2, and prostaglandin E2 in a rotator cuff tear in rabbits. **J Orthop Res.** 25(1):92-7, 2007.

KUZMA-KUZNIARSKA, MARIA; HANNAH R. CORNELL, MICHAEL C. MONEKE, ANDREW J. CARR, PHILIPPA A. HULLEY. Lovastatin-mediated changes in human tendon cells. **J Cell Physiol.** 2015.

LEE, D. K.; PARK, E. J.; KIM, E. K.; JIN, J.; KIM, J. S.; SHIN, I. J.; KIM, B. Y.; LEE, H.; KIM, D. E. Atorvastatin and simvastatin, but not pravastatin, up-regulate LPS-induced MMP-9 expression in macrophages by regulating phosphorylation of ERK and CREB. **Cell Physiol Biochem.** 30(3):499-511, 2012.

LESIC, A.; BUMBASIREVIC, M. Disorders of the Achilles tendon. **Current Orthopaedics**. v.18, p.63–75, 2004.

LIAO, J. K.; LAUFS, U. Pleiotropic effects of statins. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**. 45: 89-118, 2005.

LI, D. D.; PANG, H. G.; SONG, J. N.; HUANG, H.; ZHANG, M.; ZHAO, Y. L.; SUN, P.; ZHANG, B. F.; MA, X. D. The rapid lipopolysaccharide-induced release of matrix metalloproteinases 9 is suppressed by simvastatin. **Cell Biol Int**. 39(7):788-98, 2015.

LIU, Y.; RAMANATH, H. S.; WANG, D. A. Tendon tissue engineering using scaffold enhancing strategies. **Trends Biotechnol**. 26(4):201-9, 2008.

MAFFULLI, N.; MOLLER, H. D. Optimization of Tendon Healing. Tendon Injuries, Part II. p.304-306, 2005.

MAFFULLI, N.; BUONO, A. D.; SPIEZIA, F.; LONGO, U. G.; DENARO, V. Light microscopic histology of quadriceps tendon ruptures. **Int Orthop**. 36(11):2367-71, 2012.

MAGALHÃES, M. E. C. Mecanismos de rabdomiólise com as estatinas. **Arq.Bras Cardiol**. v. 85, p. 42-44, 2005.

MARON, D. J.; FAZIO, S.; LINTON, M. F. Current Perspectives on Statins. **Circulation**. 101: 207-213, 2000.

MARQUETI, R. C.; PARIZOTTO, N. A.; CHRIGUER, R.S.; PEREZ, S. E. A; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S. Androgenic-anabolic steroids associated with mechanical loading inhibit matrix metalloproteinase activity and affect the remodeling of the Achilles tendon in rats. **The American Journal of Sports Medicine**. 34 (8): 1274-1280, 2006.

MACH, F. Statins as immunomodulators. **Transplant Immunology**. v.9, p.197–200, 2002.

MAGRA, M.; MAFFULLI, N. Molecular Events in Tendinopathy: A Role for Metalloproteases. **Foot Ankle Clin**. 10 (2), 267-277, 2005.

MIHOS, C. G.; SANTANA, O. Pleiotropic effects of the HMG-CoA reductase inhibitors. **Int J Gen Med**. 4: 261–271, 2011.

MOLLOY, T.; WANG, Y.; MURRELL, G. The roles of growth factors in tendon and ligament healing. **Sports Med**. 33(5):381-94, 2003.

MOVIN, T.; RYBERG, A.; McBRIDE, D. J.; MAFFULLI, N. Acute Rupture of the Achilles Tendon. **Foot Ankle Clin N Am**. v.10, p.331– 356, 2005.

MUN, J. H.; KIM, Y. M.; KIM, B. S.; KIM, J. H.; KIM, M. B.; KO, H. C. Simvastatin inhibits transforming growth factor- β 1-induced expression of type I collagen, CTGF, and α -SMA in keloid fibroblasts. **Wound Repair Regen**. 22(1):125-33, 2014.

MUNDY, G.; GARRETT, R.; HARRIS, S.; CHAN, J.; CHEN, D.; ROSSINI, G.; BOYCE, B.; ZHAO, M.; GUTIERREZ, G. Stimulation of Bone Formation in Vitro and in Rodents by Statins. **Science**. v.286, p.1946-1949, 1999.

NISHIMUTA, H.; HOUSTON, J. B.; GALETIN, A. Hepatic, Intestinal, Renal, and Plasma Hydrolysis of Prodrugs in Human, Cynomolgus Monkey, Dog, and Rat: Implications for In Vitro–In Vivo Extrapolation of Clearance of Prodrugs. **Drug Metab Dispos**. 42:1522–1531, 2014.

O'BRIEN, M. Anatomy of Tendons. Tendon Injuries, Part I. p.3-13, 2005.

OKA, S.; MATSUMOTO, T.; KUBO, S.; MATSUSHITA, T.; SASAKI, H.; NISHIZAWA, Y.; MATSUZAKI, T.; SAITO, T.; NISHIDA, K.; TABATA, Y.; KUROSAKA, M.; KURODA, R. Local administration of low-dose simvastatin-conjugated gelatin hydrogel for tendon-bone healing in anterior cruciate ligament reconstruction. **Tissue Eng Part A**. 19(9-10):1233-43, 2013.

PACHALY, J. R.; BRITO, H.F.V. Interspecific Allometric Scaling. In: Fowler ME, Cubas P.R. Biology, Medicine and Surgery of South American Wild Animals, Ames. 1^a ed. Iowa University Press; 2001. P.475-481.

PENN, J. W.; GROBBELAAR, A. O.; ROLFE, K. J. The role of the TGF- β family in wound healing, burns and scarring: a review. **Int J Burns Trauma**. 2(1): 18–28, 2012.

PIEZ, K. A.; REDDI, A. H. **Extracellular matrix biochemistry**. New York: Elsevier, 1984.

PLATT, M. A. Tendon Repair and Healing. **Clin Podiatr Med Surg**. v.22, p.553-560, 2005.

RAIKIN, S. M.; GARRAS, D. N.; KRAPCHEV, P. V. Achilles Tendon Injuries in a United States Population. **Foot ; Ankle International**. 34(4) 475–480, 2013.

RAISER, A. G. Reparação do Tendão Calcâneo em Cães. **Ciência Rural**. v.31, n.2, p.351-359, 2001.

RAZAVIAN, M.; NIE, L.; CHALLA, A.; ZHANG, J.; GOLESTANI, R.; JUNG, J. J.; ROBINSON, S.; SADEGHI, M. M. Lipid lowering and imaging protease activation in atherosclerosis. **J Nucl Cardiol**. 21(2):319-28, 2014.

REGO, A. C. M.; FILHO, I. A.; DAMASCENO, B. P. G. L.; EGITO, E. S. T.; SILVEIRA, I.

A.; BRANDÃO-NETO, J.; MEDEIROS, A. C. Simvastatin improves the healing of infected skin wounds of rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v.22, p.57-63, 2007.

REID, T.; FLINT, M. H. Changes in glycosaminoglycan content of healing rabbit tendon. **J Embriol exp Morph**. 31(2):489-495, 1974.

REN, K.; TORRES, R. Role of interleukin-1 β during pain and inflammation. **Brain Res Rev**. 60(1): 57–64, 2009.

RILEY, G. P.; CURRY, V.; DEGROOT, J.; VAN EL, B.; VERZIIL, N.; HAZLEMAN, B. L.; BANK, R. A. Matrix metalloproteinase activities and their relationship with collagen remodelling in tendon pathology. **Matrix Biol**. 21(2):185-95, 2002.

ROSENZWEIG, S.; AZAR F. M. Open Repair of Acute Achilles Tendon Ruptures. **Foot Ankle Clin N Am**. v. 14, p.699–709, 2009.

RUSHINEK, H.; ALTERMAN, M.; LAVIV, A.; WEISS, EI.; FRIEDMAN, M.; CASAP, N. Topical application of slow-release simvastatin as a bone substitute in bone defects in the rat tibia: a pilot study. **Int J Oral Maxillofac Implants**. 29(2):e241-6, 2014.

SARAF, S. K.; SINGH, A.; GARBYAL, R. S.; SINGH, V. Effect of simvastatin on fracture healing—An experimental study. **Indian Journal of Experimental Biology**. v.45, p.444-449, 2007.

SATOH, M.; TAKAHASHI, Y.; TABUCHI, T.; MINAMI, Y.; TAMADA, M.; TAKAHASHI, K.; ITOH, T.; MORINO, Y.; NAKAMURA, M. Cellular and molecular mechanisms of statins: an update on pleiotropic effects. **Clinical Science**. 129 (2) 93-105, 2015.

SCHAAFSMA, D., DUECK, G., GHAVAMI, S., KROEKER, A., MUTAWE, M.M.,

HAUFF, K., XU, F.Y., MCNEILL, K.D., UNRUH, H., HATCH, G.M., HALAYKO, A.J. The mevalonate cascade as a target to suppress extracellular matrix synthesis by human airway smooth muscle. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.** 44, 394–403, 2011.

SCHONBECK, U.; LIBBY, P. Inflammation, immunity and HMG-CoA reductase inhibitors: statins as antiinflammatory agents? **Circulation.** 109 (21) Supl II18-II26, 2004.

SCHULZE-TANZIL, G.; AL-SADI, O.; WIEGAND, E.; ERTEL, W.; BUSCH, C.; KOHL, B.; PUFE, T. The role of pro-inflammatory and immunoregulatory cytokines in tendon healing and rupture: new insights. **Scand J Med Sci Sports.** 21: 337–351, 2011.

SHAH, S. R.; WERLANG, C. A.; KASPER, F. K.; MIKOS, A. G. Novel applications of statins for bone regeneration. **National Science Review.** 2: 85–99, 2015.

SHARMA, P.; MAFFULLI, N. Basic biology of tendon injury and healing. **Surgeon.** 3: 5; p.309-316, 2005.

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

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

SKOGLUND, B.; ASPENBERG, P. Locally applied Simvastatin improves fracture healing in mice. **BMC Musculoskeletal Disorders.** 8:98, 2007.

SKOGLUND, B.; FORSLUND, C.; ASPENBERG, P. Simvastatin Improves Fracture Healing in Mice. **J Bone Miner Res.** 17:2004–2008, 2002.

SPEER DP, CHVAPIL M, VOLZ RG, HOLMES MD. Enhancement of healing in osteochondral defects by collagen sponge implantation. **Clin Orthop.** 144:326-35, 1979.

STOJADINOVIC, O.; LEBRUN, E.; PASTAR, I.; KIRSNER, R.; DAVIS, S. C.; TOMIC-CANIC, M. Statins as potential therapeutic agents for healing disorders. **Expert Rev. Dermatol.** 5(6), 689–698, 2010.

STONE KR, STEADMAN JR, RODKEY WG, LI ST. Regeneration of a meniscal cartilage with use of a collagen scaffold: analysis of preliminary data. **J Bone Jt Surg.** 79-A:1770-7, 1997.

SUKHOVA, G. K.; WILLIAMS, J.K.; LIBBY, P. Statins reduce inflammation in atheroma of nonhuman primates independent of effects on serum cholesterol. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 22: 1452-1458, 2002.

SUZUKI-BANHESSE, V. F.; AZEVEDO, F. F.; ARAUJO, E. P.; DO AMARAL, M. E.; CARICILLI, A. M.; SAAD, M. J.; LIMA, M. H. Effect of atorvastatin on wound healing in rats. **Biol Res Nurs.** 17(2):159-68, 2015.

THOMOPOULOS, S.; PARKS, W. C.; RIFKIN, D. B.; DERWIN, K. A. Mechanisms of tendon injury and repair. **J Orthop Res.** 33(6):832-9, 2015.

TOKER, S.; GULCAN, E.; ÇAYCI, M. K.; OLGUN, E. G.; ERBİLEN, E.; ÖZAY, Y. Topical Atorvastatin in the Treatment of Diabetic Wounds. **The American Journal of the Medical Sciences.** v.338, n.3, p. 201-204, 2009.

TOWBIN, H., STAEHELIN, T., GORDON, J. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v.76, n.9, p.4350-4354, 1979.

TURNER, N. A.; O'REGAN, D.J.; BALL, S. G.; PORTER, K. E. Simvastatin inhibits MMP-9 secretion from human saphenous vein smooth muscle cells by inhibiting the RhoA/ROCK pathway and reducing MMP-9 Mrna levels. **The FASEB Journal**. p. 1-25, 2005.

TZIAKAS, D. N.; CHALIKIAS, G. K.; STAKOS, D. A.; PAPANAS, N.; CHATZIKYRIAKOU, S. V.; MITROUSI, K.; MALTEZOS, E.; BOUDOULAS, H. Effect of statins on collagen type I degradation in patients with coronary artery disease and atrial fibrillation. **Am J Cardiol**. 15;101(2):199-202, 2008.

VAN KAMPEN, C.; ARNOCZKY, S.; PARKS, P.; HACKETT, E.; RUEHLMAN, D.; TURNER, A.; SCHLEGEL, T. Tissue-engineered augmentation of a rotator cuff tendon using a reconstituted collagen scaffold: a histological evaluation in sheep. **Muscles Ligaments Tendons J**. 3(3):229-35, 2013.

VIDAL, B. C. The part played by proteoglycans and structural lycoproteins in the macromolecular orientation of collagen bundles. **Cell Mol Biol**. 26:415–21, 1980.

VIDAL, B. C. Evaluation of the carbohydrate role in the molecular order of collagen bundles. Microphotometric measurements of textural birefringence. **Cell Mol Biol**. 32:527–35, 1986.

VIDAL, B.C.; MELLO, M. L. S. Optical anisotropy of collagen fibers of rat calcaneal tendons: an approach to spatially resolved supramolecular organization. **Acta Histochem**. 112:53–61, 2010.

VOGEL, K. G.; PAULSSON, M.; HEINEGARD, D. Specific inhibition of type I and type II collagen fibrillogenesis by the small proteoglycan of tendo. **Biochem. J**. 223, 587-597, 1984.

VOGEL K. G.; TROTTER J. A. The effect of proteoglycans on the morphology of collagen fibrils formed in vitro. **Collagen Rel. Res**. 7: 105–114, 1987.

VOLETI, P. B.; BUCKLEY, M. R.; SOSLOWSKY, L. J. Tendon Healing: Repair and Regeneration. **Annu. Rev. Biomed. Eng.** v.14, p.47–71, 2012.

VREE, T.B.; DAMMERS, E.; ULC, I.; HORKOVICS-KOVATS, S.; RYSKA, M.; MERKX, I. Differences between lovastatin and simvastatin hydrolysis in healthy male and female volunteers: gut hydrolysis of lovastatin is twice that of simvastatin. **Scientific World Journal.** 3:1332-43, 2003.

WANG, J. W.; XU, S. W.; YANG, D. S.; LV, R. K. Locally applied simvastatin promotes fracture healing in ovariectomized rat. **Osteoporos Int.** v.18, p.1641–1650, 2007.

WANG, C. C.; YANG, P. W.; YANG, S. F.; HSIEH, K. P.; TSENG, S. P.; LIN, Y. C. Topical simvastatin promotes healing of Staphylococcus aureus-contaminated cutaneous wounds. **Int Wound J.** 1-8, 2015.

WANG, W.; NYMAN, J. S.; MOSS, H. E.; GUTIERREZ, G.; MUNDY, G. R.; YANG, X.; ELEFTERIOU, F. Local low-dose lovastatin delivery improves the bone-healing defect caused by Nf1 loss of function in osteoblasts. **J Bone Miner Res.** 25(7):1658-67, 2010.

WONG, R. W.; RABIE, A. B. Statin collagen grafts used to repair defects in the parietal bone of rabbits. **Br J Oral Maxillofac Surg.** 41(4):244-8, 2003.

YANG, L.; GAO, Y. J.; LEE, R. M. The effects of quinapril and atorvastatin on artery structure and function in adult spontaneously hypertensive rats. **Eur J Pharmacol.** 518: 145-151, 2005.

YOON, J.H.; HALPER, J. Tendon proteoglycans: biochemistry and function. **Musculoskeletal Neuronal Interact.** 5(1):22-34, 2005.

YU, X.; PAN, Y.; MA, H.; LI, W. Simvastatin inhibits proliferation and induces apoptosis in human lung cancer cells. **Oncol Res.** 20(8):351-7, 2013.



CEUA/Unicamp

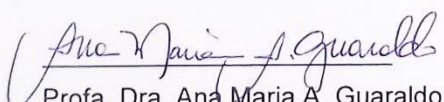
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

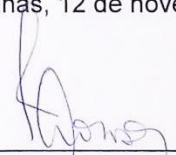
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Efeito do tratamento tópico e por via oral com sinvastatina na cicatrização de ruptura do tendão de Aquiles" (protocolo nº 2935-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel / Letícia Prado de Oliveira, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 12 de novembro de 2012.

Campinas, 12 de novembro de 2012.

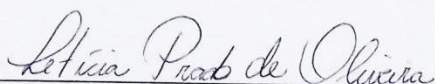

Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

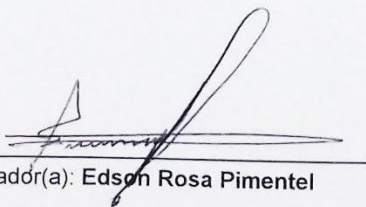

Fátima Alonso
Secretária Executiva

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **EFEITO DO TRATAMENTO TÓPICO E POR VIA ORAL COM SINVASTATINA NA CICATRIZAÇÃO DE RUPTURA DO TENDÃO DE AQUILES**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 01 de setembro de 2017

Assinatura : 
Nome do(a) autor(a): **Leticia Prado de Oliveira**
RG n.º 12563310

Assinatura : 
Nome do(a) orientador(a): **Edson Rosa Pimentel**
RG n.º 5017230