

ESTADIAMENTO DAS ALTERAÇÕES DA ESTRUTURA TENDÍNEA EM RATOS COM DIABETES EXPERIMENTAL.

Ana Camila Nobre de Lacerda Brito¹; Sílvia Regina Arruda de Moraes²

¹Estudante do Curso de Fisioterapia- CCS – UFPE; E-mail: britoanacamila@gmail.com,

²Docente/pesquisador do Depto de Anatomia – CCB – UFPE. E-mail: sramoraes@gmail.com.

Sumário: *Objetivos:* avaliar o momento inicial das alterações biomecânicas e estruturais do tendão do calcâneo de ratos induzidos ao diabetes experimental. *Materiais e Métodos:* 30 ratos, machos, *Wistar*, 100 dias, induzidos ao Diabetes com uma solução de estreptozotocina diluída em tampão citrato de sódio. Após a indução, cada semana, da primeira a quarta, foi coletado o tendão do calcâneo em 14 ratos, realizado o teste biomecânico, avaliando as seguintes propriedades: módulo elástico(MPa), tensão força máxima(MPa), deformação específica(%), energia/área de secção transversa(N.mm/mm²), força máxima(N) e área de secção transversa(mm²). Utilizou-se o software SPSS, teste ANOVA, *post hoc* teste de Tukey (p<0.05). *Resultados:* Não houve diferença na força máxima, tensão máxima, deformação força máxima e energia/área. A área de secção transversa e a deformação específica mostraram redução na 3ª semana pós-indução (sem.PI) (p=0,012; p=0,006, respectivamente) e na 4ªsem.PI (p=0,005; 0,008, respectivamente) comparado à 1ªsem.PI; a deformação específica apresentou redução também na 3ªsem.PI (p=0,002) e 4ªsem.PI (p=0,002) comparado à 2ªsem.PI. Em contrapartida, o módulo elástico foi maior na 3ªsem.PI (p=0,047) e 4ªsem.PI (p=0,032) comparado à 1ªsem.PI, além do aumento na 4ªsem.PI (p=0,036) comparado à 2ªsem.PI. *Conclusão:* observou-se alterações biomecânicas e estruturais do tendão a partir da 3ª semana pós-indução.

Palavras-chave: animais; diabetes *mellitus* experimental; fenômenos mecânicos; tendão do calcâneo

INTRODUÇÃO

O *Diabetes mellitus* (DM) configura-se hoje como uma epidemia mundial, traduzindo-se em grande desafio para os sistemas de saúde de todo o mundo. Em 2013 estima-se mais de 382 milhões de pessoas diabéticas em todo o mundo, tendo expectativa de alcançar 592 milhões em 2035 (GUARIGUATA *et al.*, 2014). Recentemente, uma revisão sistemática realizada por nosso laboratório, apontou a existência de associações entre disfunções musculoesqueléticas e DM, incluindo alterações na estrutura tendínea (DE OLIVEIRA *et al.*, 2011a). No aparelho locomotor, alterações provenientes do Diabetes podem contribuir para um declínio do estado geral de saúde dos indivíduos diabéticos (AKTURK *et al.*, 2002; AKTURK *et al.*, 2007), pois o acúmulo dos produtos finais da glicação não enzimática de proteínas em tecidos ricos em colágeno, como os tendões, pode desencadear alterações biomecânicas, tais como aumento da rigidez e do ponto de falha (REDDY, 2004; LI *et al.*, 2013), o que predispõe o mesmo a degeneração e ruptura (PAPANAS *et al.*, 2009; DE OLIVEIRA *et al.*, 2011b; FOX *et al.*, 2011; BOIVIN *et al.*, 2014), além de alterações vasculares do tendão do calcâneo compatíveis com a tendinopatia crônica, observada em ratos induzidos ao diabetes experimental (DE OLIVEIRA *et al.*, 2013). Embora já tenha sido demonstrada a existência de associações entre lesões periarticulares e musculoesqueléticas com o diabetes (DE OLIVEIRA *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2013), ainda não está elucidado a partir de que momento essas alterações se instalam na

estrutura tendínea. Desta forma, o presente estudo se propõe a determinar, a partir de um estadiamento, o momento em que se inicia o desencadeamento das alterações biomecânicas do tendão do calcâneo de ratos induzidos ao diabetes experimental.

MATERIAIS E MÉTODOS

No estudo foram utilizados 30 ratos *Wistar*, machos, mantidos no biotério de experimentação do Departamento de Anatomia/UFPE, condições padrão. Na idade de 100 dias apenas 24 animais foram pesados em uma balança de precisão (FILIZOLA BP6) e induzidos ao diabetes experimental, através de administração única, via intraperitoneal, de solução de Estreptozotocina (STZ – *Sigma ChemicalCo., St. Louis, MO*), diluída em tampão citrato de sódio, visto que houve falha na indução em seis animais. Em seguida os animais foram distribuídos aleatoriamente, através de números randômicos, em seis grupos de acordo com o número de semanas pós-indução em que os tendões foram coletados: Grupo 1ª semana pós-indução (1ª sem.PI) (n=4), Grupo 2ª semana pós-indução (2ª sem.PI) (n=4), Grupo 3ª semana pós-indução (3ª sem.PI) (n=4), Grupo 4ª semana pós-indução (4ª sem.PI) (n=4), Grupo 5ª semana pós-indução (5ª sem.PI) (n=4), Grupo 6ª semana pós-indução (6ª sem.PI) (n=4). Foram incluídos nesse estudo apenas animais que apresentaram glicose sanguínea acima de 200mg/dL (Carvalho *et al.*, 2003) no 3º e 7º dia pós-indução, sendo, portanto, dois animais excluídos nesta fase (um rato da 3ª sem.PI e um da 4ª sem.PI). Enquanto que oito animais morreram antes de completar cinco dias após a indução (quatro ratos da 5ª sem.PI e quatro animais da 6ª sem.PI).

A cada semana após a indução, da 1ª a 4ª semana, os animais de cada grupo tiveram seus pesos corpóreos aferidos, em seguida anestesiados, tiveram o tendão do calcâneo esquerdo coletado e dissecado. Posteriormente, a amostra tendínea foi encaminhada ao Laboratório de Biopolímeros do Departamento de Engenharia Química (UFPE) para realização do ensaio mecânico de tração, máquina convencional de ensaio mecânico (EMIC, Modelo DL 500, Brasil), com célula de carga de 500N. O tendão do calcâneo foi conectado à máquina através de garras auto-travantes na posição anatômica e teve seu comprimento mensurado com auxílio de um paquímetro (Vernier Calipers, 0,05mm). A partir daí foi realizado a tração do corpo de prova, à velocidade de 0,1mm/s até seu ponto de falha. Foram avaliadas as seguintes propriedades biomecânicas e estruturais: módulo elástico (MPa), tensão força máxima (MPa), deformação específica (%), energia/área de secção transversa (N.mm/mm²), força máxima (N) e área de secção transversa (mm²).

Para análise estatística dos dados foi utilizado o software SPSS versão 17, e foi empregada a Análise de Variância (ANOVA one-way), seguida pelo *post hoc* Tukey, adotou-se o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$) e os resultados foram expressos em média e desvio padrão.

RESULTADOS

Não houve diferença no peso corporal no dia da indução ao diabetes experimental e na evolução glicêmica entre os grupos avaliados. No entanto, o peso corporal final mostrou-se menor na 3ª sem.PI e 4ª sem.PI quando comparado com a 1ª sem.PI ($p=0,046$; $p=0,024$, respectivamente), apresentou-se também diminuído na 3ª sem.PI e 4ª sem.PI quando comparado a 2ª sem.PI ($p=0,046$; $p=0,024$, respectivamente). A força máxima, tensão na força máxima máxima e energia/área de secção transversa não diferiram entre os grupos avaliados. A área de secção transversa mostrou-se menor na 3ª sem.PI ($p=0,012$) e na 4ª sem.PI ($p=0,005$) comparado à 1ª sem.PI; a deformação específica mostrou-se menor na 3ª sem.PI ($p=0,006$) e 4ª sem.PI ($p=0,008$) comparado à 1ª sem.PI, foi menor também na 3ª sem.PI ($p=0,002$) e 4ª sem.PI ($p=0,002$) comparado à 2ª sem.PI; o módulo elástico foi

maior na 3ª sem.PI ($p=0,047$) e 4ª sem.PI ($p=0,032$) comparado à 1ª sem.PI, bem como foi maior na 4ª sem.PI ($p=0,036$) comparado à 2ª sem.PI

DISCUSSÃO

Entre o 3º e o 7º dia pós-indução, 33,33% ($n=8$) dos animais diabéticos morreram, provavelmente pela toxicidade da droga e/ou pela debilidade provocada pelo diabetes experimental, como constatado em outros estudos, os quais relataram perdas de animais logo após a indução e/ou durante o acompanhamento do experimento (DELFINO *et al.*, 2002).

Os dados da presente pesquisa demonstraram a redução da área de secção transversa e do peso corporal dos animais a partir da terceira semana pós-indução ao diabetes experimental. Diferenças na área de secção transversa não devem ser atribuídas apenas a alterações nos componentes de colágeno ou processo degenerativo do tendão, pois há correlação substancial entre a área de secção transversa e peso corporal de animais diabéticos (DE OLIVEIRA *et al.*, 2011b). Percebe-se que concomitante a diminuição da área de secção transversa a partir da terceira semana pós-indução, tem-se um aumento sutil, mas sem diferença estatística, da tensão máxima, visto que estes parâmetros são inversamente proporcionais, o que justifica a força máxima não ter apresentado diferença ao longo do tempo.

O aumento do módulo elástico a partir da terceira semana pós-indução ao diabetes experimental pode ser justificado pelas alterações permanentes nos componentes da matriz extracelular do tendão provenientes da hiperglicemia prolongada, como a redução dos níveis de proteoglicanos e aumento do número de *cross-links* entre as fibras de colágeno que são responsáveis por mudanças nas propriedades visco-elásticas dos tendões (CHBINOU e FRENETTE, 2004; BURNER *et al.*, 2012), caracterizando a tendinopatia diabética (GRANT *et al.*, 1997; REDDY *et al.*, 2002; DE OLIVEIRA *et al.*, 2011a). Em contrapartida, foi demonstrado redução da capacidade de deformação específica concomitante ao aumento do módulo elástico (aumento da rigidez) demonstrando que os tendões de ratos diabéticos são rígidos, porém frágeis, pois rompem-se com baixo deslocamento e possuem alta resistência mecânica quando submetidos a tensão.

Embora não tenha sido feita a comparação com grupo controle, constituído de animais saudáveis, é possível refletir que o diabetes pode não ser o único fator interferindo no aumento da rigidez dos tendões. No entanto, De Oliveira e colaboradores (2013) identificaram desequilíbrio homeostático resultando em hiperplasia vascular, desorganização colágenas e aumento da expressão do fator de crescimento endotelial que está relacionado ao processo de degeneração crônica em ratos com vinte e quatro dias (acima de três semanas) pós-indução ao diabetes experimental, caracterizando o quadro de tendinopatia diabética.

CONCLUSÕES

Os resultados da presente pesquisa sugerem que a terceira semana pós-indução ao diabetes experimental pode ser considerada como ponto de partida para o início das alterações que caracterizam a tendinopatia diabética experimental, visto que a partir desta semana foram identificadas alterações biomecânicas e estruturais do tendão do calcâneo, tornando os tendões mais susceptíveis a degeneração e ruptura quando submetidos à tensão.

AGRADECIMENTOS

Ao apoio financeiro prestado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) edital universal 14/2011 (processo 476815/2011-8). Integrantes do Laboratório de Plasticidade Neuromuscular (UFPE). Aos integrantes do Laboratório de

Biopolímeros do Departamento de Engenharia Química (UFPE) onde foi realizado o ensaio biomecânico da amostra tendínea.

REFERÊNCIAS

- AKTURK, M., KARAAHMETOGLU, S., KACAR, M., MUFTUOGLU, O. Thickness of the supraspinatus and biceps tendons in diabetic patients. **Diabetes care**, v.25, n.2, p.408, 2002.
- AKTURK, M., OZDEMIR, A., MARAL, I., YETKIN, I., ARSLAN, M. Evaluation of achilles tendon thickening in type 2 diabetes mellitus. **Exp clin endocrinol diabetes**, v. 115, n. 2, p. 92-96, 2007.
- BOIVIN, G.P, ELENES, E.Y., SCHULTZE, A.K., CHODAVARAPU, H., HUNTER, S.A, ELASED, K.M. Biomechanical properties and histology of db / db diabetic mouse achilles tendon. **Muscles, ligaments and tendons journal**, v. 4, n. 3, p. 280-284, 2014.
- BURNER, T., GOHR, C., MITTON-FITZGERALD, E., ROSENTHAL, A.K. Hyperglycemia reduces proteoglycan levels in tendons. **Connective tissue research**, v. 53, n.6, p.535-541, 2012..
- CHBINOU, N., FRENETTE, J. Insulin-dependent diabetes impairs the inflammatory response and delays angiogenesis following achilles tendon injury. **American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology**, v.286, n.5, R952-7, 2004.
- DE OLIVEIRA, R., LEMOS, A., DE CASTRO SILVEIRA, P., DA SILVA, R., DE MORAES, S. Alterations of tendons in patients with diabetes mellitus: a systematic review. **Diabetic medicine**, v. 28, p. 886–895, 2011.
- DE OLIVEIRA, R.R., BEZERRA, M.A., DE LIRA, K.D.S., NOVAES, K.A., TEIXEIRA, M.H.B.I., CHAVES, C.C., MORAES, S.R.A. Aerobic physical training restores biomechanical properties of achilles tendon in rats chemically induced to diabetes mellitus. **Journal of diabetes and its complications**, v.26, p.163-168, 2012.
- DE OLIVEIRA, R.R., DE LIRA, K.D.S., SILVEIRA, P.V.C., COUTINHO, M.P.G., MEDEIROS, M.N., TEIXEIRA, M.F.H.B.I., DE MORAES, S.R.A. Mechanical properties of achilles tendon in rats induced to experimental diabetes. **Annals of biomedical engineering**, v.39, n.5, p.1528-34, 2011.
- DE OLIVEIRA, R.R., MARTINS, C.S., ROCHA, Y.R., BRAGA, A.B.R., MATTOS, R.M., HECHT, F., BRITO, G.A.C., NASCIUTTI, L.E. Experimental diabetes induces structural, inflammatory and vascular changes of achilles tendons. **Plos one**, v.8, n.10, p.1-8, 2013.
- DELFINO, V.D.A.; FIGUEIREDO, J.F.; MATSUO, T.; FAVERO, M.E.; MATNI, A.M.; MOCELIN, A.L. Diabetes mellitus induzido por estreptozotocina: comparação em longo prazo entre duas vias de administração. **J. Bras. Nefrol**, v.24, n.1, p.31-36, 2002.
- FOX, A.J.S., BEDI, A., DENG, X., YING, L., HARRIS, P.E., WARREN, R.F., RODEO, S.A. Diabetes mellitus alters the mechanical properties of the native tendon in an experimental rat model. **Journal of orthopaedic research**, v.29, n.6, p.880-5, 2011..
- GRANT, W.P., SULLIVAN, R., SONENSHINE, D.E., ADAM, M., SLUSSER, J.H., CARSON, K.A., VINIK, A.I. Electron microscopic investigation of the effects of diabetes mellitus on the achilles tendon. **J foot ankle surg**, v.36, n.4, p.272-8, 1997.
- GUARIGUATA, L., WHITING, D.R., HAMBLETON, I., BEAGLEY, J., LINNENKAMP, U., SHAW, J.E. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. **Diabetes research and clinical practice**, v.103, n.2, p.137-149, 2014.
- LI, Y., FESSEL, G., GEORGIADIS, M., SNEDEKER, J.G. Advanced glycation end-products diminish tendon collagen fiber sliding. **Matrix biology**, v.32, p.169-177, 2013.
- PAPANAS, N., COURCOUTSAKIS, N., PAPTHEODOROU, K., DASKALOGIANNAKIS, G., MALTEZOS, E., PRASSOPOULOS, P. Achilles tendon volume in type 2 diabetic patients with or without peripheral neuropathy: mri study. **Exp clin endocrinol diabetes**, v.117, p.645–648, 2009.
- REDDY G.K., STEHNO-BITTEL L., ENWEMEKA C.S. Glycation-induced matrix stability in the rabbit achilles tendon. **Arch biochem biophys**, v.15, n.2, p.174-180, 2002.
- REDDY, G.K. Cross-linking in collagen by nonenzymatic glycation increases the matrix stiffness in rabbit achilles tendon. **Experimental diab**, Res. 5, p.143-53, 2004.