

UNIVERSIDADE TIRADENTES  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**EFEITO TÓPICO DO ÓLEO ESSENCIAL DA *Alpinia zerumbet* NO PROCESSO DE  
REPARO TECIDUAL PÓS LESÃO PARCIAL DO TENDÃO CALCÂNEO EM RATOS**

**TÁSSIA VIRGÍNIA DE CARVALHO OLIVEIRA**

ARACAJU  
Dezembro – 2017

UNIVERSIDADE TIRADENTES  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**EFEITO TÓPICO DO ÓLEO ESSENCIAL DA *Alpinia zerumbet* NO PROCESSO DE REPARO TECIDUAL PÓS LESÃO PARCIAL DO TENDÃO CALCÂNEO EM RATOS**

Tese de doutorado submetida à banca examinadora da defesa como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Saúde e Ambiente, na área de concentração em Saúde e Ambiente.

**TÁSSIA VIRGÍNIA DE CARVALHO OLIVEIRA**

Orientadores

Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior, D.Sc.

Edna Aragão Farias Cândido, D.Sc

ARACAJU  
Dezembro – 2017

---

O48e Oliveira, Tássia Virginia de Carvalho  
Efeito tópico do óleo essencial da *Alpinia zerumbet* no processo de preparo tecidual pós lesão parcial do tendão calcâneo em ratos/ Tássia Virginia de Carvalho Oliveira ; orientação [de] Prof. Dr. Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior, Prof. Dr. Edna Aragão Farias Cândido – Aracaju: UNIT, 2018.

48 f. il ; 30 cm

Tese (Doutorado em Saúde e Ambiente) - Universidade Tiradentes, 2018  
Inclui bibliografia.

1. Tendão calcâneo. 2. *Alpinia zerumbet*. 3. Proteoglicano. 4. Citocina. 5. Cicatrização I. Oliveira, Tássia Virginia de Carvalho. II. Albuquerque Junior, Ricardo Luiz Cavalcanti de (orient.). III. Cândido, Edna Aragão Farias. (orient.). IV. Universidade Tiradentes. V. Título.

---

CDU: 602. 4: 665.528: 582.548. 27

**Efeito tópico do óleo essencial da *Alpinia zerumbet* no processo de reparo tecidual pós lesão parcial do tendão calcâneo em ratos**

Tássia Virgínia de Carvalho Oliveira

TESE SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE DA UNIVERSIDADE TIRADENTES COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTORA EM SAÚDE E AMBIENTE.

Aprovada por:

---

Ricardo Luiz Cavalcanti Albuquerque Júnior, D.Sc.  
Orientador

---

Edna Aragão Farias Cândido, D.Sc.  
Orientadora

---

Sônia Oliveira Lima, D.Sc.  
1ª Examinadora

---

Amaro Afrânio de Araújo Filho, D.Sc.  
2º Examinador

---

Paula Santos Nunes, D.Sc.  
3ª Examinadora

---

Isabel Bezerra Lima-verde, D.Sc.  
4ª Examinadora

---

ARACAJU  
Dezembro - 2017

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	08
2. OBJETIVOS.....	10
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	10
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
5. RESULTADOS.....	27
6. DISCUSSÃO.....	40
7. CONCLUSÃO .....	44
8. REFERÊNCIAS.....	44
9. ANEXO 1 .....	51

## RESUMO

As lesões tendíneas e seu processo de reparo são alvos de discussões científicas devido à dificuldade de regeneração funcional do tendão. Várias alternativas são previstas, porém, não há um consenso sobre a melhor maneira de tratá-las. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do óleo essencial da *Alpinia zerumbet* sobre o processo de reparo tecidual nas fases inicial e tardia pós tenotomia parcial no tendão calcâneo em ratos. Trata-se de um estudo explicativo experimental, pré-clínico, cego com abordagem analítica quantitativa. A tenotomia parcial foi realizada através de uma incisão longitudinal na pele, no terço médio do tendão calcâneo, entre a inserção calcanear e a junção miotendínea. Os ratos foram divididos em dois grupos: o grupo OEAz no qual a pata direita foi tratada com óleo essencial da *Alpinia zerumbet* e no grupo controle a pata esquerda foi tratada com o óleo de girassol. Após 3, 7, 14, 30 e 90 dias foram realizadas análises histológicas com as colorações Picrossírius e Tricrômico de Masson para análise da deposição de colágeno, o azul de toluidina para proteoglicanos totais e o Weigert Van Gieson para fibras elásticas. Na análise imunohistoquímica utilizou-se o proteoglicano decorina e a citocina TNF- $\alpha$ . Utilizou-se o programa graph pad prism 6.01 para análise estatística e o teste de Mann Whitney, valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos. Em relação ao Tricrômico de Masson em 14 e 90 dias observou-se que no grupo OEAz, comparado ao grupo controle, houve diferença significativa no colágeno total, além da presença de tenócitos, já no período de 30 dias, tanto o grupo controle, quanto o grupo OEAz, não houve diferença significativa. Na análise do picrossírius, o grupo OEAz, evidenciou uma maior quantidade de colágeno tipo I comparado ao grupo controle. Na análise imunohistoquímica da decorina, em uma comparação intergrupos, houve diferença significativa no tempo de 30 dias. Em relação ao TNF- $\alpha$  houve diferença nos dias 3 e 7 do grupo OEAz em relação ao controle. As fibras elásticas apenas apresentaram diferença significativa aos noventa dias. Desta forma, fica evidente que o óleo essencial da *Alpinia zerumbet*, tem ação sobre colágeno, proteoglicanos totais, decorina e TNF- $\alpha$  e exerce influência benéfica no processo de reparo pós tenotomia parcial no tendão calcâneo em ratos.

Palavras-chave: Tendão calcâneo, *Alpinia zerumbet*, proteoglicano, citocina, cicatrização.

## ABSTRACT

Tendon lesions and their repair process are the targets of scientific discussions due to the difficulty of the tendon in a functional regeneration. Several alternatives are foreseen, however, there is no consensus on how best to treat them. In this sense, the objective of this work was to evaluate the effect of the essential oil of *Alpinia zerumbet* on the process of tissue repair in the initial and late phases after partial tenotomy in the calcaneus tendon in rats. This is an experimental, preclinical, blind explanatory study with a quantitative analytical approach. Partial tenotomy was performed through a longitudinal incision in the skin, in the middle third of the calcaneal tendon, between the calcaneal insert and the myotendinous junction. The rats were divided in two groups: OEAz group in which the right paw was treated with essential oil of *Alpinia zerumbet* and in the control group the left paw was treated with sunflower oil (control group). After 3, 7, 14, 30 and 90 days histological analyzes were performed with the Picrossirius and Masson trichrome cores for analysis of collagen deposition, toluidine blue for total proteoglycans and Weigert Van Gieson for elastic fibers. In the immunohistochemical analysis, the proteoglycan decorin and the cytokine TNF- $\alpha$  were used. The graph pad prism 6.01 program was used for statistical analysis and the Mann Whitney test, values of  $p < 0.05$  were considered significant. Regarding Masson's trichrome at 14 and 90 days, it was observed that in the OEAz group, compared to the control group, there was a significant difference in the total collagen, in addition to the presence of tenocytes, in the period of 30 days, both the control group and the OEAz group, there was no significant difference. In the analysis of picrossirius, the OEAz group evidenced a greater amount of type I collagen compared to the control group. In the immunohistochemical analysis of decorin, in an intergroup comparison, there was a significant difference in the time of 30 days. Regarding TNF- $\alpha$ , there was difference on days 3 and 7 of the OEAz group in relation to the control. The elastic fibers presented only significant difference at ninety days. Thus, it is evident that *Alpinia zerumbet* essential oil has action on collagen, total proteoglycans, decorin and TNF- $\alpha$  and exerts influence on the post tenotomy repair process in the calcaneus tendon in rats.

Keywords: Calcaneal tendon, *Alpinia zerumbet*, proteoglycan, cytokine and wound healing.

## 1. INTRODUÇÃO

O estudo dos mecanismos de cicatrização em tendões tem sido alvo de pesquisas em todo o mundo, contudo, não há um consenso ainda sobre a melhor maneira de se tratar uma lesão tendínea. Dentre os tendões do corpo humano o mais acometido é o tendão calcâneo, sua ruptura ocorre durante a prática desportiva em sua maioria, afetando primariamente indivíduos adultos do sexo masculino entre a 4ª e 5ª décadas de vida (ANDARAWIS-PURI, 2015).

As tendinopatias podem ocorrer por traumatismos, excesso de repetições de movimentos, infecções, desnutrição, sobrecarga mecânica e, além disso, o envelhecimento assume um papel importante nas rupturas deste tendão. O tendão calcâneo é o maior e mais resistente do corpo humano, formado pela união do tecido conjuntivo dos músculos gastrocnêmio e sóleo, serve de transmissor de tensão do músculo para o calcâneo. Uma vez lesionado, levará a limitação funcional para a realização das atividades de vida diária e laborativas (WU et al., 2017).

A matriz extracelular (MEC) do tendão humano é semelhante à do rato e é formada principalmente por colágeno do tipo I e por uma quantidade pequena de fibras elásticas, estes estão incorporados numa matriz de proteoglicanos. O processo de reparo tendíneo, se divide em três fases: inflamatória, na qual ocorre migração de leucócitos e plaquetas, fase proliferativa com ênfase para angiogênese e o aumento no número de fibroblastos, e, por fim, a fase de remodelação, que tem como objetivo a melhoria dos constituintes das fibras de colágeno e a reabsorção de água para reduzir a espessura da cicatriz e aumentar sua força (KAROUSOU et al., 2008; LEAL, et al., 2012).

A resposta inflamatória é mediada por agentes inflamatórios como citocinas, fatores de crescimento e histaminas. A maneira como esses agentes vão interagir entre si influenciará no processo final de reparo e remodelação do tendão. Os estudos para a cicatrização do tendão giram em torno da modulação dos fatores pró e anti-inflamatórios (SHAPIRO et al., 2015).

As formas de tratamento utilizadas atualmente são eficazes no processo de reparo do tendão; porém, ainda não se conseguiu restaurá-lo de maneira em que as propriedades biomecânicas pré lesão sejam recuperadas em sua totalidade. O tratamento padrão ouro para as tendinopatias são os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES), eles têm um efeito benéfico imediato sobre o processo inflamatório, porém, podem apresentar efeitos

colaterais a nível de complicações gastrointestinais severas. Já os anti-inflamatórios esteroidais (AIES) possuem efeito anti-inflamatório e analgésicos a curto prazo, entretanto, apresentam efeitos degenerativos deletérios a longo prazo (WEINFELD et al., 2014).

A fitoterapia é uma alternativa eficiente e culturalmente difundida em busca de soluções terapêuticas. Dentre as plantas estudadas, encontra-se a *Alpinia zerumbet*, uma planta herbácea, da família Zingiberaceae, encontrada comumente no nordeste brasileiro. Popularmente, todas as partes da planta (rizoma, folhas, flores e sementes) são utilizadas como agente medicinal (LORENZI et al., 2002).

Estudos em modelo murino tratados com óleo essencial ou extrato etanólico da *Alpinia zerumbet* apresentaram ação anti-inflamatória, inibindo processos edematosos em até 66%. Também foram encontrados resultados sobre o óleo essencial da *Alpinia zerumbet* (OEAz) que demonstraram ação anti-inflamatória e antinociceptiva em ratos com artrite, com modificações no hipocampo no cérebro (LEMAN et al., 2000). Shanmugam et al. (2011), relataram atividade anti-inflamatória crônica a partir do extrato etanólico da *Alpinia zerumbet*, apresentando indução de fibroblastos, síntese de colágeno e mucopolissacarídeos durante a formação do tecido granuloma.

Além dos efeitos anti-inflamatórios, estudos experimentais utilizando o OEAz, demonstraram uma variedade de atividades potencialmente benéficas, incluindo, efeitos antioxidante; ansiolítico; antidepressivo (JUNIOR et al., 2017); vasorrelaxante e anti-hipertensivo (CUNHA et al., 2013); promoção de cicatrização de feridas, diferenciação/remodelação de tecido conjuntivo, com influência nos fibroblastos (SANTOS-JUNIOR, 2017); e ação reguladora deste óleo em canais de cálcio ( $Ca^{2+}$ ) (SANTOS et al., 2011; CUNHA et al., 2013). O óleo essencial obtido a partir de suas folhas foi analisado quimicamente através da Cromatografia de massa revelando a presença de vários terpenos, dentre eles, se destacaram terpeno-4-ol (23,2%), 1-8 cineol (21,8%),  $\gamma$ -terpeno (11,6%) e  $\gamma$ -cymene (5,8%) (SANTOS et al., 2011) os quais podem ter ação no processo de reparo tendíneo.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Analisar o efeito tópico do óleo essencial da *Alpinia zerumbet* durante o processo de reparo inicial e tardio pós tenotomia parcial do tendão calcâneo em ratos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

#### 2.2.1 Fase inicial (3 e 7 dias)

- Analisar a intensidade da inflamação;
- Analisar a expressão imunohistoquímica das alterações em TNF- $\alpha$  (Fator de necrose tumoral alfa) do tendão do calcâneo após tenotomia parcial;

#### 2.2.2 Fase Tardia (14, 30 e 90 dias)

- Analisar a expressão histomorfológica do colágeno total, colágenos tipo I e III, proteoglicanos totais e fibras elásticas no tendão do calcâneo após tenotomia parcial;
- Analisar a expressão imunohistoquímica das alterações no proteoglicano Decorina do tendão do calcâneo após tenotomia parcial;

## 3. REVISÃO DE LITERATURA

### 3.1 Tendão

O tendão é uma rede complexa de matriz e células, na qual estão imersas glicoproteínas fibrilares, e glicoproteínas não fibrilares, estas representadas pelos proteoglicanos, e glicoproteínas adesivas (laminina, fibronectina, tenascina e integrinas). Suas funções biológicas são influenciadas por fatores extrínsecos e intrínsecos, que variam amplamente, como idade, nutrição, níveis de exercícios e biomecânica (WU et al., 2017).

Os tendões ligam o músculo ao osso, levando algumas das maiores forças experimentadas por qualquer tecido vertebrado, pois facilitam o movimento e proporcionam estabilidade esquelética. A proporção de matriz para célula no tendão é subsequentemente entre os mais altos de qualquer tecido vertebrado; compreendendo assim a composição e a organização da matriz, e como as células interagem com a matriz, é fundamental para entender a função, a homeostase e o reparo dos tendões (DORAL et al., 2010; FERREIRA et al., 2015).

A matriz extracelular do tendão é composta predominantemente de colágeno, que representa 60% a 85% do peso seco do tecido. Aproximadamente 95% do colágeno é de tipo I, com pequenos níveis de colágeno tipo III. O colágeno forma estruturas de fibra em vários níveis hierárquicos diferentes, cada um alinhado perto do eixo longo do tecido, conferindo excelente resistência; mecânica uniaxial ao tendão. As fibras elásticas dispostas paralelas a um eixo longitudinal são formadas pela elastina, o que torna o tendão capaz de resistir principalmente as forças unidirecionais. O arranjo paralelo produz uma estrutura bem rígida à tração, ao mesmo tempo possui pequena resistência à compressão ou ao cisalhamento (SCREEN et al., 2015).

O tendão de Aquiles é o tendão mais forte, mais espesso do corpo humano e o mais comum a ruptura. Começa perto do meio da panturrilha e é o tendão conjuntivo dos músculos gastrocnêmio e sóleo. A contribuição relativa dos dois músculos para o tendão varia. A espiralização das fibras do tendão produz uma área de tensão concentrada e confere uma vantagem mecânica. A inserção calcaneal é especializada e projetada para auxiliar a dissipação do estresse do tendão ao calcâneo. A inserção é de forma crescente e tem projeções medulares e laterais significativas. O fornecimento de sangue do tendão é da junção musculotendinosa, dos vasos no tecido conjuntivo circundante e da junção osteotendinosa (ANDARAWIS et al., 2015; FERREIRA et al., 2015).

### **3.2 Lesão do tendão do Calcâneo**

O tendão é composto principalmente por uma matriz extracelular de colágeno e moléculas não colágenas. A estrutura do tendão se relaciona diretamente com sua função mecânica e a caracterização de base da estrutura normal do tendão calcâneo é necessária para identificar os mecanismos que regem a lesão do tendão e a falha. Os tenócitos produzem colágeno tipo I e formam 90% do componente celular do tendão normal. Evidências sugerem que o tendão rompido ou patológico produz mais colágeno tipo III, o que pode afetar a resistência à sua tração (FREEDMAN et al., 2014; WU et al., 2017).

A interrupção dos elementos de suporte de carga, como os glicosaminoglicanos (GAGs) e proteínas estruturais, como a elastina, pode prejudicar a função fisiológica e gerar lesões. Uma vez lesionado, levará a limitação funcional para a realização das atividades de vida diária até as atividades laborativas, sendo assim, um dos sítios mais comuns é a lesão por sobrecarga em atletas (EVROVA et al., 2016).

Existem vários tipos de lesões que podem acometer a unidade musculotendínea podendo ser traumáticas ou resultado de processos lesivos provocados por sofrimento prolongado, exercício intenso, movimentos repetidos, degeneração com o tempo e forças de tração ou tensão. Podem gerar lesões agudas ou crônicas (WU et al., 2017).

A tendinopatia é descrita como distúrbio sobre o tendão, as condições crônicas são mais evidentes devido a degradação da matriz, inchaço e neovascularização. A etiologia ainda é desconhecida, poucos estudos são realizados sobre a tendinopatia aguda, o que dificulta maiores análises e informações, sobre a fase precoce. Para investigar os estágios agudos os modelos animais fornecem um mecanismo, que caracterizam de forma mais completa aspectos da sua etiologia, porém possui distinções na função, estrutura e metabolismos do tendão, o que implica na difícil compreensão dos dados (BOESEN et al., 2017).

### **3.3 Reparação tecidual**

O processo inflamatório representa um conjunto de reações locais e gerais contra o agente agressor, apresentando uma série de fenômenos complexos que se interagem e completam uns aos outros, formando uma reação em cascata, essencial para a preservação da integridade do organismo. Em última instância a resposta inflamatória visa combater o agente agressor e eliminar produtos resultantes da destruição celular, promovendo condições ideais para a reparação do tecido lesado, como uma tentativa de restabelecer a estrutura anatômica e a função normal da região afetada (PIVA et al., 2008, LIMA et al., 2009).

A reação inflamatória é a resposta inicial ao traumatismo, com a formação de hematoma local, edema e acúmulo de fluido sérico. Nos primeiros sete a dez dias ocorre uma migração mais intensa de leucócitos e fibroblastos com síntese de nova matriz extracelular. A fase fibroblástica dura várias semanas e o hematoma previamente formado organiza-se, promovendo a proliferação e diferenciação celular, deposição de colágeno tipo I e III entre os cotos tendíneos, e formação de matriz extracelular imatura, com fibras ainda desorganizadas. Na última fase, as fibras remodelam-se em orientação uniforme, assemelhando-se macroscópica e histologicamente ao tendão íntegro, com predomínio de colágeno tipo I (Figura 1) (MARANHÃO, 2008, LEAL et al., 2012).

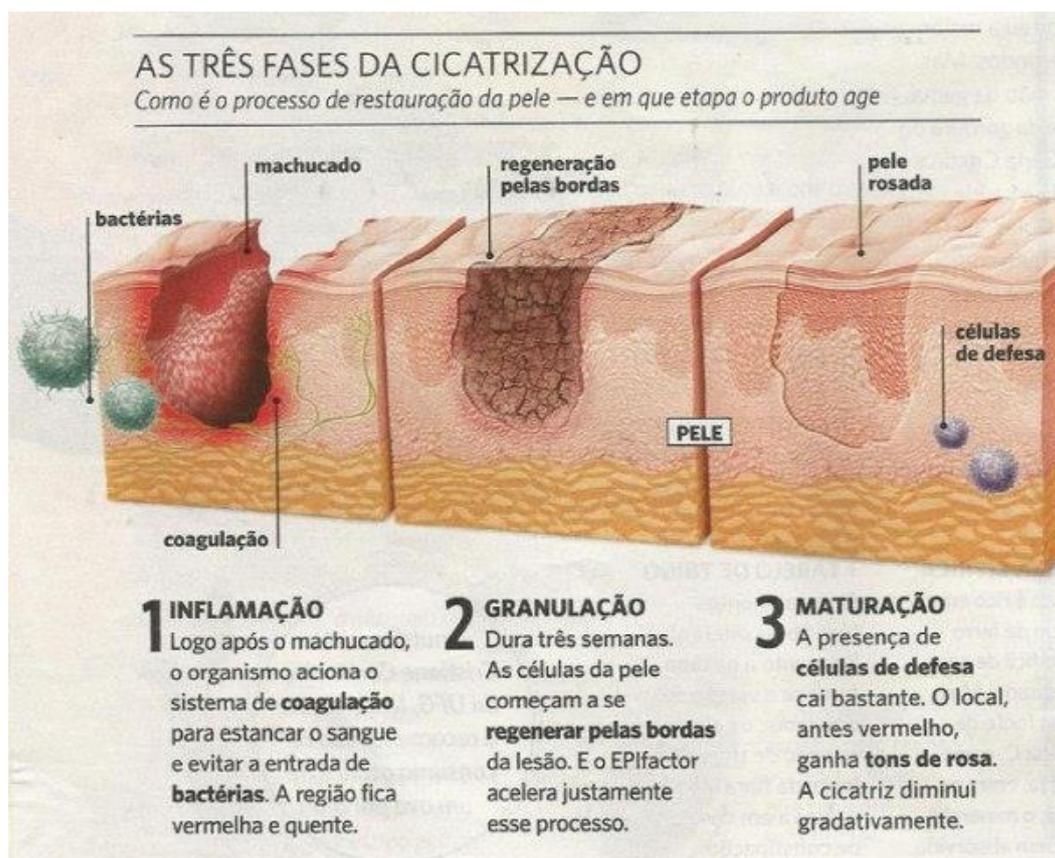


Figura 1: Esquema representativo das fases da inflamação.

Fonte: Google imagens.

O reparo tecidual do tendão dificilmente irá reproduzir a formação prévia ou retornará às suas propriedades biomecânicas originais. O tendão é um tecido com baixa vascularização, oxigenação e nutrição o que ocasiona uma diminuição na sua capacidade regenerativa. O colágeno é o principal componente da matriz extracelular e a proteína mais abundante no corpo humano. O tecido cicatricial será o resultado da interação entre a síntese, fixação e degradação desse colágeno (ENWEMEKA, 2001; MAFFULI, 2007).

Entre as várias substâncias encontradas na matriz extracelular dos tendões, as fibras de colágeno são as principais responsáveis pela força. Os colágenos do tipo I e III são sintetizados para promover este reparo. As fibras de colágeno do tipo III são mais finas e extensíveis e possuem habilidades de dar forma rápida as ligações transversais das fibras de colágeno, e durante o processo de cicatrização do tendão, aparecem de forma transitória, promovendo a estabilização do local do reparo e posteriormente essas fibras serão substituídas por colágeno tipo I que vai garantir a resistência tênsil do tendão (LABAT, 2010; DAYTON et al., 2017).

### 3.4 Citocinas

As citocinas são proteínas reguladoras que podem atuar de forma autócrina, parácrina e também como hormônios. Possuem uma ação pleiotrópica, podem exercer ações antagonistas ou sinérgicas, são importantes mediadores do processo inflamatório, podendo inibir ou estimular a resposta imune. A classificação delas baseia-se no tipo de ação ou propriedade, como ações anti-inflamatórias ou pró- inflamatórias, ou por seu papel como fatores de crescimento ou efeitos hematopoiéticos (FORSGREEN et al., 2012; MA et al., 2017).

O fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) é uma citocina pró-inflamatória, pleiotrópica relacionada com sobrevivência e proliferação celular a exemplo da morte celular no processo de apoptose. Ela está presente nos tenócitos em condições inflamatórias. O TNF- $\alpha$  é uma citocina chave na origem de várias doenças osteomusculares como osteoartrites e tendinites. Em tendões de equinos ele pode apresentar ações anti- apoptóticas e apoptóticas, controlar o número de células e ser um fator de degeneração do tecido tendíneo (SCHWARTZ et al., 2017).

Em condições de inflamação do tecido tendíneo, a exemplo das situações pós-traumáticas, os receptores de TNF- $\alpha$  estão aumentados. O tendão calcâneo é afetado por estar submetido a forças específicas, cargas mecânicas prolongadas, situações traumáticas e cirurgias também dão origem a um processo inflamatório (AKESEN et al., 2009).

O aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  no processo pós-traumático, potencializa o processo inflamatório, aumenta a interleucina 1 e 6 (IL-1, IL-6) pró-inflamatória e reduz a expressão da interleucina 4 (IL-4) que é anti-inflamatória. Esse processo pode levar a formação de um colágeno tipo III mais elástico e menos resistente e retardar o processo de reparo. Em situações normais há um equilíbrio entre as enzimas colagenases Matriz Metaloproteinase (MMPs), que promovem a degradação da matriz extracelular e o inibidor tecidual de metaloproteinase (TIMPs), esse equilíbrio tem importante papel na regeneração, recuperação e remodelamento tecidual. O TNF- $\alpha$  pode induzir também a liberação de MMPs que vem sendo investigado pelas pesquisas atuais (DOHNERT et al., 2015; KATSMA et al., 2017).

### 3.5 Proteoglicanos

Proteoglicanos são moléculas complexas presentes na MEC, encontradas na maioria dos tecidos conjuntivos e na superfície das células. São estruturas formadas por uma

proteína principal (*core protein*) à qual estão ligadas covalentemente diversas cadeias de glicosaminoglicanos (GAGs). Esta proteína é dividida em regiões que interagem com elementos estruturais distintos presentes nas células ou nas matrizes extracelulares. Isto indica que proteoglicanos são essencialmente uma classe de colágenos e glicoproteínas estruturais compostos por diferentes cadeias de GAGs (SAUNDERS et al., 2015).

A função e ação de cada proteoglicano é em grande parte determinada pelo número de cadeias de GAGs ligados à ele, assim como à extensão destas cadeias. Hormônios e fatores de crescimento estimulam as vias de sinalização a alongar a cadeia de GAG e com isso há o aumento do peso molecular. Fatores de crescimento podem também alterar a epimerização e o padrão de sulfatação do dissacarídeo e estas alterações estruturais podem ter consequências funcionais (LITTLE et al., 2008).

Eles podem ser classificados em três grupos: (1) os proteoglicanos de superfície de membrana celular, (2) os proteoglicanos modulares (3) os proteoglicanos ricos em leucina (SCHAEFER et al., 2010). A decorina é um proteoglicano rico em leucina, apresenta uma cadeia de GAG de condroitin sulfato associada à proteína central (PINHEIRO et al., 2005).

Os proteoglicanos condroitin sulfatados, do qual fazem parte a decorina, estão presentes em praticamente todos os tecidos e possuem funções regulatórias como fibrillogênese de colágeno, crescimento tumoral e disseminação metastática, angiogênese, modulação da morte celular programada, inibição de TGF- $\beta$ , fibrose pulmonar e renal, desenvolvimento e distrofia musculares, síntese de fibrilina 1, cicatrização de feridas, infarto do miocárdio e doença de Lyme. Tem ação ainda sobre receptores de EGF, IGF-1, LRP-1 (proteína I relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa intensidade, PDGF (fator de crescimento derivado das plaquetas) e TNF- $\alpha$  (MERLINE et al, 2009; LORDA-DIEZ et al., 2014).

### **3.6 Tratamentos das Tenotomias do tendão calcâneo**

O tratamento para ruptura do tendão de calcâneo pode ser cirúrgico ou não cirúrgico. O tratamento cirúrgico tem como benefício redução dos riscos de re-ruptura. Em contrapartida apresenta como malefício o aumento dos riscos pós-operatório, que prejudica diretamente a qualidade de vida do paciente. Já o tratamento não cirúrgico, que inclui a fisioterapia, imobilização e medicamentos, têm como benefício reduzir a taxa de complicações do processo inflamatório, entretanto apresenta como malefício o aumento das taxas de re-ruptura (BOESEN et al., 2017).

Na prática, utiliza-se para alívio temporário da dor medicamentos anti-inflamatório esteróides e não esteróides. Eles são benéficos apenas na fase aguda das lesões, contudo para que uma terapia seja vista como eficaz, deve reduzir não somente a inflamação aguda, mas também propiciar reparação tecidual mais prolongada e uma recuperação do tendão o mais próximo da sua funcionalidade (FILLIPIN et al., 2005; ABATE et al., 2009).

O tratamento medicamentoso pode envolver o uso de medicamentos com ação local ou regional, e aqueles que apresentam ação sistêmica. Têm-se aumentado a utilização local de AINES como forma terapêutica de primeira escolha no tratamento de doenças reumáticas e não reumática como, artrite reumatoide, sequelas de traumas e contusões, e ainda nos pós-operatório, por apresentarem inúmeras vantagens em relação ao uso sistêmico, evitando problemas gastrointestinais, o metabolismo hepático de primeira passagem, reduzindo efeitos sistêmicos e mantendo uma liberação constante do princípio ativo no sítio de aplicação. Esta utilização beneficiaria as tendinopatias devido ao aumento da resistência tensil e a aceleração das ligações cruzadas nas fibras de colágeno (MURI et al., 2009).

O uso de medicamentos com corticosteróides demonstrou maior eficácia do que outros tratamentos combinados para tendinite em fase aguda e subaguda em curto prazo, porém não apresenta nenhum benefício em tratamento a longo prazo (fase crônica), e por ser menos eficaz sobre a deficiência funcional do que outros tratamentos combinados. Relatando como principais efeitos colaterais a dor transitória após a injeção e a modificação da pele (LIAO et al., 2012).

A utilização de AIEs para lesão tendínea apresenta como desvantagem o risco de ruptura do tendão decorrente da redução na resistência do tecido, atrofia subcutânea e perda de pigmentação da pele. O uso de corticosteróides leva efeitos adversos sobre as células do tendão afetando as respostas de reparo em lesões degenerativas, devendo serem utilizados como último recurso no tratamento de tendinopatias (CHAN et al., 2009; WU et al., 2017).

Outros métodos não cirúrgicos são também utilizados como: aplicação de ultra-som, eletroacupuntura, estimulação elétrica nervosa transcutânea (TENS), laser de baixa potência (LED), fisioterapia aquática e o uso de plantas medicinais (LONGO et al., 2009; SILVA et al., 2015; OZAN et al., 2017).

Recentemente, descobriu-se que os tendões, semelhantes aos outros tecidos mesenquimatosos, contêm células tendinosas que possuem as propriedades comuns das

células-tronco. As estratégias atuais para aumentar seu reparo consiste principalmente na aplicação de células-tronco, fatores de crescimento, biomateriais naturais, artificiais, isolados ou em combinação (WU et al., 2017; NICODEMO et al., 2017).

### **3.6.1 Fitoterapia**

As plantas medicinais têm seus registros primitivos relatados como sendo um dos mais antigos recursos utilizados na prevenção, cura ou tratamento de injúrias na história da humanidade, na busca por recursos terapêuticos. Atualmente, muitos fatores têm colaborado para o uso frequente deste recurso, incluindo o elevado custo dos medicamentos industrializados, o complexo acesso da população à assistência médica, bem como, a tendência na utilização de produtos naturais (BORGES, 2006; SANTOS, 2011).

Os fitoterápicos são medicamentos obtidos através do uso exclusivo de matérias-primas de origem vegetal que possuem diferentes formas de apresentação e podem ser utilizados por variadas vias de administração: por via oral, na forma de pó para diluição, decocções, infusões ou chás; por via tópica, na forma de preparações à base de água ou óleo (WAGNER et al., 2006).

Uma das formas de utilização terapêutica das plantas é através dos seus óleos essenciais, também chamados de óleos voláteis, obtidos de diferentes materiais vegetais como flores, folhas, frutos e raízes originam-se do metabolismo secundário destes vegetais, sendo uma excelente forma de aplicação tópica, por apresentarem bom índice de absorção (GEROMINI et al., 2012).

Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) revelam que em torno de 80% da população mundial utilizam alguma planta medicinal no alívio dos sintomas da dor. Somente a partir dos levantamentos etnofarmacológicos, as plantas medicinais começaram a ter respaldo científico. Atualmente, com apoio da OMS, a medicina tradicional vem sendo resgatada, uma vez que sempre constituiu uma alternativa terapêutica utilizada e culturalmente difundida na busca da promoção da saúde (RUTKAUSKIS et al., 2009).

Assim como os tratamentos convencionais, o tratamento fitoterápico apresenta alto custo de pesquisa e produtividade e não podem ser confundidos com a medicina popular ou alternativa. Apesar de serem baseados pelos conhecimentos etnofarmacológicos, são submetidos ao controle da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para comprovação dos seus benefícios científicos (REZENDE et al., 2002).

Apesar dos altos custos associados à fitoterapia, quando comparados aos medicamentos convencionais, estes apresentam vantagens econômicas relevantes. Além disso, os efeitos adversos e colaterais dos produtos naturais são menos agressivos, o que proporcionam melhor condição de saúde para população. Isso não significa que os fitoterápicos não causem riscos ao organismo, fazendo-se necessário pesquisas que reproduzam sua qualidade, eficácia e segurança do seu uso (VIEIRA et al., 2010).

### 3.6.2 *Alpinia zerumbet*

Novas terapias que garantam o equilíbrio biológico tem sido estudado constantemente. Com isso, as plantas aparecem, associando compostos biologicamente ativos a sua ação farmacológica podendo auxiliar na terapia (CALIXTO, 2000).

A *Alpinia zerumbet*, chamada popularmente de “colônia”, “flor de redenção”, “bastão de imperador”, trata-se de uma planta herbácea, robusta e perene com colunas de 2 a 3 metros de altura, lisa e verde com folhas oblongas e pontudas. Suas flores são alvas com lacínios róseos no ápice, dispostas em cachos grandes e suavemente aromatizadas, tendo seu fruto em formato de cápsula. Bastante encontrada no Nordeste e seu óleo essencial é retirado das folhas permitindo melhor exploração do bioproduto (KRIECK et al., 2008).

A *Alpinia zerumbet* tem atraído grande atenção devido às ações terapêuticas do seu óleo essencial obtido a partir das folhas e ramos. Através da análise química foi verificada a presença de vários terpenos, dentre eles, se destacam terpeno-4-ol (23,2%), 1-8 cineol (21,8%) que são potentes inibidores de citocinas e antiinflamatórios, respectivamente (TRAPP et al., 2001).

Em relação à via dérmica, o terpeno-4-ol apresentou, *in vitro*, melhor absorção em relação a outros 4 tipos de terpenos; além de melhor resultado da utilização de solução oleosa em relação a emulsão e hidrogel, a serem utilizados como veículos, sendo os valores de absorção de  $90 \mu\text{gcm}^{-2}$ , em solução oleosa e  $60 \mu\text{g/cm}^{-2}$  em emulsão e  $5 \mu\text{g/cm}^{-2}$  em hidrogel, em dose de 0,75% m/m. O tempo de melhor absorção foi de 1 hora, para fármacos e cosméticos por via dérmica. A absorção desses terpenos aplicados pelo corpo tem percentagem de 10 a 20% (CAL et al., 2006).

Sapra et al. (2008) relataram que a utilização de terpenos, a exemplo de 1,8 cineol, pode ser utilizada com o propósito de melhorar a absorção dos medicamentos transdérmicos; já que interagem com lipídios e queratina, além de permitir maior solubilidade aos

medicamentos. Estudos utilizando o óleo essencial da *Alpinia zerumbet* (OEAz), tem demonstrado diversas atividades benéficas, incluindo, efeitos antiinflamatório, anti-oxidante, miorreaxante, promoção de cicatrização de feridas e diferenciação/remodelação de tecido conjuntivo, com influência nos fibroblastos (YUAN et al., 2013; SANTOS- JUNIOR, 2017).

Também foram encontrados resultados sobre o óleo essencial do rizoma da *Alpinia zerumbet* que demonstraram ação antiinflamatória e antinociceptiva em ratos com artrite, com modificações no hipocampo no cérebro (LEMAN et al., 2000). Thenmozhi et al., (2011), relataram atividade anti-inflamatória crônica a partir do extrato etanólico da *Alpinia zerumbet*, apresentando indução de fibroblastos, síntese de colágeno e mucopolissacarídeos durante a formação do tecido granuloma.

Percebe-se que apesar dos métodos de tratamentos existentes, outros métodos têm sido testados para o processo de reparo do tendão calcâneo, como o estudo realizado por Santos- Júnior et al., (2017) que avaliaram a quantidade de fibroblastos e a disposição de colágeno pós tenotomia parcial tratado com o OEAz; o estudo de Cerqueira et al. (2015) que avaliaram colágeno utilizando a cinesioterapia associada com o OEAz, o estudo de Benny et al. (2016) na qual avaliou inflamação e colágeno em modelo de fibrose pulmonar e Freitas et al. (2016) que avaliaram colágeno em músculos espásticos.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Produto Vegetal - Óleo essencial da *Alpinia zerumbet***

A *Alpinia zerumbet* foi cultivada e seu óleo essencial foi processado pela Industria Farmacêutica Hebron, em Pernambuco. O óleo essencial das folhas e galhos foi extraído por arraste a vapor por hidrodestilação utilizando o equipamento Destilador para óleos essenciais MA480 (MARCONI) e doados 100mL de OEAz para o presente estudo.

### **4.2. Análise cromatográfica**

O óleo foi analisado através da cromatografia gasosa (GC) com detector de espectrometria de massa (EM) (QP 2010) operando a 70 eV e com uma faixa de massa de 45-450 amu. As colunas capilares DB5 (Agilent Technologies, Brasil, 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm) foram empregadas usando um fluxo de gás de 1 mL / min de hélio. A temperatura do detector e do injetor foi de 250°C e a temperatura do forno começou a 40°C e foi aumentada para 220°C a 3°C / min. As análises foram realizadas injetando 0,1 µL de uma solução hexânica de 1% (v / v) dos óleos essenciais durante 45 minutos.

A composição relativa dos óleos foi obtida supondo que a soma de todas as áreas compostas fosse 100% e os fatores de resposta não foram levados em consideração. Os compostos foram tentativamente identificados comparando índices de retenção programados por temperatura linear obtidos experimentalmente com os relatados na literatura.

Os espectros de massa dos compostos de óleo essencial foram comparados com os relatados na biblioteca de espectro de massa NIST (versão 107) e Wiley (versão 229) como um auxílio à identificação (Adams, 2007). Um composto foi considerado detectado se o seu sinal mínimo de ruído fosse 3. A similaridade espectral mínima de um componente de óleo essencial era de 75% para considerar este composto como tentativamente identificado.

#### **4.3 Tipo de pesquisa, Amostra e Aspectos Éticos**

Estudo explicativo, experimental, pré-clínico, cego com abordagem analítica quantitativa. Foi realizado no período de março de 2014 a abril de 2017.

Foram utilizados trinta ratos machos da raça Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), adultos jovens pesando 200-300g provenientes do Biotério da Universidade Tiradentes, os quais permaneceram no referido biotério. Foram agrupados de 3 em 3 ratos e mantidos em gaiolas de polipropileno padrão. Todos foram mantidos em ambiente controlado, com ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo água e ração balanceada *ad libitum*.

Ao final de cada experimento os animais foram eutanasiados na câmara hiperbárica com o propósito de retirada do material biológico (tendão) para confecção de lâminas histológicas e, posteriormente, incinerados no Biotério da Universidade Tiradentes.

O projeto foi submetido ao comitê de ética em pesquisa em animais (CEPA) e foi aprovado sob o número de protocolo 03052011 (Anexo 1).

#### **4.4 Grupos experimentais e Dose**

Os ratos foram divididos em dois grupos: o grupo OEAz recebeu o uso tópico durante seis dias a dose 0,3mL/Kg a 33% do OEAz diluído em óleo de girassol na lesão de tenotomia parcial na pata direita traseira; enquanto que, o grupo controle, utilizou a pata esquerda traseira (HASE et al., 2016; JACOBSON et al., 2015), para receber apenas óleo de girassol após lesão de tenotomia parcial. Dessa forma a atividade executada pelo animal foi na mesma intensidade para os dois grupos analisados. Ambos os grupos foram submetidos a

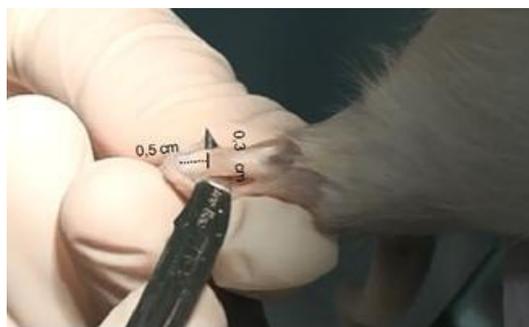
leitura em 3, 7, 14, 30 e 90 dias com 6 ratos em cada momento.

A concentração desse tratamento (dose 0,3mL/Kg) baseou-se em estudos anteriores de Santos-Júnior et al. (2017) que demonstraram diferenciação/remodelação de tecido conjuntivo e Santos et al. (2011), que encontrou o melhor efeito inibitório sobre canais de cálcio de EOAz em concentrações de 25 e 250 µg / mL.

#### 4.5 Procedimento cirúrgico

O modelo utilizado neste estudo foi baseado no experimento de Enwemeka et al. (2000). Os animais foram inicialmente pesados e posteriormente anestesiados com Cloridrato de Ketamina (CEVA Brasil) a 10% (1 mg/ 100g) e Cloridrato de Xilazina (CEVA Brasil) a 2% (1 mg/ 100g) com aplicação intraperitoneal. Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados em condições assépticas.

A região posterior da tíbia do membro posterior direito (tratado) e esquerdo (controle), no local correspondente ao tendão calcâneo, foi tricotomizada com auxílio de uma tesoura. Após antissepsia local (com álcool a 70%), foi realizada uma incisão longitudinal na pele sobre o local correspondente a tenotomia, no terço médio do tendão calcâneo, entre a inserção calcanear e a junção miotendínea, com distância de 0,5cm da inserção calcanear, com incisão de 0,3cm de largura e 0,1cm de profundidade, onde se realizou a tenotomia parcial por cisalhamento transversal, utilizando lâmina de bisturi número 15. A seguir, a pele foi suturada com fio 4.0 (poliamida monofilamento) não absorvível e não houve posteriormente nenhum tipo de imobilização do segmento (Figura 2) (SANTOS-JÚNIOR et al., 2017).



**Figura 2:** Modelo experimental para indução de tenotomia parcial. A incisão foi parcial e transversal (0,3cm) com distância de 0,5cm da inserção do tendão Calcâneo.

## **4.6 Preparação das amostras para estudos histológicos e fixação**

Os tendões dos dois calcâneos foram excisados dos animais, dissecando-os da junção musculotendinosa na conexão do calcâneo. Os tendões excisados imediatamente foram colocados em formaldeído 10% e posteriormente incorporados em parafina. As seções histológicas em série (5 µm) para análise posterior foram preparadas usando técnicas de laboratório de rotina.

A fixação é a etapa mais importante de toda esta técnica, uma vez que o fixador evita a destruição dos tecidos por enzimas presentes na própria célula, processo esse conhecido como autólise, preserva em grande parte a estrutura e a composição molecular dos tecidos, além de endurecer os fragmentos facilitando o seu corte e preparo da estrutura para a coloração. Apesar da velocidade de penetração do formol no tecido ser rápida, a velocidade de fixação é lenta, ou seja, quanto maior for o material biológico, mais tempo terá de permanecer no formol (ALBUQUERQUE-JÚNIOR et al., 2009).

### **4.6.1 Inclusão**

A inclusão consiste na impregnação da parafina, com as etapas de desidratação e clareamento. No processo de desidratação, foram realizadas lavagens sucessivas em concentrações crescentes de álcool (70%, 95%, 95%, 100%, 100%). Como o álcool não tem miscibilidade com a parafina, foi necessário um solvente orgânico miscível tanto ao álcool quanto à parafina, neste caso, o xilol (diafanização). O xilol proporciona a transparência ao tecido, deixando-o pronto para recebimento da parafina. Por fim, a material biológico foi colocado em parafina fundida numa estufa a 60°C. Após esse período, houve a inclusão do tecido em parafina, formando o bloco solidificado (ALBUQUERQUE-JÚNIOR et al., 2009).

### **4.6.2 Corte Histológico**

O objetivo do corte é resolver o problema da opacidade. Para esta finalidade, foi utilizado o micrótomo em que inicialmente, foi necessário desbastar os blocos de parafina em cortes com espessura de 25 µm. Após esse procedimento, os blocos de parafina foram submetidos a baixas temperaturas, com posterior realização de cortes seriados (tênicas) com 5µm de espessura. Posteriormente, as tênicas foram colocadas em álcool a 20%, seguido de banho maria para facilitar o estiramento e assim, serem fixadas na lâmina de vidro (ALBUQUERQUE-JÚNIOR et al., 2009).

### 4.6.3 Coloração

Após período de fixação do material biológico, pode haver perda de cor e por este motivo é necessário realizar a etapa de coloração. No presente estudo, foi utilizada a técnica de coloração picrossírius, tricrômico de Masson, Weigert Van Gieson e Azul de Toluidina. Os corantes se comportam como substâncias de caráter ácido ou básico. Os componentes que coram bem com corantes básicos são chamados de basófilos e os que apresentam afinidade com corantes ácidos, são designados acidófilos. Como os corantes utilizados não são solúveis em parafina, há a necessidade de realizar o procedimento de diafanização em xilol, seguido de uma hidratação com concentrações decrescentes de álcool (100%, 95%, 80% e 70%), com posterior lavagem em água corrente e água destilada para que os cortes estejam prontos para receber os corantes supracitados (ALBUQUERQUE-JÚNIOR et al., 2009).

### 4.6.4 Coloração com HE

A coloração em Hematoxilina e Eosina é utilizada quando se pretende identificar e realizar contagem de células inflamatórias. Para avaliar a intensidade da inflamação utilizada, a escala que mede em seis escores classificando essa inflamação em 4 tipos cuja descrição é de forma semiquantitativa identificada como: ausente, crônica, subagudo e agudo (Tabela 1).

**Tabela 1.** Descrição dos parâmetros para avaliação histológica da intensidade da resposta inflamatória nas áreas feridas (ALBUQUERQUE-JÚNIOR et al., 2009).

Pontuação da resposta inflamatória	Quantificação da resposta inflamatória	Classificação da resposta inflamatória
0	Ausente	Ausente
1	Suave	
2	Moderado	Crônica (predominância de linfócitos e histiocitos)
3	Intenso	
4	Intenso	Subagudo (equilíbrio de neutrófilos, linfócitos e histiocitos)
5	Intenso	Agudo (predominância de neutrófilos)

### 4.6.5 Coloração com Picrossírius

A coloração pelo Picrossírius é utilizada especificamente para análise de colágeno, aumentando a birrefringência do material. A técnica de coloração ocorreu da seguinte forma: após o processo de hidratação seguido de lavagem em água corrente e água destilada das lâminas, foram embebidas em picrossírius durante 40 minutos, com posterior banho em solução álcool ácido por 2 minutos, lavagem em água destilada e coloração de hematoxilina

por 15 segundos. Após esse tempo, foram submetidas à lavagem em água e por um novo processo de desidratação mediante lavagens em concentrações crescentes de álcool (80%, 95%, 100%). Na sequência, as lâminas foram colocadas em xilol (diafanização), onde permaneceram por 10 minutos até a sua montagem (ALBUQUERQUE-JÚNIOR et al., 2009).

As imagens foram capturadas nos slides usando a câmera de vídeo Olympus C-7070, acoplada ao microscópio Olympus CX31 e avaliada cegamente. A intensidade da inflamação, do tipo infiltração e do processo inflamatório foram classificadas como agudas quando as células polimorfonucleares predominaram; ou crônica quando as células mononucleares predominaram. A inflamação foi ainda classificada como escassa, moderada ou intensa. A reação inflamatória foi classificada com base no tipo de leucócito predominante (ALBUQUERQUE-JÚNIOR et al., 2009)

#### **4.6.6 Coloração com Tricrômico de Masson**

É uma técnica que diferencia estruturas: o núcleo, o citoplasma, o tecido conjuntivo, fibras colágenas com capacidade de determinar, visualizar e analisar qualitativamente o material fibroso. Consiste na utilização de corantes e soluções (Hematoxilina Férrica Weigert; Fucsina ácida escarlata de Biebrich; Solução fosfotúngstica 5%, ácido fosfomolibdico 5%; Azul de anilina-acética; Ácido acético sol. Aq. 1%) e uso do fixador (Bouin), aquecido a 56° C por 1 hora ou durante 1 noite em temperatura ambiente. As lâminas foram desparafinadas, em seguida lavadas em água corrente por 1 hora até desaparecer a cor do fixador, posteriormente foram lavadas em água destilada durante 5 minutos. Em seguida cora-se com Hematoxilina Férrica de Weigert ou Harris, durante 5 minutos; lava-se em água corrente por 5 minutos, depois em água destilada por 5 minutos. Após as lavagens, cora-se com a fucsina ácida-escarlata de Biebrich por 5 minutos, e posteriormente lava-se as lâminas em água destilada por 10 minutos para retirar o excesso do corante. Logo após foi tratada pelo ácido fosfotúngstico-ácido fosfomolibdico durante 10 minutos. Sem lavar, as lâminas foram coradas através do azul de anilina-acética por 10 minutos. Após passar por esse processo as lâminas foram lavadas em água destilada por 5 minutos, lavadas em solução de ácido acético 1% por 3 minutos e posteriormente lava-se em água destilada durante 5 minutos, finalizando com a desidratação dos cortes mediante lavagens em concentrações crescentes de álcool e em seguida a montagem das lâminas, para serem analisadas (ALBUQUERQUE-JÚNIOR et al., 2009).

#### **4.6.7 Coloração com Weigert Van Gieson**

No procedimento da coloração de Weigert Van Gieson, a lâmina foi desparafinada através da imersão nas substâncias Xilol I, II e III, seguindo a sequência do álcool em quatro

soluções (100%, 95%, 80% e 70%); para retirar o excesso do álcool, a lâmina recebeu lavagens na água I e água II, e posteriormente na água destilada, durante 2 minutos em cada; de início as lâminas foram imersas na coloração Weigert durante 10 minutos; recebendo um banho na água destilada para retirar o excesso e em seguida foi utilizada a coloração Van Gieson, durante 3 minutos; para finalizar, as lâminas foram mergulhadas no álcool I e no álcool II e no Xilol I, II e III, durante 2 minutos, e obtido como resultado a visualização de fibras elásticas em cor roxa (ALBUQUERQUE-JÚNIOR, 2009).

#### **4.6.8 Coloração com Azul de Toluidina**

No protocolo de Azul de Toluidina a lâmina foi desparafinada através das substâncias: Xilol I, II e III durante 3 minutos; Álcool (100%, 95%, 80%, 70% e 100%); em seguida as lâminas foram submersas em água destilada e na coloração Azul de Toluidina durante 2 minutos em cada; posteriormente para retirar o excesso da coloração a lâmina foi imersa na água destilada; como função de fixar a coloração utilizou-se o álcool com 80% e 90% durante 2 minutos em cada; e para finalizar o procedimento de coloração, a lâmina foi imersa nos Xilol I, II e III e como resultado foi obtido a visualização do proteoglicanos em cor azul. Após o processo de coloração realizou-se a finalização da montagem da lâmina, colocou-se o balsamo somado a lamínula, e em seguida fixou-se o material e a coloração atribuída (ALBUQUERQUE-JÚNIOR, 2009).

### **4.7 Análise Imunohistoquímica**

#### **4.7.1 Decorina e Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ )**

Para a avaliação da imunomarcção do tecido, foi utilizado o método imunohistoquímico baseado na formação do complexo antígeno anticorpo a partir da reação envolvendo a ligação entre a estreptavidinabiotina- peroxidase. Inicialmente, os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol e desidratados em álcool etílico. Envolvendo a atividade enzimática, o bloqueio da peroxidase endógena foi feito em câmara escura, com o peróxido de hidrogênio a 3%, por 45 min. Para a exposição e a recuperação antigênica do tecido, foi utilizado o tampão citrato pH 6,0 a 90° C por 20 min.

Referente ao bloqueio das proteínas inespecíficas, a fim de se evitar a formação de ligação cruzada, as lâminas preparadas foram imersas em solução contendo tampão concentrado a 10% por 15 min. Após esta etapa, os cortes histológicos foram preenchidos com os anticorpos primários: Anti-TNF- $\alpha$  (abcam ab6671; diluição: 1:100) e anti-decorin (abcam ab66043; diluição: 1:100), diluídos em solução a 1% composta por PBS e soro

albumina bovina (BSA). Finalizada a aplicação, as lâminas foram mantidas em geladeira a 4° C por 14 h.

Terminada esta etapa, os cortes preenchidos com o anticorpo primário foram imersos em uma solução contendo PBS e, posteriormente, encubados com o anticorpo secundário biotinilado, por 30 min, na estufa térmica a 37° C. Após a fixação, os cortes foram novamente imersos em solução de PBS e em seguida incubados com a Streptavidina-Peroxidase por 30 min. Após este intervalo, os cortes foram revelados com a aplicação da solução cromógena composta por diaminobenzidina a 0,03% e peróxido de hidrogênio a 3%. Finalizada esta etapa, os cortes histológicos foram submetidos à lavagem com água destilada, depois desidratados, diafanizados e foi feita a montagem da lâmina.

#### **4.8 Análise quantitativa das imagens**

A análise quantitativa das marcações foi realizada a partir das imagens capturadas com aumento de 400X utilizando macros no programa ImageJ versão 1.44. O ImageJ, desenvolvido por Wayne Rasband no National Institute of Health, é um programa Java® de domínio público de processamento de imagem que pode calcular a área e estatísticas de valor de pixel em seleções definidas pelo usuário ou por filtro de cores e ainda medir distâncias e ângulos.

Utilizaram-se 3 macros no ImageJ, a depender do objetivo do campo de visualização: a primeira macro foi por sistema de mascaramento automático, na qual marcava-se e quantificava-se a estrutura que se queria analisar; a segunda macro foi por intensidade de cor, na qual o valor mais próximo ao zero era o mais escuro (preto) e o valor mais próximo ao 255 era o mais claro (branco-background) e a terceira foi realizada através da medição e quantificação da área através de uma área circular previamente criada e uniformizada para todos os grupos.

#### **4.9 Análise estatística**

Os grupos foram divididos conforme as variáveis estudadas. O programa Graph Pad Prism 6.01 foi utilizado para análise estatística. Aplicou-se o teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade dos dados. A distribuição não foi normal e utilizou-se o teste não paramétrico de Mann Whitney para analisar as variáveis independentes intergrupo. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Cromatografia Gasosa

Um total de 57 componentes do óleo essencial de *A. zerumbet* foram identificados totalizando 95,30% da área cromatográfica total. Os monoterpenos oxigenados (50,20%) são a classe predominante de compostos do óleo essencial de *A. zerumbet* e terpinen-4-ol (23,23%) e o eucalyptol (ou 1,8-cineol, 21,77%) foram os principais componentes identificados. Estes resultados são semelhantes aos encontrados para outros óleos essenciais brasileiros com *Alpinia zerumbet*. Além disso, apenas os hidrocarbonetos monoterpênicos  $\gamma$ -terpineno (11,63%) e p-cimeno (5,85%) tiveram uma contribuição cromatográfica superior a 5%. Os hidrocarbonetos Sesquiterpenos e sesquiterpenos oxigenados apresentaram menor contribuição em termos de área cromatográfica (2,80% e 3,52%, respectivamente) (TABELA 2; TABELA 3 e FIGURA 3).

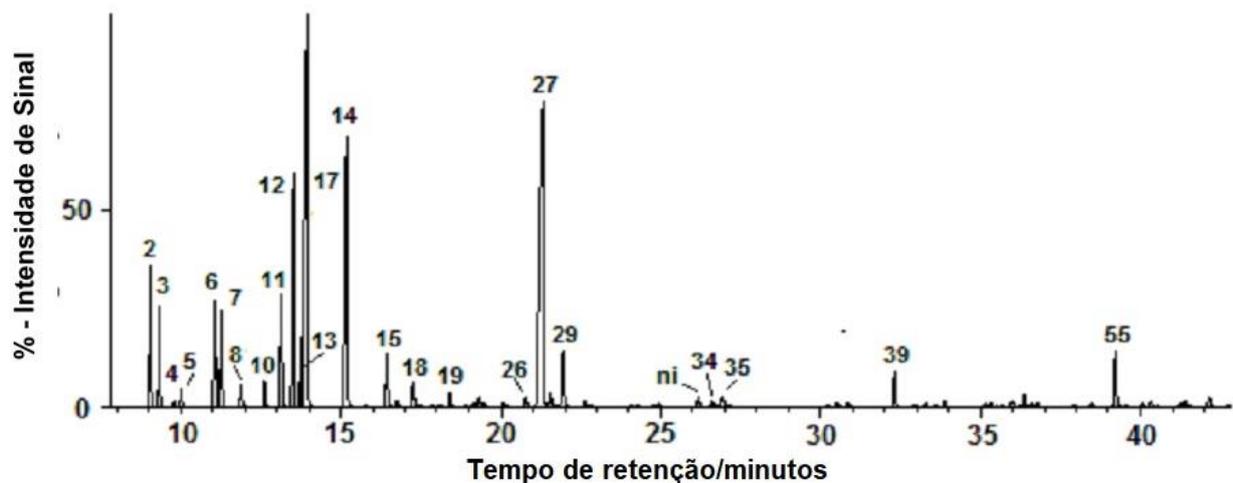
**Tabela 2.** Identificação das classes dos compostos por área (%) encontrados no óleo essencial da *Alpinia zerumbet*.

<b>COMPONENTES</b>	<b>AREA %</b>
Hidrocarbonetos sesquiterpenos	51.25
Monoterpenos oxigenados	40.58
Sesquiterpenos oxigenados	1.34
Hidrocarbonetos sesquiterpenos	1.63
Outros	0.5
<b>TOTAL</b>	<b>95.30</b>

**Tabela 3:** Compostos identificados no óleo essencial extraídos das folhas e galhos da *Alpinia zerumbet* programados por índices de retenção linear de temperatura (LTPRI) e área (%) em cromatografia monodimensional do óleo essencial da *Alpinia zerumbet*.

Nº.	Nome dos Compostos	LTPRI		%
		Lit	Exp	
<b><i>Hidrocarbonetos de Monoterpenos</i></b>				
7	$\beta$ -pineno <sup>a</sup>	979	985	1.18
27	hidrocarbonetos monoterpenos <sup>a</sup>	-	1189	1.62
24	hidrocarbonetos monoterpenos (3) <sup>a</sup>	-	1065	1.80
25	terpinoleno <sup>a</sup>	1088	1094	1.80
23	hidrocarbonetos monoterpenos (3) <sup>a</sup>	-	1065	1.88
17	$\beta$ -phellandreno <sup>a</sup>	1029	1037	2.53
16	Limoneno <sup>a</sup>	1029	1037	2.87
1	3-thujone <sup>a</sup>	930	930	3.12
2	$\alpha$ -pineno <sup>a</sup>	939	939	4.47
14	$\alpha$ -terpineno <sup>a</sup>	1017	1014	5.05
6	4(10)-thujone <sup>a</sup>	975	978	5.63
22	$\gamma$ -terpineno (3) <sup>a</sup>	<b>1059</b>	<b>1065</b>	<b>6.95</b>
15	<i>p</i> -cimeno <sup>a</sup>	<b>1024</b>	<b>1031</b>	<b>7.59</b>
<b><i>Monoterpenos Oxigenados</i></b>				
55	$\alpha$ -terpineol <sup>h</sup>	1192	1199	1.48
32	monoterpenos oxigenados <sup>a</sup>	-	1037	2.38
52	monoterpenos oxigenados (5) <sup>a</sup>	-	1187	2.94
33	eucaliptol ou 1,8-cineol (2) <sup>a</sup>	<b>1032</b>	<b>1037</b>	<b>9.84</b>
51	terpeno-4-ol (5) <sup>a</sup>	<b>1177</b>	<b>1187</b>	<b>18.47</b>
<b><i>Hidrocarbonetos Sesquiterpenos</i></b>				
81	( <i>Z</i> )- $\beta$ -farneseno <sup>p</sup>	1447	1440	0.58

**Legenda:** <sup>a</sup> – Biblioteca de Adms 2001; <sup>h</sup> - Biblioteca de Yu, Liao, et al., 2007; <sup>p</sup> - Cardeal, da Silva, et al., 2006. As condições cromatográficas são descritas na análise cromatográfica. Lit LTPRI: índice de retenção programado por temperatura linear relatado na literatura científica para DB5 ou fase estacionária similar; DB5 LTPRI: índice de retenção programado por temperatura linear obtido experimentalmente. %: porcentagem de área de cada composto do óleo essencial, considerando que a soma de todas as áreas cromatográficas é igual a 100%. Os nomes dos compostos com áreas cromatográficas superiores a 5% são escritos em negrito.

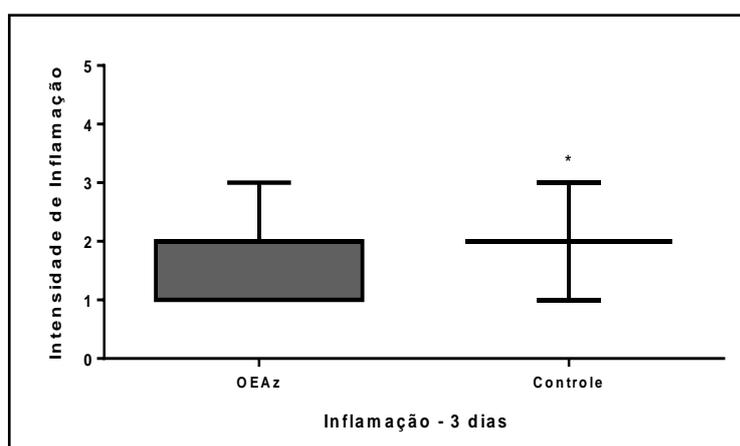


**Figura 3:** Cromatograma monodirecional em intensidade de sinal obtido por Cromatografia e Espectrometria de Massa do óleo essencial das folhas e galhos de *Alpinia zerumbet*.

**Legenda:** A leitura foi realizada nas condições de Gás de arraste: Hélio (He); temperatura inicial de 40 °C; tempo inicial de 1,0 min e a temperatura da coluna aumentou de 3 °C/min. até 220 °C, permanecendo nesta temperatura por 45 min.

## 5.2 Análise da Intensidade Inflamatória

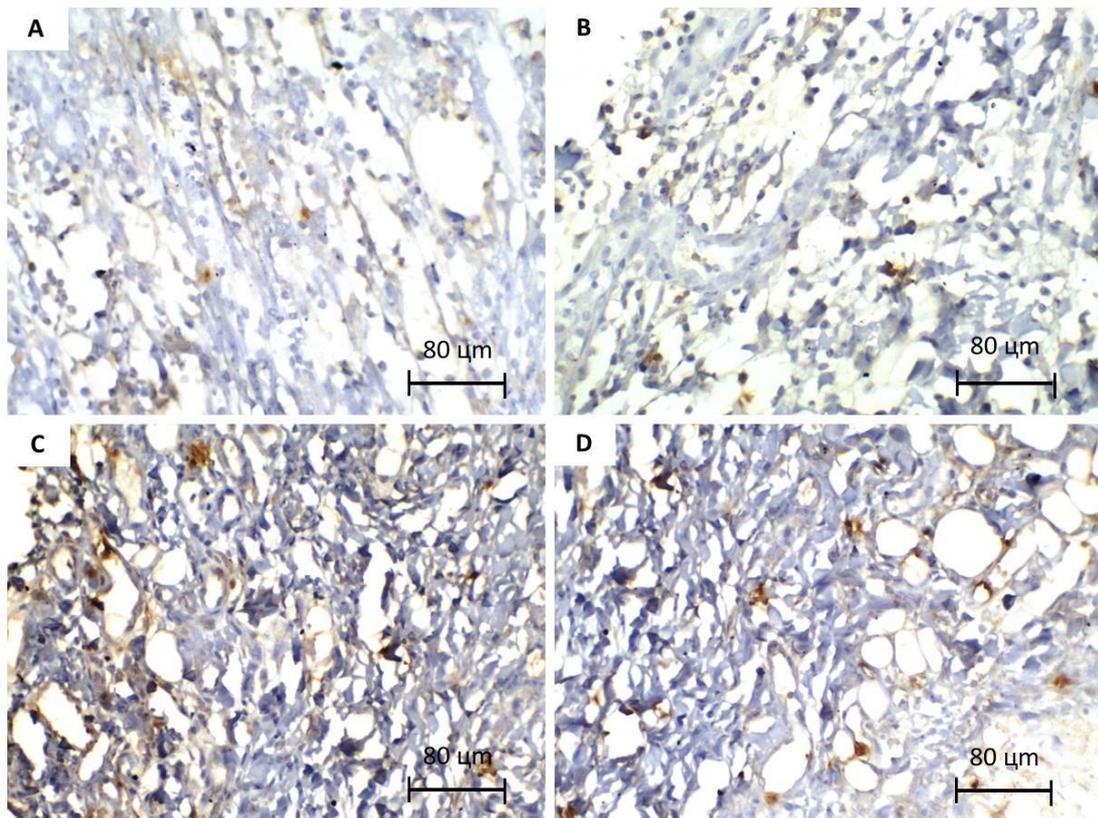
Na análise da intensidade inflamatória em 3 dias observou-se diferença significativa ( $p < 0,02$ ) entre o grupo OEAz e o grupo controle, menor inflamação foi encontrada no grupo OEAZ.



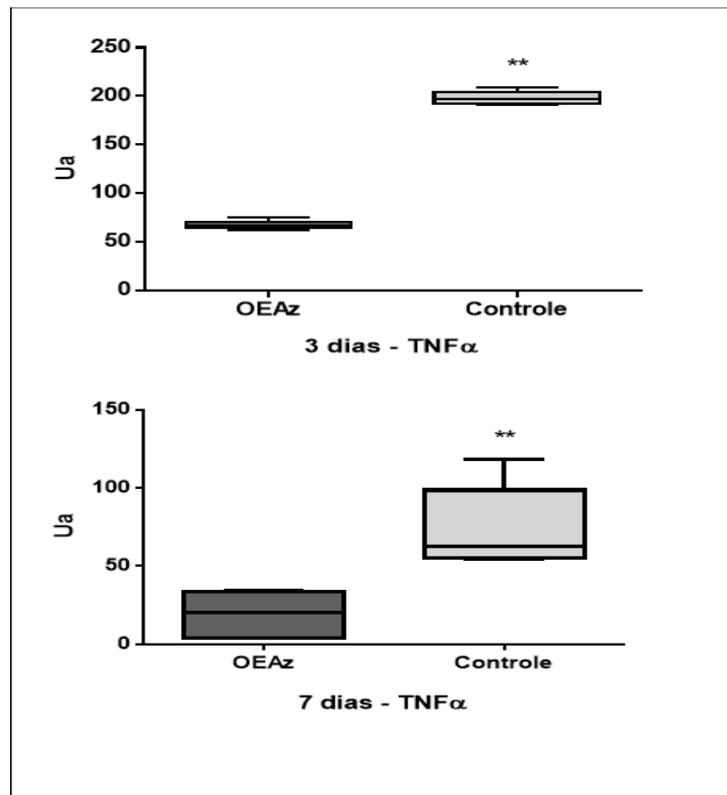
**Figura 4.** Marcação da intensidade inflamatória classificada como ausente (0), suave (1), moderado (2), intenso (3), intenso (4) e intenso (5) pós tenotomia parcial em ratos tratados com o OEAz. *Teste Mann Whitney* com mediana e erro padrão da média; no qual: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

### 5.3 Análise Imunohistoquímica do TNF- $\alpha$

O TNF- $\alpha$  foi expresso em padrão citoplasmático em células inflamatórias (linfócitos e macrófagos) e endoteliais, dispostas difusamente no tecido tendíneo inflamado. Observou-se maior expressão predominantemente intensa em 3 dias e moderada em 7 dias (Figura 5). Em ambos os tempos estudados, o grupo controle apresentou expressão significativamente mais intensa que o grupo OEAz (Figura 6,  $p < 0,001$ ).



**Figura 5.** Fotomicrografias de seções histológicas demonstrando a expressão imunohistoquímica do TNF- $\alpha$  no grupo controle e teste, respectivamente, em 3 dias (A e B) e 7 dias (C e D). Note positividade eminentemente citoplasmática predominantemente em células inflamatórias no tempo de 3 dias, e em células estromais (compatíveis com fibroblastos, histiócitos e células endoteliais) em 7 dias (LSAB, 400 $\times$ ).

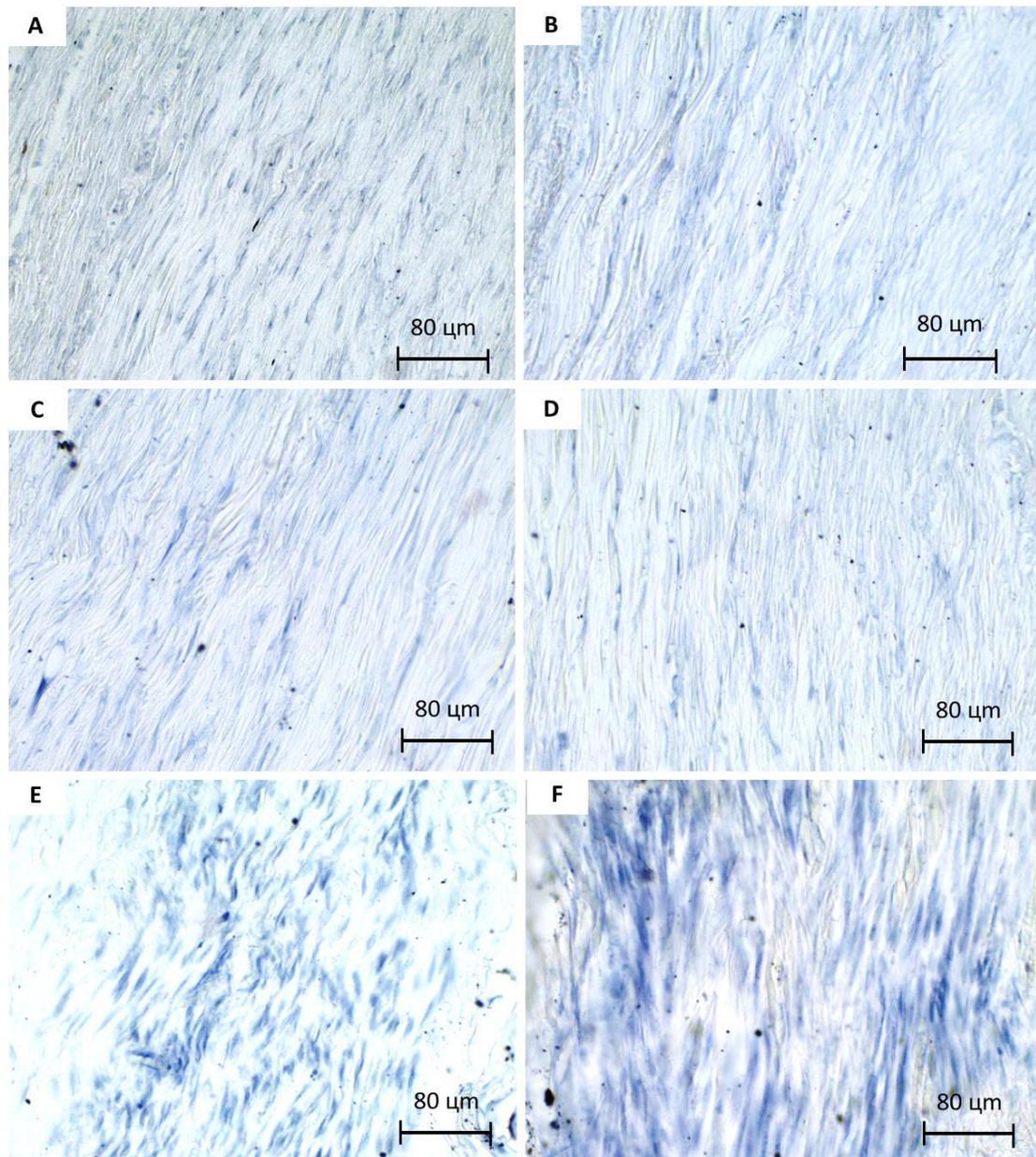


**Figura 6.** Marcação imunohistoquímica da intensidade do TNF- $\alpha$  pós tenotomia parcial em ratos tratados com o OEAz em 3 e 7 dias. *Teste Mann Whitney* com mediana e erro padrão da média; no qual: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

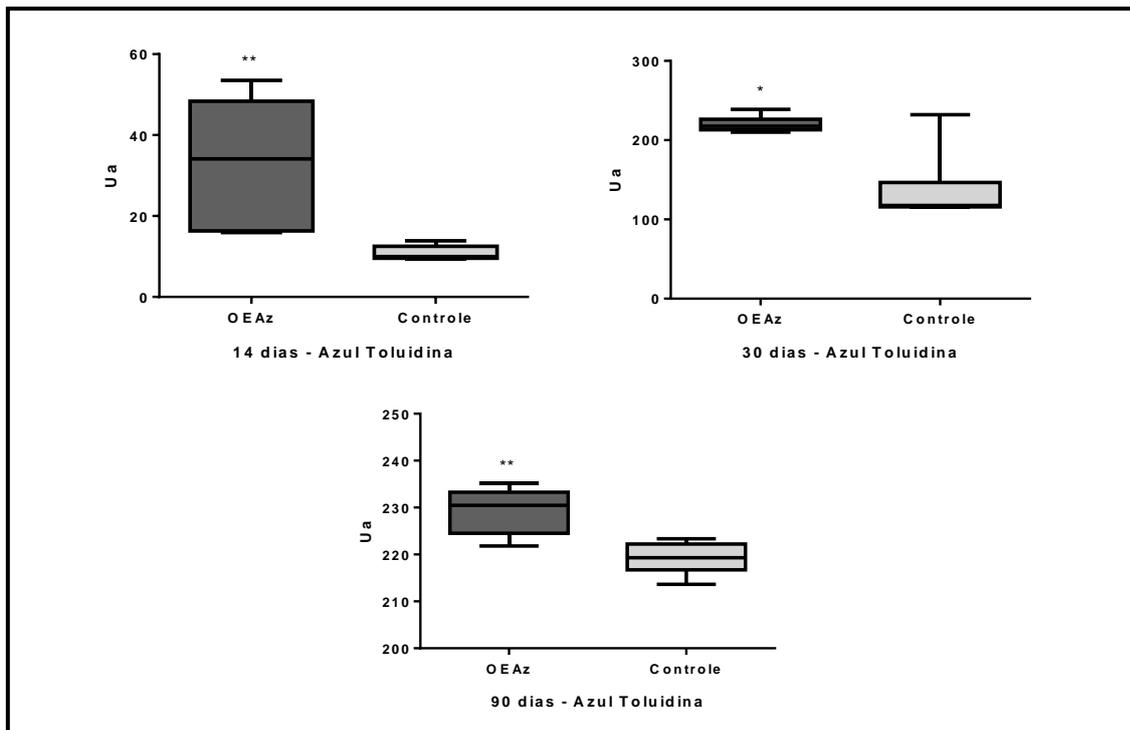
#### 5.4 Análise dos Proteoglicanos Totais

No presente estudo, o azul de toluidina foi utilizado para identificação histoquímica de proteoglicanos e glicosaminoglicanos na matriz extracelular (Figura 7). Em todos os tempos experimentais da fase tardia de reparo (14, 30 e 90 dias) foi evidenciada forte coloração histoquímica para o azul de toluidina, sugerindo presença de conteúdo expressivo de glicosaminaoglicanas e proteoglicanas nos tecidos, que apresentaram nítido aumento progressivo no teor destes constituintes ao longo do período experimental.

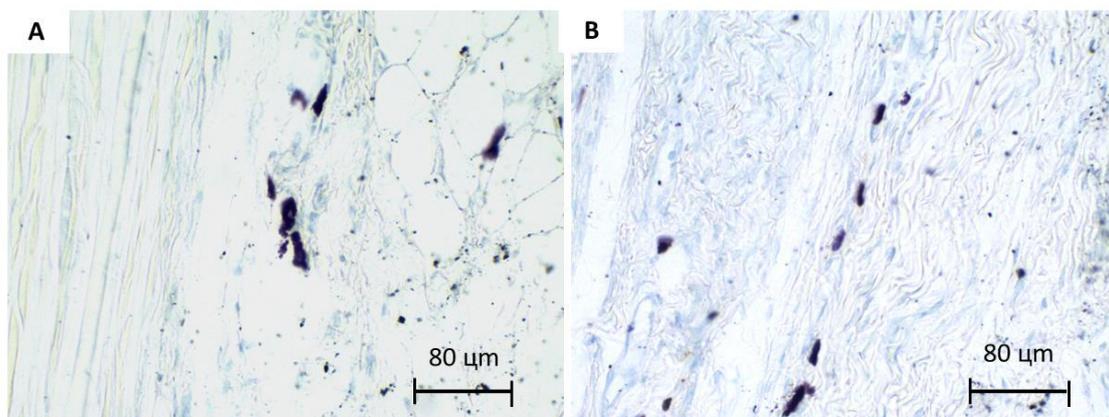
Além disso, a intensidade de marcação dos tecidos corados em azul de toluidina no grupo OEAz foi significativamente maior que no grupo controle em 14 ( $p < 0,05$ ), 30 ( $p < 0,05$ ) e 90 dias ( $p < 0,05$ ) (Figura 8). De especial interesse foi a identificação, no tecido tendíneo corado em azul de toluidina, de células ovoides volumosas, com citoplasma amplo e rico em granulações grosseiras metacromáticas (coradas em violeta), distribuídas irregularmente ao longo dos tendões, interpretadas como mastócitos (Figura 9).



**Figura 7.** Fotomicrografias de secções histológicas coradas em azul de toluidina destacando a presença de glicosaminoglicanas e proteoglicanas nos grupos controle e teste, respectivamente, em 14 (A e B), 30 (C e D) e 90 dias (E e F) (azul de toluidina, 400x).



**Figura 8:** Marcação da intensidade de Proteoglicanos totais através do Azul de Toluidina pós-tenotomia parcial do tendão do calcâneo em 14, 30 e 90 dias. *Teste Mann Whitney* com mediana e erro padrão da média; onde: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

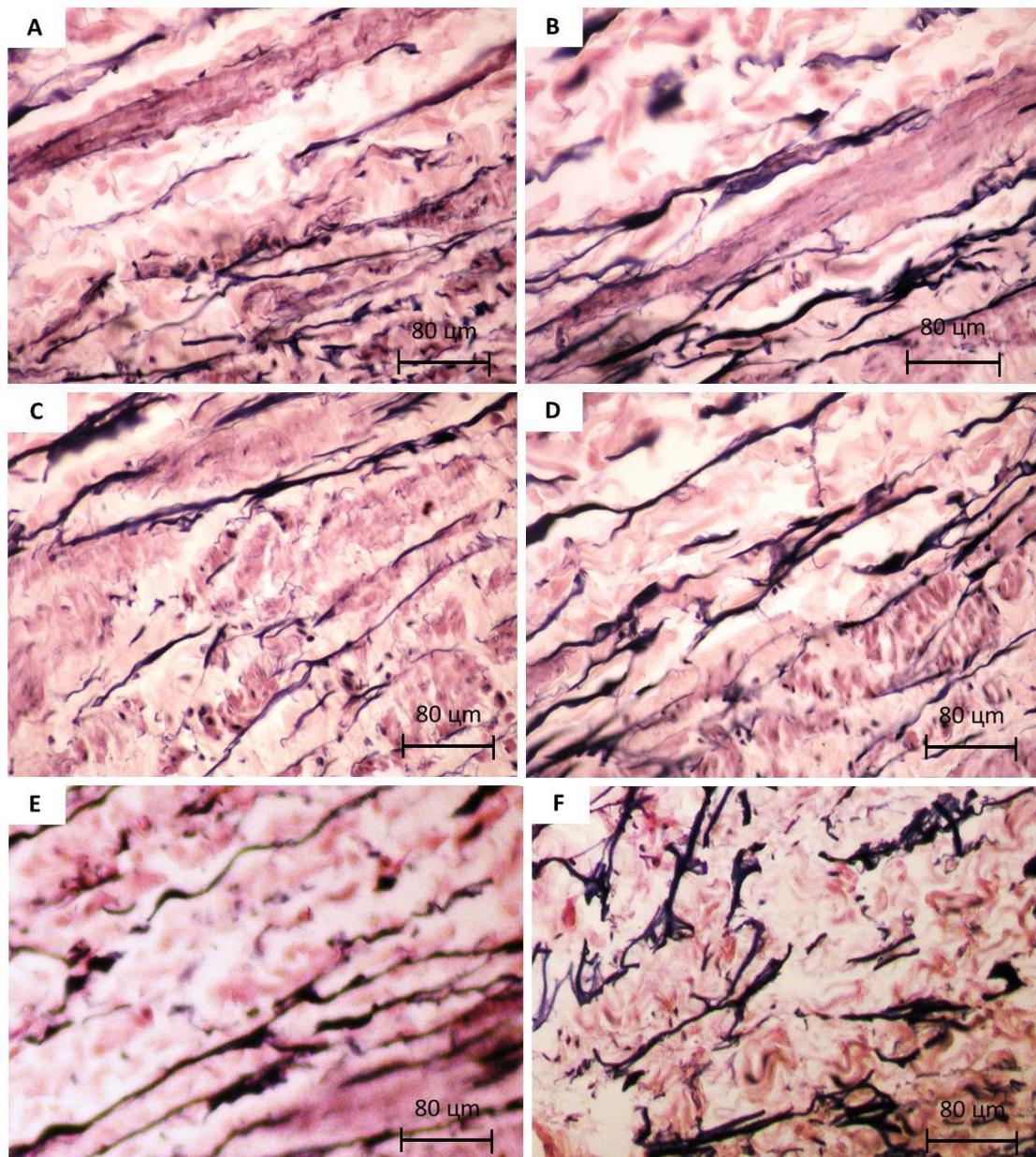


**Figura 9.** Fotomicrografias de secções histológicas coradas em azul de toluidina destacando a presença de células ovoides volumosas com citoplasma rico em grânulos metacromáticos grosseiros interpretadas como mastócitos nos grupos controle e teste em 90 dias (A e B) (azul de toluidina, 400×).

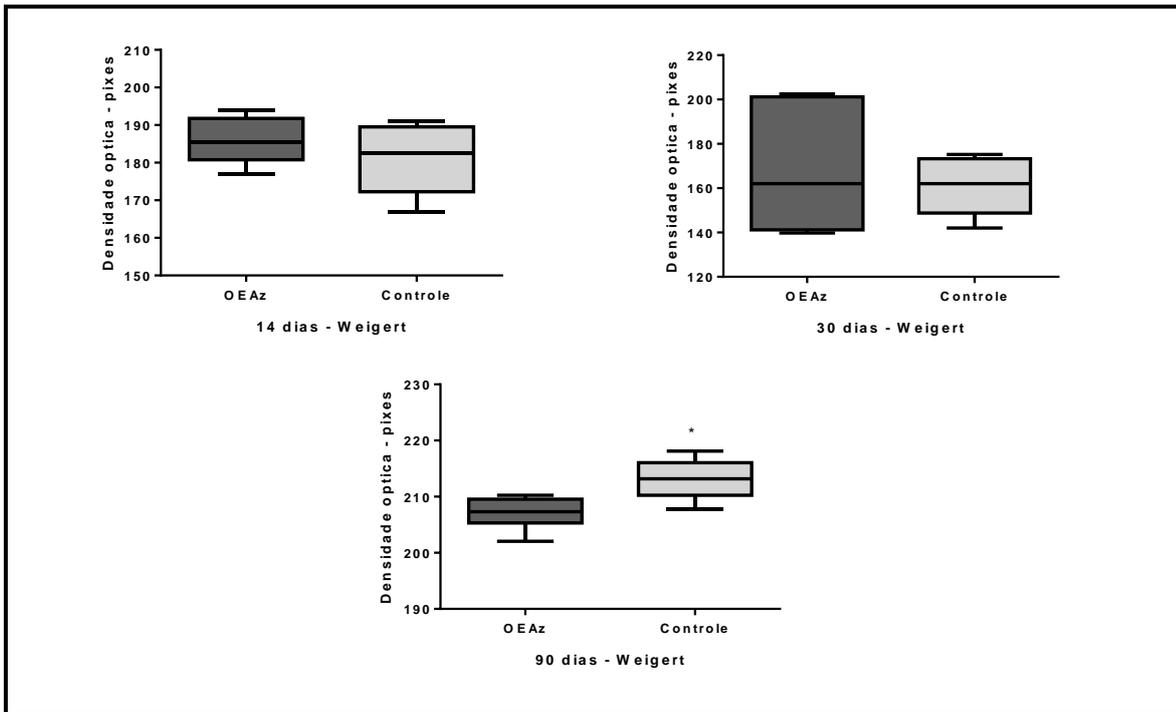
### 5.5 Análise das Fibras Elásticas

No presente estudo, a densidade de deposição, distribuição e arranjo das fibras elásticas tendíneas foram analisadas utilizando a técnica histoquímica de Weigert. Em todos os períodos avaliados, as fibras elásticas se apresentaram como estruturas fibrilares escuras delgadas, por

vezes ramificadas ou “em tufo”, que se destacavam em meio ao tecido conjuntivo fibroso (Figura 10). Não foi observada diferença significativa na análise quantitativa das fibras elásticas entre os grupos nos tempos 14 e 30 dias, apenas aos 90 dias (Figura 11,  $p < 0,05$ ).

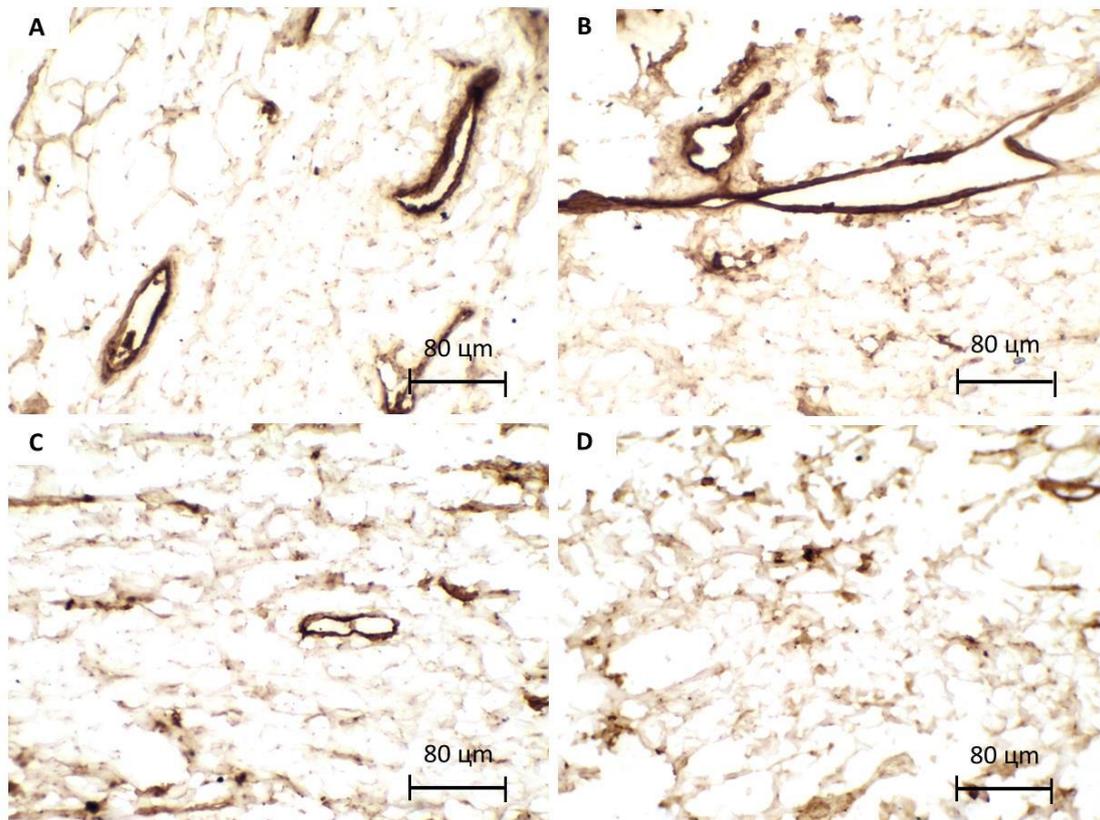


**Figura 10.** Fotomicrografias de secções histológicas coradas em Weigert destacando a deposição de fibras elásticas (coradas em negro) nos grupos controle e teste, respectivamente, em 14 (A e B), 30 (C e D) e 90 dias (E e F). Observe que estas exibem morfologia fibrilar predominantemente curta e adelgada, por vezes apresentando ramificações que, quando em grande quantidade, conferiam as fibrilas um aspecto de “tufo”, com distribuição irregular no tecido conjuntivo tendíneo (Weigert, 400x).

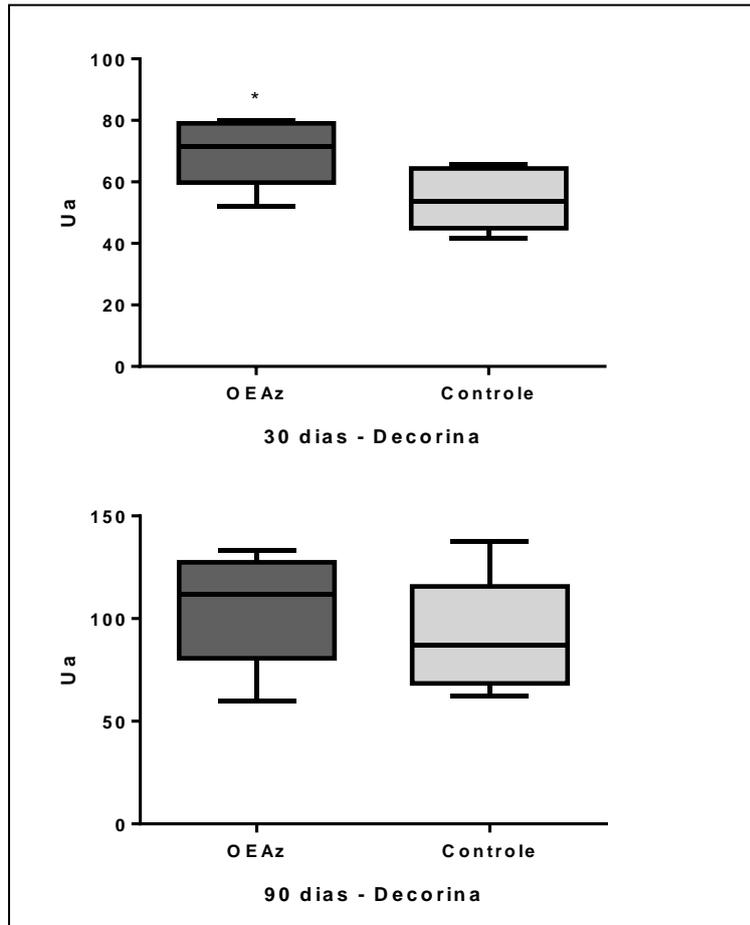


**Figura 11:** Marcação de intensidade das fibras elásticas através do Weigert Van Gieson pós-tenotomia parcial do tendão do calcâneo em 14, 30 e 90 dias. *Teste Mann Whitney* com mediana e erro padrão da média; onde: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

## 5.6 Análise Imunohistoquímica da Decorina



**Figura 12.** Fotomicrografias de secções histológicas demonstrando a expressão imunohistoquímica da decorina no grupo controle e teste em 30 dias (A e B) e 90 dias (C e D). Note positividade em matriz extracelular sob a forma de estruturas fibrilares, delgadas e onduladas, ora paralelas ora entrelaçadas, bem como expressão citoplasmática em células endoteliais destacando a rede vascular madura neoformada (LSAB, 400x).

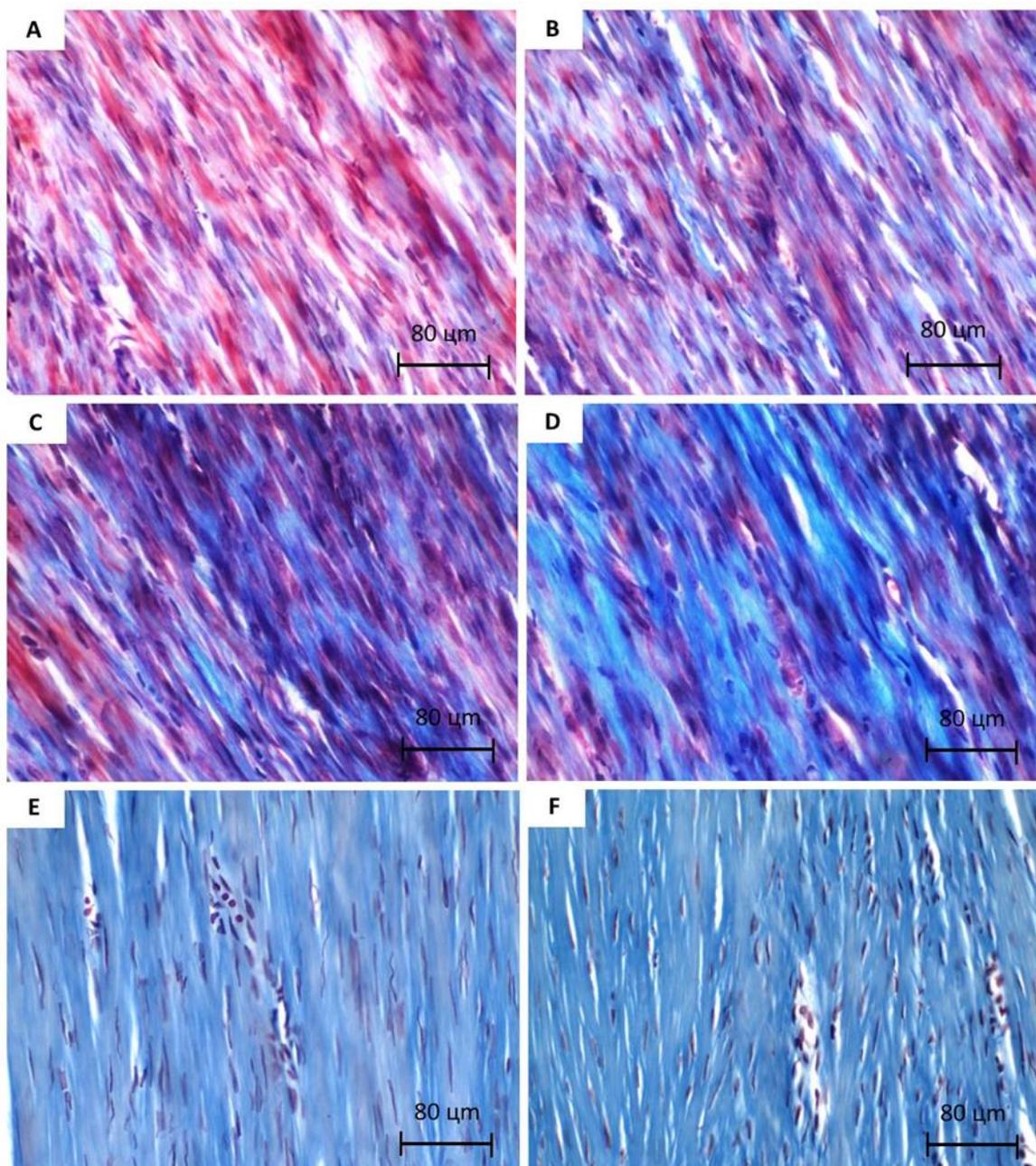


**Figura 13:** Marcação de intensidade do proteoglicano Decorina em tenotomia parcial de calcâneo tratado com óleo essencial da *Alpinia zerumbet* por 30 e 90 dias. *Teste Mann Whitney* com mediana e erro padrão da média; onde: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

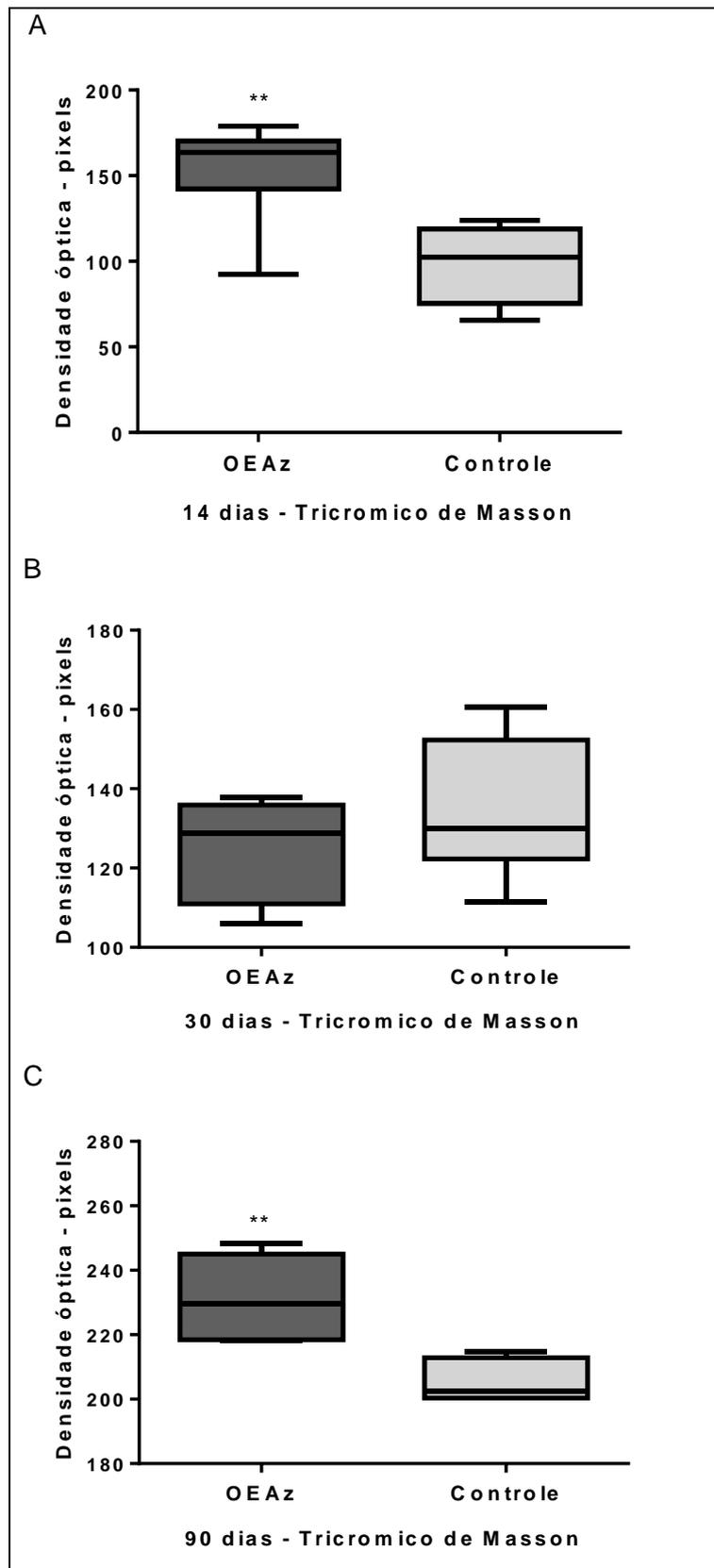
## 5.7 Análise do Colágeno

### 5.7.1 Tricrômico de Masson e Picrossírius

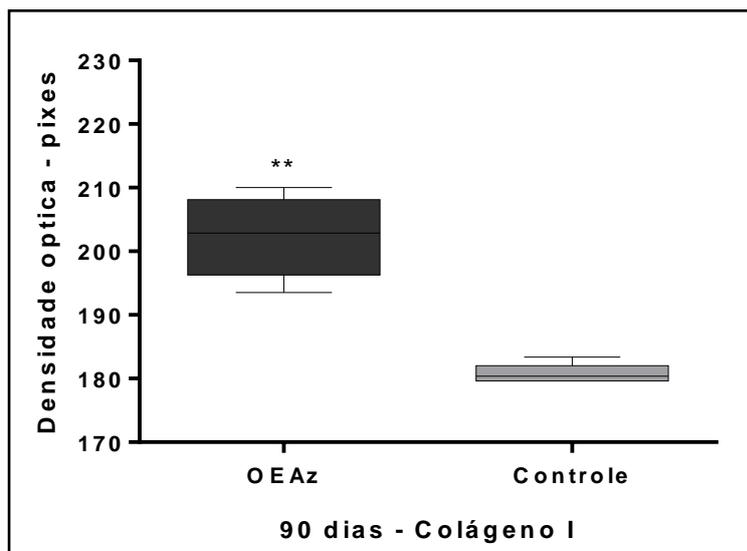
A técnica histoquímica do tricrômico de Masson foi utilizada para identificação das fibras colágenas (coradas em azul) nas fases tardias do processo de reparo tendíneo. Nos três tempos analisados (14, 30 e 90 dias) as fibras colágenas se apresentaram longas e dispostas em arranjo uniforme e paralelo umas as outras. A intensidade da deposição de fibras colágenas aumentou substancialmente ao longo do tempo em ambos os grupos, os feixes exibindo aparência mais delgada e delicada em 14 dias, e aumentando a densidade e espessura progressivamente até 90 dias (Figura 14). A análise quantitativa demonstrou uma maior densidade de deposição de fibras colágenas no grupo OEAz comparado ao grupo controle nos dias 14 e 90 (Figura 15,  $p < 0,05$ )



**Figura 14.** Fotomicrografias de secções histológicas coradas em tricrômico de Massom destacando a deposição de fibras colágenas (coradas em azul) nos grupos controle e OEAz, respectivamente, em 14 (A e B), 30 (C e D) e 90 dias (E e F). Observe aumento progressivo da colagenização ao longo do tempo e a maior densidade de deposição de fibras colágenas no grupo teste comparado ao grupo controle em 14 e 90 dias (tricrômico, 400x).



**Figura 15:** Marcação da intensidade do colágeno total, pós tenotomia parcial do tendão calcâneo em ratos, através do Tricrômico de Masson do grupo OEAz e seu controle, em 14 (A), 30 (B) e 90 (C) dias. *Teste Mann Whitney* com mediana e erro padrão da média; onde: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .



**Figura 16:** Marcação da intensidade do colágeno tipo I, pós tenotomia parcial do tendão calcâneo em ratos, através do Picrossírius em 90 dias. *Teste Mann Whitney* com mediana e erro padrão da média; onde: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

## 6. DISCUSSÃO

A cromatografia do OEAz teve como principais contribuições individuais em termos de área cromatográfica de sesquiterpenos o óxido de cariofileno (2,18%) e cariofileno (1,31%). Todos esses compostos foram encontrados no óleo essencial de *Alpinia zerumbet*, embora a porcentagem de cada um possa variar em diferentes pesquisas. Como exemplo, o óxido de cariofileno foi o segundo maior composto (7,56%) após terpinen-4-ol (37,45%) em outro óleo essencial brasileiro de *Alpinia zerumbet* (de Vitória, Espírito Santo), enquanto o eucalyptol (4,02%) foi o quarto composto em termos de porcentagem relativa da área cromatográfica.

Murakami et al. (2009) encontraram o p-cimeno como principal componente do óleo essencial (28,0%), enquanto o eucalyptol e o terpeno-4-ol apresentaram 17,9 e 11,9% da área cromatográfica relativa, respectivamente. O óleo da *Alpinia zerumbet* é uma matéria-prima promissora em termos de atividades biológicas benéficas para várias aplicações (CUNHA et al., 2013). Estes resultados são semelhantes aos encontrados em outros estudos com o OEAz (SANTOS et al., 2011).

Na análise da intensidade inflamatória em 3 dias observou-se diferença significativa ( $p < 0,02$ ) entre o grupo OEAz e o grupo controle, menor inflamação foi encontrada no grupo OEAz. Os estudos de Juergens et al., (1998), confirmam estes resultados, utilizou-se o 1,8 cineol, que é princípio ativo do OEAz, e este, apresentou efeito anti-inflamatório mucolítico de vias aéreas, observando-se ação em monócitos em pacientes com asma, com inibição de leucotrienos e

prostaglandina 2, além da inibição na produção de TNF- $\alpha$ , interleucina 1, leucotrieno 4 e tromboxano.

Outras pesquisas apresentaram efeitos anti-inflamatórios que ratificam esta pesquisa como os estudos de Koh et al. (2011) em que o terpeno 4-ol e o 1,8 cineol mostraram atividade inibitória e vasodilatadora da histamina via dérmica. Khalil et al. (2004) demonstraram que o terpeno 4-ol e o 1,8 cineol atuaram na diminuição da inflamação nos tempos 50, 60 e 70 minutos. Lee et al. (2010) descreveram os efeitos antiinflamatórios e antinociceptivos da *Alpinia* em ratos com artrite.

Na figura 6 evidenciou-se diferença significativa entre os grupos estudados em 3 e 7 dias com relação ao TNF- $\alpha$ , o grupo OEAz apresentou menores quantidades da citocina. O TNF-  $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória que potencializa a inflamação. Seu aumento dificulta o processo de reparo e a cicatrização devido a potencialização da inflamação. Também é capaz de induzir tendinites e processos degenerativos no tendão, neste estudo os índices deram menores em relação ao grupo controle, o que sugere menor inflamação e melhor processo de reparo do tendão (GAIDA et al., 2016; FORSGREN et al., 2012; SPANG et al., 2017).

Ma et al. (2017) relataram que a inibição do TNF-  $\alpha$  pode proteger os estágios iniciais da remodelação do tendão, diminuir a inflamação e promover um melhor reparo tecidual, o que confirma os achados deste estudo.

Os resultados deste estudo são também elucidados por Kozlovskaja et al. (2017) que realizaram uma revisão sistemática que mostrou a importância dos biomarcadores como instrumento de caracterização das tendinopatias, dentre eles o TNF-  $\alpha$ . GAIDA et al. (2012) e JILL et al. (2016) também evidenciaram a influência do TNF-  $\alpha$  no tenócito na formação da tendinite, quanto maior a quantidade de TNF-  $\alpha$  maior a chance de inflamação.

A figura 7 representa o índice de proteoglicanos totais em 14, 30 e 90 dias entre os grupos estudados. O maior nível deles foi encontrado no grupo OEAz com diferença significativa. Os proteoglicanos são componentes da matriz extracelular responsáveis pela redução da inflamação e pelas características tênsis do tendão, portanto sua maior quantidade no grupo OEAz lhe confere maior resistência e funcionalidade.

Huisman et al. (2014) notificaram que tendões danificados apresentavam menor nível de proteoglicanos totais quando comparados a tendões saudáveis. Ainda segundo Yoon et al. (2005) e Halper et al. (2014) são os proteoglicanos que regulam a fibrilogênese do colágeno, ou seja, a formação e maturação do colágeno, que, indiretamente regulam a função do tendão.

Neste estudo a quantidade de proteoglicanos totais foi maior no grupo OEAz, que concorda com os estudos acima citados.

Os estudos de Ansorge et al. (2012) demonstraram que o aumento de proteoglicanos beneficia e acelera a cicatrização do tendão, ratificando os resultados deste trabalho. A utilização de óleos essenciais obtidos a partir das plantas, apresentam vasto benefício sobre o processo inflamatório, estudos como o de Santos Júnior et al. (2017) também mostraram semelhança com este estudo, ao relatar que grupos tratados com o OEAz possuem menor resposta inflamatória do que os tratados somente com óleo vegetal, o que corrobora para o aumento significativo de proteoglicanos nesta fase do reparo tecidual.

A figura 11 representa a quantidade de fibras elásticas nos dois grupos estudados, na qual não houve diferença estatística entre os grupos nos tempos 14 e 30 dias, apenas houve diferença aos 90 dias. No tendão a quantidade de fibras elásticas é mínima, corresponde de 3 a 5% do seu peso úmido. Caso o tendão possua uma grande quantidade de fibras elásticas ele perde a sua resistência tênsil e aumenta em elasticidade, o que proporciona um maior número de lesões devido a ruptura das fibras.

Ao passo que se esse tendão não tiver a porcentagem mínima de fibras elásticas ele se torna muito rígido e mais susceptível a rupturas. Os resultados deste estudo corroboram os da literatura e evidenciam uma quantidade fisiológica de fibras elásticas o que confere maior funcionalidade ao tendão. Durante a reparação tecidual, parte do colágeno tipo III, elástico, é substituído pelo colágeno tipo I que aumenta as características tênsis do tendão. Estudo confirma estes resultados, ao mostrar que o fator transformador de crescimento (TGF- $\beta$ ) consegue diminuir a expressão gênica de pro-colágeno tipo III e aumentar a expressão de procolágeno tipo I, influenciando na regulação das forças mecânicas do tendão (LABAT, 2015).

Segundo Labat (2015), o proteoglicano decorina é responsável pelo aumento na síntese de colágeno e também atua como agente anti-inflamatório, promovendo uma melhor cicatrização, com menores perdas funcionais para o tendão, o que ratifica os resultados desta pesquisa.

Neste trabalho houve uma diferença estatística no grupo OEAz em relação ao grupo controle evidenciando a maior presença de decorina em 30 dias e não houve diferença aos 90 dias. Os estudos de Ansorge et al (2012) afirmam que a decorina inibe o TNF-  $\alpha$ , as citocinas pró-inflamatórias, estimulam as citocinas anti-inflamatórias e devem estar presentes na fase fibroblástica da inflamação, o que justifica seu aumento significativo aos 30 dias e não nos 90

dias. Essa afirmação reforça o presente resultado com a melhor resposta anti-inflamatória do grupo OEAz.

Os resultados deste estudo concordam com Lorda-diez et al. (2014) ao mostrarem que as decorinas são as principais proteínas não colagenosas da membrana extracelular. As mesmas regulam o agrupamento e crescimento das fibras colágenas para manter a estrutura da matriz extracelular. Ainda no grupo OEAz houve uma maior quantidade de decorina em relação ao grupo Controle. A quantidade de proteoglicano no tendão pode variar dependendo dos estímulos mecânicos que este recebe e quanto maior esse estímulo melhor ficará a qualidade do tendão.

Observou-se, na figura 15, uma maior quantidade de colágeno total no grupo OEAz, nos tempos 14 e 90 dias, este estudo assemelha-se ao de Geremias (2011) ao demonstrar que a maior quantidade de colágeno total no grupo OEAz aos 14 dias, fará diferença no reparo pois proporciona alinhamento e remodelação das fibras colágenas, desta forma promove ao tendão uma maior resistência tensil e ao cisalhamento, o que resulta em um tendão com propriedades biomecânicas mais próximas do funcional.

Aos 30 dias não se observou diferença entre os dois grupos e isso pode ser explicado pelo fato de que nesse período é que se tem a maior deposição das fibras colágenas. A maior quantidade aos 14 dias modulará a cicatrização aos 30 dias e aos 90 dias, no qual se observou uma maior quantidade de colágeno total no grupo OEAz já que o colágeno será o regulador da função desse tendão e devolverá a ele as suas funções mecânicas de resistência tênsil e elasticidade (LUNDING et al., 2014).

A figura 16, mostra maior intensidade de colágeno tipo I no grupo OEAz quando comparado ao grupo controle. O colágeno tipo I deve ser o prevalente na estrutura morfológica do tendão (95 a 98% do peso úmido), é dito que ele proporciona a estrutura tênsil, a força e a resistência; contudo, são necessárias quantidades mínimas de colágeno tipo III (3 a 5% do peso úmido) para dar a viscoelasticidade do tendão, que ratifica os resultados aqui encontrados (ANSORGE et al., 2012; LUNDING et al., 2014).

Os estudos de Freedman et al., (2014) e Huisman et al., (2014) assemelham-se a esta pesquisa ao demonstrarem que o tendão calcâneo é formado de 95 a 98% desse mesmo do colágeno tipo I, o qual concede a resistência e a rigidez e de 3 a 5% de colágeno tipo III, que propicia a elasticidade.

Os estudos de Labat (2015) confirmam os resultados apresentados pelo grupo OEAz desta pesquisa, ao afirmarem que o aumento do colágeno tipo III pode causar uma diminuição da resistência a tração e sua diminuição confere ao tendão uma rigidez excessiva que difere da biomecânica normal do tendão.

O tendão sadio tem a capacidade de controlar cargas unidirecionais, por isso suas fibras são arranjadas em paralelo. Ele deve ser bem rígido à tração, ao mesmo tempo possuir pequena resistência à compressão ou ao cisalhamento. A substituição do colágeno tipo III para o tipo I aumenta as características tênsis do tendão, o que também foi evidenciado neste estudo (KELLER et al., 2011).

## 7. CONCLUSÃO

Concluiu-se que o óleo da *Alpinia zerumbet* influenciou positivamente o processo de reparo tecidual pós tenotomia parcial do tendão calcâneo em ratos, nas fases inicial e tardia. A modulação dos fatores pró e antiinflamatórios, a otimização da cicatrização, a restauração das propriedades biológicas resultaram em um tendão com melhor funcionalidade.

Sugerem-se novos estudos com maior número de grupos incluindo: grupo sem lesão e grupo Sham; grupo com uso de antiinflamatórios esteroidais e não-esteroidais, além da análise de novas variáveis como: fatores de crescimento, interleucinas, citocinas e metaloproteínas, no sentido de elucidar os mecanismos fisiológicos existentes para a resposta alcançada de melhor cicatrização do tendão.

## 8. REFERÊNCIAS

ABATE, M; SILBERNAGEL, K.G; SILJEHOLM, C; DIORIO, A; AMICIS, D; SALINI, V. Pathogenesis of tendinopathies: inflammation or degeneration? *Arthritis Research & Therapy* 2009; 11(3):235.

AKESEN, B; DEMIRAG, B; BUDAK, F. Evaluation of intra-articular collagenase, TIMP-1, and TNF-alpha levels before and after anterior cruciate ligament reconstruction. *Acta Orthop Traumatol Turc* 2009; 43(3):214-8.

ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L. C.; BARRETO, S. A. L.; PIRES, A. J.; REIS, P. F.; LIMA, O. S.; RIBEIRO, G. M. A.; CARDOSO, C. J. Effect of bovine type-I collagen-based films containing red propolis on dermal wound healing in rodent model. *International Journal of Morphology* 2009; 27(4): 1105-1110.

ANDARAWIS-PURI, N; FLATOW EL; SOSLOWSKY, L.J. Ciência básica do tendão: Desenvolvimento, reparação, regeneração e cura. *Journal Orthopaedic Research* 2015; 33 (6): 780-4.

ANSORGE, HEATHER L; HSU, JASON E; EDELSTEIN, LENA; ADAMS, SHEILA; BIRK, DAVID E; SOSLOWSKY, LOUIS J. Recapitulation of the Achilles tendon mechanical properties during neonatal development: a study of differential healing during two stages of development in a mouse model. *Journal Orthopaedic Research* 2012; 30(3): 448-56.

BENNY, A.; BALG, F.; SVOTELIS, A.; VÉZINA F. Reconstruction of Overlengthening After Gastrocnemius Recession With an Achilles Tendon Allograft: Case Report. *Foot & Ankle International* 2016; 37(11):1249-1254.

BOESEN, A. P; HANSEN, R; BOESEN, M. I; MALLIARAS, P; LANGBERG, H. Effect of high-volume injection, platelet-rich plasma, and sham treatment in chronic midportion achilles tendinopathy: a randomized double-blinded prospective study. *American Journal of Sports Medicine* 2017; 45(9): 2034-2043P.

BORGES, F.S. *Dermato-funcional: modalidades terapêuticas nas disfunções estéticas*. São Paulo: *Phorte*, 2006.

CAL, K. Effect of physicochemical properties of cyclic terpenes on their ex vivo skin absorption and elimination kinetics. *Journal of Dermatological Science* 2006; 41(2): 137-42.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Revista Brasileira de Pesquisa Médica e Biológica* 2000; 33(2):179-89.

CERQUEIRA, F.L.; JUNIOR, R.L.C.A.; ZINI, C.A.; CARAMÃO, E.B.; CÂNDIDO, E.A.F. Efeitos da cinesioterapia associada ao bioproduto à base do óleo essencial da *Alpinia zerumbet* sobre o colágeno dos tecidos musculares espásticos de ratos pós-lesão medular. *Revista Científica Internacional* 2015; 4(10): 127-206.

CHAN, K. M.; FU, S. C. Anti-inflammatory management for tendon injuries – friends or foes? *Sports MED. Arthrosc. Rehabil. Ther. Technol* 2009; 1(1): 23.

CUNHA, G.H; MORAES, M.O; FECHINE, F.V; BEZERRA, F. A. F; SILVEIRA, E. R; CANUTO, K. M. Vasorelaxant and antihypertensive effects of methanolic fraction of the essential oil of *Alpinia zerumbet*. *Vascular Pharmacology* 2013; 58 337–345.

DAYTON, P. Anatomic, Vascular, and Mechanical Overview of the Achilles Tendon. *Clinics in Podiatric Medicine Surgery* 2017; 34(2): 107-113p.

DOHNERT, M. B.; FERREIRA, G. K.; SILVEIRA, P. C. L.; ZANONI, E. T.; DOHNERT, L. H.; SOUZA, C. T. Inflammatory Cytokines Content in Achilles Tendinopathy after Phonophoresis Treatment Combined with Gold Nanoparticles and Diclophenac Diethylammonium in Rats. *Inflammation* 2015; 38(3):1044-9.

DORAL, M.N; ALAM, M; BOZKURT, M; TURHAN, E; ATAY, O. A; DÖNMEZ, G; MAFFULLI, N. Functional anatomy of the Achilles tendon. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy* 2010; 5 (18): 638-43.

ENWEMEKA CS, REDDY K. The biological effects of laser therapy and other modalities on connective tissue repair process. *Laser Therapy* 2000; 12:22-30.

EVROVA, O; HOUSKA, J; WELTI, M; BONAVOGLIA, E; CALCAGNI, M; GIOVANOLI, P; VOGEL, V; BUSCHMANN, J. Bioactive, Elastic, and Biodegradable Emulsion Electrospun DegraPol Tube Delivering PDGF-BB for Tendon Rupture Repair. *Macromolecular Bioscience* 2016; 16(7): 1048-63.

FERREIRA, R; SILVA, R; FOLHA, R. A C; POLACOW, M. L. O; TEODORI, R.M; PINFILDI, C. E. Achilles Tendon Vascularization of Proximal, Medial, and Distal Portion Before and After Partial Lesion in Rats Treated with Phototherapy. *Photomed Laser Surgery* 2015; 33(12): 579-84.

FILLIPIN, L.I; MAURIZ, J.L; VEDOVELLI, K; MOREIRA, A.J; ZETTLER, C.G; LECH, O. Low-level laser therapy (LLL) prevents oxidative stress and reduces fibrosis in rat traumatized Achilles tendon. *Lasers Surg Med* 2005; 37(4):293-300.

FORSGREN, S; GAIDA, J; BAGGE, J; PURDAM, C; COOK, J; ALFREDSON, H. Evidence of the TNF- $\alpha$  system in the human Achilles tendon: expression of TNF- $\alpha$  and TNF receptor at both protein and mRNA levels in the tenocytes. *Cells Tissues Organs* 2012; 196(4):339-52.

FREEDMAN, B.R; GORDON, J.A; SOSLOWSKY, L.J. The Achilles tendon: fundamental properties and mechanisms governing healing. *Muscles Ligaments Tendons J* 2014; 14;4(2):245-55.

GAIDA, J. E; ALFREDSON, H; FORSGREN, S; COOK, J. L. A pilot study on biomarkers for tendinopathy: lower levels of serum TNF- $\alpha$  and other cytokines in females but not males with Achilles tendinopathy. *BMC Sports Sci Med Rehabil* 2016; 8: 5.

GAIDA, J.E; BAGGE, J; PURDAM, C; COOK, J; ALFREDSON, H; FORSGREN, S. Evidence of the TNF- $\alpha$  system in the human Achilles tendon: expression of TNF- $\alpha$  and TNF receptor at both protein and mRNA levels in the tenocytes. *Cells Tissues Organs* 2012; 196(4):339-52.

GEREMIAS, J. M. Ruptura total do tendão de aquiles: propriedades mecânicas tendíneas em indivíduos submetidos a diferentes protocolos de reabilitação Mestrado em Ciências do Movimento Humano. Porto Alegre [Dissertação]. Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2011.

GEROMINI, K.V.N.; RORATTO, F.B.; FERREIRA, F.G.; POLIDO, P.P.; SOUZA, S.G.H.; VALLE, J.S.; COLAUTO, N. B.; LINDE, G. A. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas medicinais. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia* 2012; 15(2): 127-131.

HALPER J. Advances in the use of growth factors for treatment of disorders of soft tissues. *Advances Experimental Medicine Biology* 2014; 802, 59–76.

HASE, E.; SATO, K.; YONEKURA, D.; MINAMIKAWA, T.; TAKAHASHI, M.; YASUI, T. Evaluation of the histological and mechanical features of tendon healing in a rabbit model with the use of second-harmonic-generation imaging and tensile testing. *Bone Joint Research* 2016; 5(11): 577-585.

HUISMAN ES, ANDERSSON G, SCOTT A, RENO CR, HART DA, THORNTON GM. Regional molecular and cellular differences in the female rabbit Achilles tendon complex: potential implications for understanding responses to loading. *Journal of Anatomy* 2014; 224(5):538-547.

JACOBSON, E.; DART, A.J.; MONDORI, T.; HORADOGODA, N.; JEFFCOTT, L.B.; LITTLE, C.B.; SMITH, M.M. Focal experimental injury leads to widespread gene expression and histologic changes in equine flexor tendons. *Plos One* 2015; 10(4):1-25.

JILL, L, C; JAMES, E, G; ALFREDSON, H; FORSGREN, S; A pilot study on biomarkers for tendinopathy: lower levels of serum TNF- $\alpha$  and other cytokines in females but not males with Achilles tendinopathy. *BMC Sports Sci Med Rehabil.* 2016; 8:5.

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* 2008; 466(7):1577-82.

KATSMA, M. S; PATEL, S. H; ELDON, E; CORBELL, K. A; SHIMKUS, K. L; FLUCKEY, J. D; CARROLL, C. C. The influence of chronic IL-6 exposure, in vivo, on rat Achilles tendon extracellular matrix. *Cytokine* 2017; 93: 10-14.

KELLER, THOMAS C; HOGAN, MACALUS V; KESTURU, GIRISH; JAMES, ROSHAN; BALIAN, GARY; CHHABRA, A BOBBY. Growth/differentiation factor-5 modulates the synthesis and expression of extracellular matrix and cell-adhesion-related molecules of rat Achilles tendon fibroblasts. *Connect Tissue Res* 2011; 52(4): 353-64.

KHALIL, Z; PEARCE, A.L; SATKUNANATHAN, N; STORER, E; FINLAY-JONES, J.J; HART, P.H. Regulation of Wheal and Flare by Tea Tree Oil: Complementary Human and Rodent Studies. *Journal of Investigative Dermatology* 2004, 123(4): 683- 90.

KOH, T. J; DIPIETRO, L. A. Inflammation and wound healing: the role of macrophage. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 2011; 13(1):23.

KOZLOVSKAIA, M; VLAHOVICH, N; ASHTON, K,J; HUGHES, D,C. Biomedical Risk Factors of Achilles Tendinopathy in Physically Active People: a Systematic Review. *Sports Med Open* 2017; 3(1):20.

KRIECK, C.; FINATTO, T.; MÜLLER, T.S.; GUERRA, M.P.; ORTH, A.I. Biologia reprodutiva de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L.Burr & R.M.Sm. (*Zingiberaceae*) em Florianópolis, Santa Catarina. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais* 2008; 10(2): 103-110.

LABAT, R. M. Efeito do laser de baixa potência (810 nM) na tendinite induzida por colagenase em tendão calcâneo de ratos. Doutorado em Ciências – Universidade de São Paulo; 2015.

LEAL, C.T; BEZERRA, A.L; LEMOS, A. A efetividade do laser de HeNe 632,8nm no reestabelecimento da integridade dos tecidos cutâneos em animais experimentais: revisão sistemática. *Revista Fisioterapia Pesquisa* 2012; 19(3): 290-296.

LEE, M.Y; LEE, N.H; SEO, C.S; LEE, J.A; JUNG, D; KIM, J.H; SHIN, H.K. *Alpinia katsumadai* seed extract attenuate oxidative stress and asthmatic activity in a mouse model of allergic asthma. *Food Chem Toxicol* 2010; 48(6):1746-52.

LEMAN, S.; BERNET, F.; SEQUEIRA, H. Autonomic dysreflexia increases plasma adrenaline level in the chronic spinal cord-injured rat. *Neuroscience letters* 2000; 286(3): 159-162.

LIAO, J. C.; DENG, J.S.; CHUU, C.S.; HOU, W.C.; HUANG, S.S.; SHIE, P.H.; HUANG, G.J. Anti-inflammatory activities of cinnamomum cassia constituents in vitro and in vivo. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2012; (4): 1-12.

LIMA, O. S.; RIBEIRO, G. M. A.; CARDOSO, C. J. Effect of bovine type-I collagen- based films containing red propolis on dermal wound healing in rodent model. *Int. J. Morphol* 2009; 27(4): 1105-1110p.

LITTLE, P.J; BALLINGER, M.L; BURCH, M.L; OSMAN, N. Biosynthesis of natural and hyperelongated chondroitin sulfate glycosaminoglycans: new insights into an elusive process. *Open Biochem J* 2008; 2: 135-42

- LONGO, U.G; RONGA, M; MAFFULLI, N. Achilles tendinopathy. *Spo Med. Art* 2009; 17 (2): 112-126.
- LORDA-DIEZ, C. I; GARCÍA-PORRERO, J. A; HURLÉ, J. M; MONTERO, J. A. Decorin gene expression in the differentiation of the skeletal connective tissues of the developing limb. *Gene Expr Patterns* 2014; 15(1): 52-60.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. *Plantas Medicinais do Brasil: nativas e exóticas*. [s.e.]. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA; 2002. p. 505-07.
- LUNDING, A-C; ASPENBERG, P; ELIASSON, P. Trigger finger, tendinosis, and intratendinous gene expression. *Scand J Med Sci Sports* 2014; 24(2): 363-8.
- MA, Y.; CHEN, K.; LI, P.; ZHAO, H.; YAN, X. Effects of Tumor Necrosis Factor Inhibitor on Stress-Shielded Tendons. *Orthopedics* 2017; 40(1):49-55.
- MAFFULLI, N. ALMEKINDERS, L.C. The Achilles tendon. *First Edition, London, Springer; 2007*.
- MERLINE, R; SCHAEFER, R.M; SCHAEFER, L. The matricellular functions of small leucine-rich proteoglycans (SLRPs). *J Cell Commun Signal* 2009; 3(3-4): 323-35.
- MURAKAMI, S; MATSUURA, M; SATOU, T; HAYASHI, S; KOIKE K. Effects of the essential oil from leaves of *Alpinia zerumbet* on behavioral alterations in mice. *Nat Prod Commun* 2009; 4(1):129-32.
- MURI, E.M.F.; SPOSITO, M.M.M.; METSAVAHT, L. Antiinflamatórios não-esteróides e sua farmacologia local. *Revista Acta Fisiátrica* 2009; 16(4):186-190.
- NICODEMO, M. C; NEVES, L. R; AGUIAR, J. C; BRITO, F. S; FERREIRA, I; SANT'ANNA, L.B; RANIERO, L. J; MARTINS, R. Á. L; BARJA, P. R; ARISAWA, E. A. S. Amniotic membrane as an option for treatment of acute Achilles tendon injury in rats. *Acta Cir Bras* 2017; 32(2): 125-139p.
- OZAN, F; DOGAR, F; GURBUZ, K; EKINCI, Y; KOYUNCU, S; SEKBAN, H. Chronic Achilles Tendon Rupture Reconstruction Using the Lindholm Method and the Vulpius Method. *J Clin Med Res* 2017; 9(7): 573-578p.
- PINHEIRO, M.C; MORA, O.A; CALDINI, E.G; BATTLEHNER, C.N; JOAZEIRO, P.P; TOLEDO, O.M.S. Ultrastructural, immunohistochemical and biochemical analysis of glycosaminoglycans and proteoglycans in the mouse pubic symphysis during pregnancy. *Cell Biol Int* 2005; 29(6): 458-71.
- PIVA, J.A.A.C; ABREU, E.M.C; SILVA, V.S; NICOLAU, R.A. Ação da terapia com laser reprodutiva de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L.Burtt&R.M.Sm. (Zingiberaceae) em Florianópolis, Santa Catarina. *Revista Brasileira Plantas Medicinais* 2008; 10(2): 103
- REZENDE, H.A.; COCCO, M.I.M. A utilização de fitoterapia no cotidiano de uma população rural. *Revista Escola Enfermagem USP* 2002; 36(3): 282-8.
- RUTKAUSKIS, A.M.O.R.A.; CRUZ-SILVA, C.T.A. Utilização de plantas medicinais pelos acadêmicos da área da saúde da Faculdade Assis Gurgacz no Município de Cascavel. *Revista Cultivando o Saber Cascavel* 2009; 2(4): 69-85.

- SANTOS, B. A.; ROMAN-CAMPOS, D.; CARVALHO, M.S.; MIRANDA, F.M.; CARNEIRO, D.C.; CAVALCANTE, P.H.; CÂNDIDO, E.A.; FILHO, L.X.; CRUZ, J.S.; GONDIM, A.N. Cardiodepressive effect elicited by the essential oil of *Alpinia speciosa* is related to L-type Ca<sup>2+</sup> current blockade. *Phytomedicine* 2011; 18(7): 539- 543.
- SANTOS-JUNIOR, L.; OLIVEIRA, T.V.C.; CÂNDIDO, J.F.; SANTANA, D.S.; FILHO, R.N.P.; PEREYRA, B.B.S.; GOMES, M.Z.; LIMA, S.O.; ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R.L.C.; CÂNDIDO, E.A.F. Effects of the essential oil of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.M. Sm. on healing and tissue repair after partial Achilles tenotomy in rats. *Acta Cirúrgica Brasileira* 2017; 32(6): 449-458.
- SAPRA, B.; JAIN, S.; TIWARY, A.K. Percutaneous Permeation Enhancement by Terpenes: Mechanistic View. *American Association of Pharmaceutical Scientists Journal* 2008; 10(1): 120-132.
- SAUNDERS, C. J.; MERWE, L. V. D.; COOK, J.; HANDLEY, C. J.; COLLINS, M.; SEPTEMBER, A. V. Extracellular Matrix Proteins Interact With Cell-Signaling Pathways in Modifying Risk of Achilles Tendinopathy. *J Orthop Res* 2015; 33(6):898-903.
- SCHWARTZ, A. J.; SARVER, D. C.; SUGG, K. B.; DZIERZAWSKI, J. T.; GUMUCIO, J. SPANG, C; RENSTRÖM, L; ALFREDSON, H; FORSGREN, S. Marked expression of TNF receptors in human peritendinous tissues including in nerve fascicles with axonal damage - Studies on tendinopathy and tennis elbow. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2017; 17(3):226-236.
- SCREEN, H.R; BERK, D.E; KADLER, K.E; RAMIREZ, F; YOUNG, M.F. Tendon functional extracellular matrix. *J Orthop Res* 2015, 6 (33): 793-9.
- SHANMUGAM, T; SURESHKUMAR, S; VENUGOPALAN, R. Evaluation of analgesic and anti-inflammatory activity of *Alpinia speciosa* K. Schum rhizomes. *Journal of Pharmacy Research* 2011; 4(3):728-729.
- SHAPIRO, E.; GRANDE, D.; DRAKOS, M. Biologics in Achilles tendon healing and repair: a review. *Curr Rev Musculoskelet Med* 2015; 8:9–17.
- SILVA, R.T.; MARTINS, R.A.B.L.; BJORDAL, J. M.; FRIGO, L.; RAHOUADJ, R.; ARNOLD, G.; et al. The low level laser therapy (LLLT) operating in 660 nm reduce gene expression of inflammatory mediators in the experimental model of collagenase-induced rat tendinitis. *Lasers Med Sci* 2015; 30:1985–1990.
- SPANG, C.; RENSTRÖM, L.; ALFREDSON, H.; FORSGREN, S. Marked expression of TNF receptors in human peritendinous tissues including in nerve fascicles with axonal damage - Studies on tendinopathy and tennis elbow. *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions* 2017; 17(3):226-236.
- TRAPP, S.C.; CROTEAU, R.B. Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications. *Genetics* 2001; 158(2):811-32.
- TU, P.T. B; TAWATA, S. Anti-Oxidant, Anti-Aging, and Anti-Melanogenic Properties of the Essential Oils from Two Varieties of *Alpinia zerumbet*. *Molecules* 2015; 20(9): 16723-40p.
- WAGNER, H; WISENAUER, M. *Fitoterapia: Fitofármacos, farmacologia e aplicações clínicas*. 2nd ed. São Paulo: Pharmabooks; 2006.
- WEINFELD, S.B. Achilles tendon disorders. *Med Clin North Am* 2014;98(2):331-8.
- WU, F.; NERLICH, M.; DOCHEVA, D. Tendon injuries. Basic science and new repair proposals. *EFORT Open Reviews* 2017; 2(7):332-342.

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

YUAN, T.; ZHANG, C.; WANG, J.H.C. Augmenting tendon and ligament repair with platelet-rich plasma (PRP). *Muscle, Ligaments and Tendons Journal* 2013; 3(3): 139-149.