



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS
E BIOLOGIA CELULAR

MARTHA DE SOUZA FRANÇA

**RUPTURA DO TENDÃO CALCÂNEO INDUZ ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS
E HISTOLÓGICAS NA MEDULA ESPINHAL DE CAMUNDONGOS**

BELÉM/PA
2019

MARTHA DE SOUZA FRANÇA

**RUPTURA DO TENDÃO CALCÂNEO INDUZ ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS
E HISTOLÓGICAS NA MEDULA ESPINHAL DE CAMUNDONGOS**

Tese de doutorado submetida ao
Programa de Pós-Graduação em Neurociências e
Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade Federal do Pará para obtenção do
grau de doutor em Neurociências e Biologia Celular
- área de concentração em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano
Oliveira da Silva, ICB – UFPA.

BELÉM/PA
2019

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

D278r de Souza França, Martha
RUPTURÁ DO TENDÃO CALCÂNEO INDUZ
ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E HISTOLÓGICAS NA
MEDULA ESPINHAL DE CAMUNDONGOS / Martha de Souza
França. — 2019.
76 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano Oliveira da
Silva

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em
Neurociências e Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Pará, Belém, 2019.

1. Tendinopatia. 2. Medula espinhal. 3. Tendão calcâneo. I.
Título.

CDD 574.0724

MARTHA DE SOUZA FRANÇA

RUPTURA DO TENDÃO CALCÂNEO INDUZ ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E
HISTOLÓGICAS NA MEDULA ESPINHAL DE CAMUNDONGOS

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do grau de Doutor em Neurociências e Biologia Celular – área de concentração em Neurociências

Banca examinadora:

Prof. Dr Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva – Orientador

Instituto de Ciências Biológicas – UFPA.

Prof. Dr. Carlomagno Pacheco Bahia – Membro da Banca

Instituto de Ciências da Saúde – UFPA.

Prof.Dr. Ítalo Sérgio Lopes Campos – Membro da Banca

Instituto de Ciências da Educação – UFPA.

Prof.Dr. Givago da Silva Souza – Membro da Banca

Núcleo de Medicina Tropical – UFPA.

Prof.Dr. Evander de Jesus Oliveira Batista – Suplente da Banca

Núcleo de Medicina Tropical – UFPA.

Aos meus pais Luiz Sérgio e Regina Souza
pelos investimentos em minha formação e
esposo Ricardo França pelo apoio.

AGRADECIMENTOS

Em minha formação no doutorado compreendo que este trabalho é apenas uma parte deste processo, desta forma, gostaria de estender meus agradecimentos para além do que foi necessário para a escrita desta tese.

Este pedacinho deste documento apesar de ser a parte mais branda deste manuscrito ainda assim não é tão simples redigi-lo por não ser o suficiente para expressar minha imensa gratidão pelas pessoas que dividiram seus caminhos e experiências comigo, mas, mesmo assim o farei na medida do possível.

Acima de tudo agradeço a Deus pela graça a mim concedida. Aos meus pais que sempre serão fundamentais em meus estudos por serem responsáveis pela base da minha formação. Ao meu companheiro de todas as horas Ricardo França que viveu intensamente este doutorado ao meu lado, me incentivando, tranquilizando e encorajando.

Aos meus colegas do Laboratório de Neurofarmacologia Experimental (LNE) em especial Mônica Lima e Caio Maximino pelas orientações iniciais da vida científica e pela amizade construída. A Suellen Moraes pelos ensinamentos, orientações e acima de tudo por me apresentar o mundo das Tendinopatias. Ainda das amizades antigas, agradeço a Tayana Carvalho, Tatiana Nascimento e Alódia Brasil pelo companheirismo, amizade e pelos cafés e churrascos compartilhados.

Aos professores do LNE, Evander Batista, Adelaide Passos e Karen Oliveira pelos ensinamentos, parcerias e contribuições em minha formação.

Ao meu grupo de pesquisa, carinhosamente chamados de “tendinosos”: Analú Maciel, Diego Rodrigues e Thalita Moura, pessoas que fizeram meus dias mais alegres. Sem eles muito deste trabalho não seria viável, não é à toa que sempre afirmo que *“somos como as palavras, só fazemos sentido quando juntos”*.

Ao meu Orientador Anderson Herculano, primeiramente por receber esta pessoa desconhecida, e, que chegou sem nenhuma experiência no universo da ciência. Pessoa que tenho profunda admiração, por se demonstrar uma pessoa generosa e um cientista nato, que sempre luta pelo acesso à ciência na Amazônia, que discute ciência com tamanha paixão com quem quer que seja, desde um Iniciação Científica até um pós-doutor.

Não poderia deixar de agradecer ao nosso querido e requisitado Amarildo Gomes que muito me alegrou com seu bom humor e provisão.

Ao programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular e secretaria, na pessoa da Socorro Andrade.

Agradeço aos professores Carlomagno Bahia, Givago Souza, Ítalo Campos e Evander Batista por aceitarem gentilmente o convite para compor a banca desta defesa e por suas contribuições neste trabalho.

À Capes pelo apoio a pesquisa

À Universidade Federal do Pará pelas oportunidades de formação que perpassaram pela graduação, técnico, docência, mestrado e doutorado.

*“Conhecer é a condição para eu me libertar
de mim mesmo e das amarras sociais”*
Leandro Karnal

RESUMO

A fisiopatologia dos tendões envolve liberação de mediadores neurais que desempenham papel ativo na regulação da dor, inflamação e homeostase do tendão. Novos direcionamentos têm apontado que a lesão não se restringe às alterações estruturais do tecido, mas envolve uma possível participação do Sistema Nervoso Central (SNC) na sua regulação. Nesse contexto, ainda é desconhecido se a lesão tendínea afeta o SNC e, desse modo, o presente estudo tem por objetivo investigar as possíveis alterações histológicas e bioquímicas na medula espinhal (L5) provocada pela ruptura total do tendão calcâneo em modelo experimental de murinos. Para isso, os animais foram submetidos à tenotomia do tendão calcâneo, divididos em três grupos experimentais (n=57): 1) Controle; 2) Ruptura e 3) Ruptura+Sutura. Foi avaliado o número de células totais da substância cinzenta da medula espinhal no segmento vertebral L5 por marcação com DAPI. A reatividade glial foi avaliada por imuno-histoquímica para microglia (IBA-1) e astrócitos (GFAP) em 7, 14 e 21 dias após ruptura do tendão. A participação do sistema nitrérgico foi investigada pela quantificação dos níveis teciduais de nitrito na intumescência lombar em 7, 14 e 21 dias pós-lesão e, pela imunomarcação de iNOS (NOS2) em L5. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste ANOVA-1via e pós teste tukey, considerando significativo $p < 0,05$. Os resultados foram expressos em média \pm DP. A análise da quantidade de células demonstrou que o grupo Ruptura apresentou número menor de células em 7 ($1408,33 \pm 58,59$; $p < 0,05$), 14 ($1402,7 \pm 72,7$; $p < 0,05$) e 21 ($1374,5 \pm 74,2$; $p < 0,01$) dias pós-lesão em relação ao grupo controle ($1668 \pm 52,3$) e em relação ao grupo Ruptura+Sutura nos dias 7 ($1655 \pm 66,5$; $p < 0,05$), 14 ($1639 \pm 48,5$; $p < 0,05$) e 21 ($1668,3 \pm 14,1$; $p < 0,01$). O grupo com sutura não diferiu do grupo controle. Os resultados da reatividade glial mostraram que em 14 dias pós lesão as microglias se encontravam ativadas em L5 e que os astrócitos estavam ativados em 7, 14 e 21 dias pós lesão. A quantificação de nitrito mostrou maiores níveis de nitrito do grupo Ruptura em 7 ($0,0004 \pm 10,8 \times 10^{-5}$, $p < 0,01$) e 14 dias ($0,0006 \pm 1,06 \times 10^{-5}$, $p < 0,01$) pós lesão em relação ao grupo controle ($0,0002 \pm 3,45 \times 10^{-5}$). A imunomarcação para iNOS foi identificada em 14 dias pós lesão no grupo Ruptura. Nossos resultados demonstraram que a ruptura do tendão calcâneo induz alterações na medula espinhal quanto ao número de células totais, ativação de células gliais e participação do sistema nitrérgico em modelo experimental de murinos. Desta forma, aponta para possíveis eventos degenerativos, oxidativos, inflamatórios e de plasticidade neural na medula espinhal decorrente da lesão do tendão calcâneo destacando a participação do SNC no processo de reparo desta lesão.

Palavra-chave: Tendinopatia, Medula espinhal, Tendão calcâneo.

ABSTRACT

The pathophysiology of the tendons involves release of neuronal mediators that play an active role in regulating tendon pain, inflammation and homeostasis. New directions have pointed out that injury is not restricted to tissue structural changes but indicates a possible involvement of the CNS in the regulation of the lesion. In this way, it is still unknown if the tendon injury affects the CNS, so the present study aims to investigate possible histological and biochemical changes in the spinal cord (L5) caused by the total rupture of the Achilles tendon in murine model. For this, the animals were submitted to tenotomy of the Achilles tendon, and separated in three groups (n = 36): Control; Rupture and Rupture+Suture. The total number cells of the spinal cord gray matter in the L5 vertebral segment was assessed by DAPI labeling. Glial reactivity was assessed by immunohistochemistry for microglia (IBA-1) and astrocytes (GFAP) at 7, 14 and 21 days after tendon rupture. The participation of the nitrenergic system was investigated by the quantification of tissue levels of nitrite in lumbar intumescence at 7, 14 and 21 days post-injury and by iNOS (NOS2) immunostaining in L5. Statistical analyzes were performed using the ANOVA-1way test and post-test tukey, considering a significant $p < 0.05$. The results were expressed as mean \pm SD. The analysis of the number of cells showed that the Rupture group had a lower number of cells in 7 (1408.33 ± 58.59 , $p < 0.05$), 14 (1402.7 ± 72.7 , $p < 0.05$) and 21 (1374.5 ± 74.2 , $p < 0.01$) days post-injury in relation to the Control group (1668 ± 52.3) and in relation to the Rupture + Suture group on days 7 (1655 ± 66.5 , $p < 0.05$) and 21 (1668.3 ± 14.1 , $p < 0.01$). The Suture group did not differ from the Control group. The results of glial reactivity showed that at 14 days after injury the microglia were activated at L5 and that astrocytes were activated at 7, 14 and 21 days after injury. The nitrite quantification showed higher levels of nitrite in the group Rupture in 7 ($0.0004 \pm 10.8 \times 10^{-5}$, $p < 0.01$) and 14 days ($0.0006 \pm 1.06 \times 10^{-5}$, $p < 0.01$) post-injury in relation to the control group ($0.0002 \pm 3.45 \times 10^{-5}$). Immunostaining for iNOS was identified at 14 days after injury in the Rupture group. Our results showed that the rupture of the Achilles tendon induces changes in the spinal cord in terms of total cell number, activation of glial cells and participation of the nitrenergic system in a murine experimental model. In this way, it points to possible degenerative, oxidative, inflammatory and neural plasticity events in the spinal cord resulting from the Achilles tendon injury, highlighting the CNS participation in the repair process of this lesion.

Key-word: Tendinopathy. Spinal Cord. Achilles Tendon.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Padrão de inervação do tendão.....	16
Figura 2	Estrutura e organização do tendão.....	17
Figura 3	Representação das fases de reparo da lesão tendínea.....	20
Figura 4	Estrutura e organização da medula espinhal.....	26
Figura 5	Fotomicrografia da medula espinhal.....	27
Figura 6	Medula espinhal (L5)	38
Figura 7	Marcação nuclear da medula espinhal.....	39
Figura 8	Número de células na substância cinzenta da medula espinhal de camundongos.....	41
Figura 9	Imunomarcção para microglias no segmento L5 da medula espinhal	43
Figura 10	Imunomarcção para astrócitos no segmento L5 da medula espinhal	45
Figura 11	Níveis teciduais de nitrito	47
Figura 12	Imunomarcção para iNOS no segmento L5 da medula espinhal	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPA: a-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolopropionic acid

ATP: Trifosfato de adenosina

BDNF: fator neurotrófico derivado do cérebro

CAT: Catalase

CCL2: Ligante de quimiocina (motivo C-C) 2

CCL7: Ligante de quimiocina (motivo C-C) 7

CGRP: peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

COX-2: Ciclo-oxigenase-2

CTGF: fator de crescimento de tecido conectivo

CTR: Controle

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

RNA_m: ácido ribonucleico mensageiro

DORT: Distúrbios osteomusculares relacionados ao trabalho

eNOS: óxido nítrico sintase endotelial

GFAP: proteína glial fibrilar ácida

HE: Hematoxilina Eosina

IBA1: Ionized calcium binding adaptor molecule 1

IGF-1: fator de crescimento semelhante à insulina 1

IL-1 β : Interleucina 1 beta

iNOS: óxido nítrico sintase induzida

KA1: receptor cainato

L5: nível medular 5^a lombar

LER: lesão por esforço repetitivo

L-NAME: Ng-Nitro-L-Arginina Metil Éster

MMPs: metaloproteases

NGF: fator de crescimento de nervo

NMDA: N-metil-D-aspartato

nNOS: óxido nítrico sintase neuronal

NO: óxido nítrico

NOS: óxido nítrico sintase

NOS2: óxido nítrico sintase induzida

NT-3: neurotrofina-3

OTG: órgão tendinoso de golgi

PBS: tampão fosfato-salino

PFA: paraformaldeído

PGs: proteoglicanos

SNC: sistema nervoso central

SOD: superóxido dismutase

SP: substância P

TGF- β -1: fator de crescimento- β -1

VAS: escala analógica visual

VEGF: fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	TENDINOPATIA E A PROBLEMÁTICA DA DOR.....	15
1.2.	ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS.....	20
1.3	TRATAMENTOS E A MECANOTRANSDUÇÃO.....	22
1.4	INVESTIGAÇÕES DE PARTICIPAÇÃO DO SNC.....	24
1.5	ENVOLVIMENTO DO ÓXIDO NÍTRICO NA TENDINOPATIA.....	29
2	OBJETIVO.....	31
2.1	OBJETIVO GERAL.....	31
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
3	MATERIAL E MÉTODO.....	32
3.1	ANIMAIS.....	32
3.2	TENOTOMIA CIRÚRGICA.....	32
3.3	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	33
3.4	DISSECÇÃO DA MEDULA ESPINHAL.....	33
3.5	ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	33
3.5.1	PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO.....	33
3.5.2	COLORAÇÃO COM HEMATOXILINA E EOSINA.....	34
3.5.3	CONTAGEM DE CÉLULAS.....	34
3.6	IMUNOMARCAÇÃO.....	35
3.6.1	IMUNOFLUORESCÊNCIA	35
3.6.2	IMUNOHISTOQUÍMICA	36

3.7	DOSAGEM DE NITRITO.....	36
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
4	RESULTADOS.....	38
4.1	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	38
4.2	ANÁLISE DO NÚMERO DE CÉLULAS NA SUBSTÂNCIA CINZENTA DA MEDULA ESPINHAL (L5) DE CAMUNDONGOS.....	40
4.3	EXPRESSÃO DE MICROGLIAS (IBA1) NA MEDULA ESPINHAL (L5) RELACIONADA A TENOTOMIA.....	44
4.4	EXPRESSÃO DE ASTRÓCITOS (GFAP) NA MEDULA ESPINHAL (L5) RELACIONADA A TENOTOMIA.....	45
4.5	ALTERAÇÕES NOS NÍVEIS DE NITRITO NA MEDULA ESPINHAL RELACIONADO À TENOTOMIA.....	47
4.6	EXPRESSÃO DE iNOS (anti-NOS2) NA MEDULA ESPINHAL (L5) RELACIONADA A TENOTOMIA.....	49
5	DISCUSSÃO.....	51
6	CONCLUSÃO	58
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
8	ANEXO (PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA)	75

1. INTRODUÇÃO

As lesões que acometem os tendões podem ser induzidas por um processo inflamatório que culmina em ruptura parcial (ou total) do tecido conjuntivo denso. Estas alterações podem se manifestar de forma aguda ou crônica e sua prevalência está atrelada em grande maioria a atletas e idosos (DE MOS et al., 2007; SCOTT et al., 2007). Dessa forma, o uso excessivo desta estrutura e a fragilidade dada em função da desregulação de fatores bioquímicos são apontados como possíveis causas de predisposição à lesão (FREDBERG, 2004; SHARMA; MAFFULI, 2006; SCOTT et al., 2007; RILEY, 2008; LONGO, 2014)

No âmbito esportivo, as lesões tendíneas estão atreladas não somente a atletas profissionais, mas também aos indivíduos que praticam atividades físicas recreacionais como o futebol e o tênis. Nestes casos, o tendão patelar, tibial posterior, cabeça longa do bíceps braquial, tendões do manguito rotador e tendão calcâneo são os mais acometidos (GIBBON, 1999; REES, 2006; REES, 2009; JHINGAN et al., 2011; SCOTT et al., 2013; GAJHEDE et al., 2013; DOCKING et al., 2017)

As atividades relacionadas ao trabalho excessivo de um tendão são causas frequentes de tendinites, relacionadas ao uso prolongado sem a pausa necessária para descanso somado a uma postura inadequada (BRASIL, 2012). Diversos estudos demonstram que profissionais de diversos ramos são expostos às condições favoráveis ao aparecimento de lesões nos tendões, a exemplo dos dentistas, trabalhadores industriais, costureiras, estivadores, bancários entre outros (ARAÚJO; PAULA, 2003; PICOLOTO; SILVEIRA, 2007; MACIEL et al., 2006; MUROFUSE; MARZIALE, 2011; ALMEIDA et al., 2012). Os casos decorrentes do ofício destes trabalhadores, frequentemente são causas de incapacidade laboral temporária ou permanente, implicando em inúmeros casos de pedido de aposentadoria (PICOLOTO; SILVEIRA, 2007; ALENCAR; OTA, 2011; BRASIL, 2012).

Segundo uma pesquisa realizada pelo IBGE, 3.568.095 trabalhadores em 2013 disseram ter tido diagnóstico de lesão por esforço repetitivo e distúrbios osteomusculares relacionadas ao trabalho (LER/DORT). No Brasil, o ministério da saúde nas últimas décadas têm criado estratégias para a efetivação da Atenção Integral à Saúde do Trabalhador, implementando uso de cartilha para

esclarecimento ao trabalhador, bem como protocolos tendo como público-alvo os profissionais da rede de saúde que atendem aos trabalhadores, com o objetivo de identificar e notificar os casos de LER e Dort para oferecer subsídios aos órgãos de vigilância para intervenções nos ambientes de trabalho (BRASIL, 2001; 2012; IBGE, 2013).

A literatura atual sobre a fisiopatologia desta doença contempla muitos esclarecimentos para a elaboração de tratamentos, porém ainda não se mostra totalmente efetiva a fim de proporcionar um rápido e duradouro processo de reparo do tendão uma vez que o quadro re-ruptura são apontados em muitos casos, bem como o surgimento de tendinopatia em outros tecidos decorrente da sobrecarga por compensação (MOLLER et al., 2001, OHBERG et al., 2001; DOCKING et al., 2015)

Os estudos têm-se voltado à discussão do papel de vários fatores responsáveis pela causa ou então participação no processo cicatricial como os mediadores químicos, mudanças estruturais e funcionais no tecido, porém pouco se sabe a respeito do alcance dessas lesões para além do tecido primariamente afetado. Dentro desse contexto, alguns estudos já começam a apontar para uma possível alteração no sistema nervoso central (SNC) durante o processo de reparo, demonstrando que estas lesões podem se mostrar muito mais complexas do que se acredita (ANDERSSON et al., 2011; O'BRIEN; SMITH, 2013; ALFREDSON et al., 2014; HEALES et al., 2014).

1.1 TENDINOPATIA E A PROBLEMÁTICA DA DOR

A dor é o primeiro indicativo da presença da tendinopatia. Relatos e estudos demonstram que ela comumente está presente em todas as fases do processo de reparo, perdurando por longos períodos e que não acompanham de igual modo as melhoras teciduais e funcionais, além do que representa um fator limitante nas atividades habituais do indivíduo e ainda é considerada de difícil tratamento (ALFREDSON et al., 2003). Fisiologicamente, a condição primária para que a transmissão de informação nociceptiva ocorra é a presença de estruturas nervosas combinado a mediadores químicos. (SHARMA e MAFFULLI, 2006)

Os tendões em condições normais possui poucos nervos em sua estrutura, no paratendão (estrutura adjacente ao tendão propriamente dito e consiste em tecido conjuntivo frouxo; Figura 1), fibras nervosas formam plexos ricos e enviam ramos pequenos que penetram o epitendão (bainha fina de tecido conjuntivo que recobre todo o tendão; Figura 2), porém em condições patológicas ocorre intenso crescimento de fibras nervosas (autônômicas e sensoriais) entre as fibras de colágeno que sugerem um importante papel na regulação da dor, inflamação e reparo do tecido, justificando a dor crônica no quadro clínico de tendinopatia (BJUR et al., 2005; LIAN et al., 2006; RILEY, 2008; XU; MURRELL, 2008; ACKERMANN, 2013).

Lian et al. (2006) ainda correlacionaram a dor à ocorrência reduzida de marcadores de noradrenalina, conhecido por atuar anti-nociceptivamente, sugerindo que tais alterações observadas nos pacientes estudados reiteram o envolvimento da inervação periférica na regulação da dor e, também segundo a literatura, o crescimento de novos ramos nervosos implica no aumento de expressão temporal de neuropeptídeos sensoriais como: substância P (SP), peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e glutamato (ALFREDSON et al., 2001; ALFREDSON; LORENTZON, 2002; BRING, 2007).

A substância P, que atua como neuromodulador facilitando processos inflamatórios na tendinopatia, estudos demonstram que existem ramos positivos para SP no tecido próximo ao local de ruptura do tendão já uma semana após a lesão, atingindo uma densidade máxima de presença na área de lesão na quarta semana após a ruptura, com aumento de sensibilidade à dor aos estímulos térmicos e mecânicos no período de 1 a 4 semanas após a ruptura espontânea do tendão calcâneo (ACKERMANN et al., 2002 ;2003; SCHUBERT et al., 2005; BACKMAN et al., 2011; BRING et al., 2012).

O aumento dos níveis de glutamato em situações de tendinopatia já é descrito na literatura, e é atribuído a uma resposta a agentes inflamatórios (ACKERMANN et al., 2014). A principal hipótese de estudos realizados sugere que o excesso de glutamato no tecido conjuntivo do tendão lesionado seja responsável por alterações como proliferação celular, apoptose e síntese de colágeno (SCHIZAS et al., 2012). No que tange a nocicepção excessiva, acredita-se que o sistema glutamatérgico tem um papel chave, entretanto, o exato papel ainda é incerto quanto às respectivas vias metabólicas

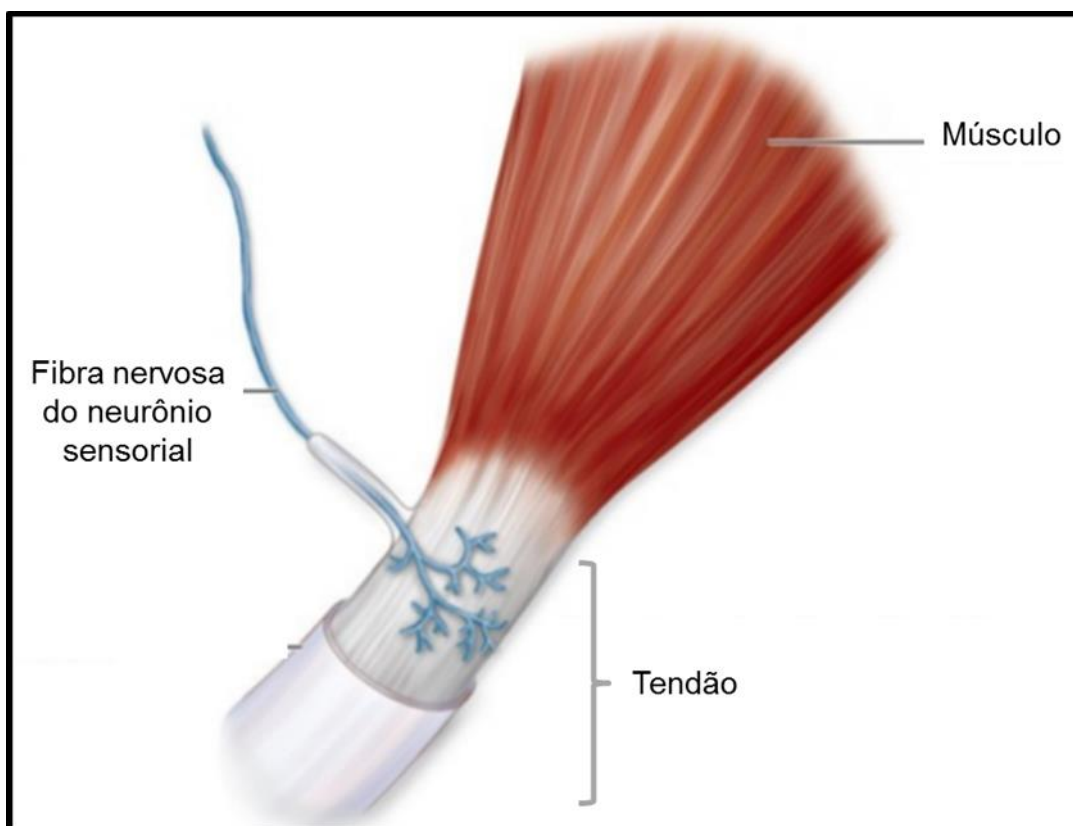


Figura 1. Padrão de inervação do tendão. Ilustração de uma unidade músculo-tendínea demonstrando os plexos formados por ramos nervosos no tendão. Fonte: www.slideshare.net/E_neutron/anatomy-16nervoussystem acesso em 21 de março de 2017.

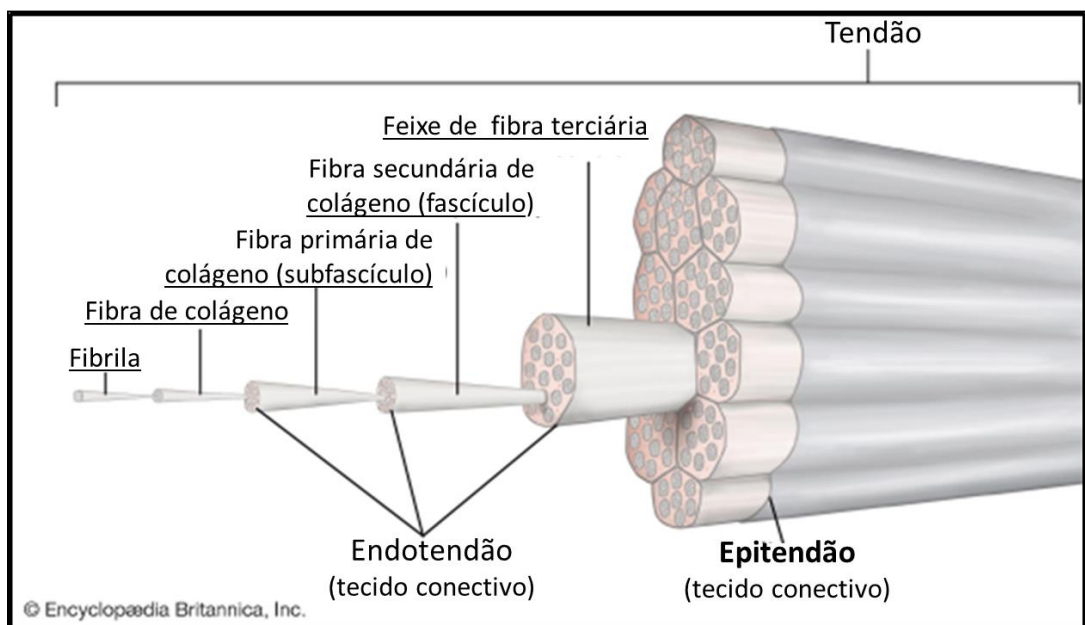


Figura 2. Estrutura e organização do tendão. Diagrama ilustrando a relação entre as fibras de colágeno, fascículos, unidades de tendão e os tecidos conjuntivo que os circundam respectivamente. Fonte: modificado de www.global.britannica.com/science/tendon acesso em 21 de março de 2017.

(ALFREDSON; LORENTZON, 2002; MOLLOY et al., 2006; GIBSON et al., 2009; DEAN et al., 2015; FRANKLIN et al., 2014).

Aliado ao aumento conjunto da expressão de receptores de glutamato, do neurotransmissor glutamato e nervos, é identificado o aumento no número de vasos sanguíneos no tendão, diferindo das características de um tendão sadio que, em condições normais trabalha em condições de hipóxia por apresentar uma pequena quantidade de vasos situados em estruturas circunvizinhas (epitendão) e na superfície do tendão (paratendão) (O'BRIEN, 1997; SHARMA; MAFFULLI, 2006; SCOTT et al., 2007; SCHIZAS et al., 2010; PIEPER et al., 2011).

As observações gerais de associações entre vasos sanguíneos e estruturas nervosas nos tendões afetados demonstra a infiltração desses vasos acompanhando as estruturas nervosas no tecido conjuntivo do tendão (XU; MURRELL, 2008). A neovascularização, identificado nos estudos pelo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), demonstra relação do crescimento de novos vasos com a dor crônica tendão (ALFREDSON et al., 2003; BJUR et al., 2005).

Ohberg e Alfredson (2002), ao produzir esclerose nos vasos do tendão calcâneo de 10 indivíduos, observaram melhora significativa na dor crônica utilizando uma escala analógica visual (VAS) para a dor, sugerindo dessa forma que os neovasos compõem uma peça chave na causa da dor crônica.

As neurotrofinas também podem ter um papel importante em relação à dor na tendinopatia, uma vez que o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) modula a dor agindo sobre as sinapses centrais nas vias da dor e o fator de crescimento de nervo (NGF) que contribui para a hipersensibilidade em condições inflamatórias (LEWIN; MENDELL, 1993; PEZET; McMAHON, 2006). Ambos são produzidos em tendões lesionados de humanos e ratos e somente NGF foi investigado em tendão de coelho, além do receptor de neurotrofinas p75 identificados no tendão calcâneo de humanos (BAGGE et al., 2009; 2011; BRING et al., 2010; BERGLUND et al., 2011; AHMED et al., 2017).

Como citado no texto acima, a sensação de dor na maioria dos estudos está relacionada ao aumento de fibras nervosas nociceptiva ocorrida em condições inflamatórias, no entanto, sob análise de infiltrados inflamatórios estudos apontam que a condição inflamatória do tendão não está relacionada à

sensação de dor (ALFREDSON; LORENTZON, 2002; ALFREDSON et al., 2003; SCHUBERT et al., 2005; DEAN et al., 2015).

1.2 ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS

A inflamação no quadro de lesão tendínea define o termo tendinite, diferindo da tendinose que é outro termo visto na literatura quando referida à degeneração tecidual. No entanto, dada a complexidade da patologia geralmente é denominada tendinopatia (GABEL, 1999; FREBERG 2004; RILEY, 2008).

O processo inflamatório na tendinopatia caracteriza a primeira fase do processo de reparo, denominada de fase inflamatória. Por conseguinte, tem-se a fase proliferativa seguida da fase de remodelagem. A sequência das três fases é dividida didaticamente, porém nos momentos de transição entre elas, os eventos característicos de cada fase ocorrem ao mesmo tempo (Figura 3) (BRING, 2007; RILEY, 2008; ABATE et al., 2009).

O processo fisiopatológico inicia com hematoma e ativação plaquetária; neutrófilos, eritrócitos e monócitos são atraídos para o local da lesão e ocorre fagocitose do material necrótico (ABATE et al., 2009). Fatores angiogênicos são secretados e dá início a formação de uma rede vascular essencial para o processo de reparo (SHARMA; MAFFULLI, 2006). As concentrações aumentadas de glicosaminoglicanos atuam na regulação das passagens das moléculas no espaço extracelular e permitem a formação de gradientes de moléculas quimiotáticas propiciando então a proliferação de células progenitoras que posteriormente vão ser diferenciadas em tenócitos (fibroblasto especializado do tendão) que, por sua vez, vão protagonizar a síntese de colágeno tipo III. (DOCHEVA et al., 2014)

Os parâmetros teciduais do tendão sadio são caracterizados pela pequena quantidade de células (tenócitos) com formato fusiforme, organizadas em matrizes lineares alinhadas e intercaladas entre fibras de colágeno que, por sua vez, representa 65% a 80% do peso seco do tecido dos quais 95% são de colágeno tipo I e o restante de colágeno tipo III, IV e V (O'BRIEN, 1997; RILEY, 2004).

O colágeno tipo I constituído de tripla hélice de polipeptídios garante ao

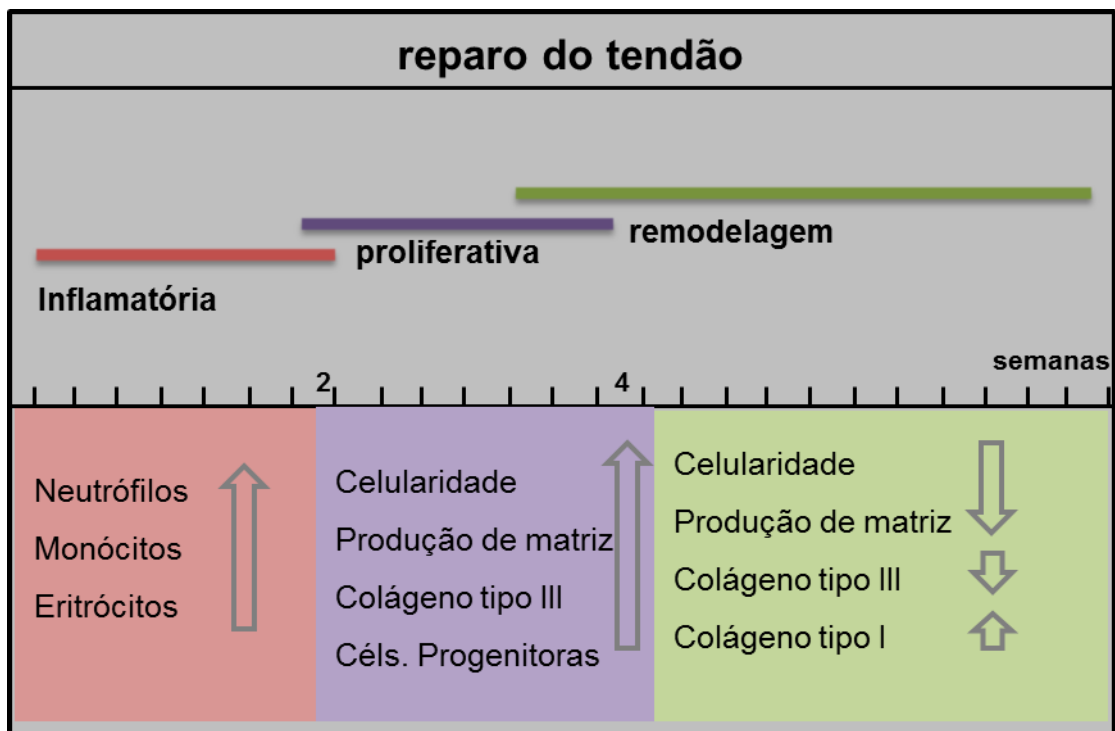


Figura 3. Representação das fases de reparo da lesão tendínea. Duração em semanas de cada fase e as alterações ocorridas em cada uma delas.

tendão resistência para suportar cargas mecânicas e, juntamente com uma proteína elástica denominada elastina que compõe cerca de 1 à 10% da massa seca do tendão, garante elasticidade ao tecido tendinoso, capacidade para absorver choques e a alta resistência a fadiga (AARON; GOSLINE, 1981; GOSLINE et al., 2002; KANNUS, 2000; SILVER et al., 2003; VIDAL, 2003; PROVENZANO; VANDERBY, 2006; SHARMA; MAFFULLI, 2006; KOROL et al., 2007; RILEY, 2008; SAMIRIC, 2009; THORPE, 2013).

Em condições patológicas, as células são modificadas para um formato arredondado, fato que, segundo Huisman et al. (2014), pode estar associada a uma resposta adaptativa. A desorganização das fibras de colágeno é característica da tendinopatia frente a desregulação entre síntese e degradação de matriz extracelular e, neste processo, as colagenases (enzimas da família da metaloproteases - MMPs) estão entre as poucas enzimas capazes de clivar as fibras de colágeno e representa parte desse processo de reestruturação do tecido (RILEY et al., 2002). O colágeno tipo III, nesta fase aumenta de forma expressiva e terá um papel fundamental na regulação da fibrilogênese do colágeno tipo I (KUO et al., 2008)

A partir de então, é iniciado um processo de reorganização do tecido e cicatrização com o decréscimo de celularidade e colágeno tipo III, células alongadas e feixes de colágeno tipo I organizado e abundante (JOZSA; KANNUS, 1997; SHARMA; MAFFULLI, 2006; BRING, 2007).

1.3 TRATAMENTOS E A MECANOTRANSDUÇÃO DAS LESÕES TENDÍNEAS

No tratamento de lesões tendíneas, comumente pode ser adotado dois tipos de tratamentos: o cirúrgico ou conservador (não-cirúrgico). Durante esses processos diversas intervenções são administradas incluindo crioterapia, eletroterapia, injeções peritendínea com os mais variados agentes e tratamento farmacológico com uso de antiinflamatórios. Neste cenário, o descanso é muito utilizado durante o tratamento, porém, muitos estudos demonstram a importância de uma reabilitação precoce (COOK et al., 2002; RILEY, 2008; REES et al., 2009)

Bring et al. (2008) demonstraram que a imobilização parece dificultar a cicatrização do tendão, em um processo que pode estar diretamente ligado a uma sensibilidade periférica pela estimulação de neuropeptídeos sensoriais. Neste contexto compreende-se que cargas fisiológicas são necessárias para manter a homeostase do tendão, sendo descrito ainda a importância da estimulação mecânica para o processo de cicatrização do tendão. Fato este justificado pela transmissão e conversão de um estímulo mecânico em resposta biológica, denominado mecanotransdução (WALL; BANES 2005; LAVAGNINO et al., 2008; CHIQUET et al., 2009; KILLIAN et al., 2012; GALLOWAY et al., 2013)

A estimulação mecânica contribui para a síntese de colágeno e atividade de reparo pelos tenócitos, aumentando a expressão de fatores de crescimento como fator de crescimento- β -1 (TGF- β -1), fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) e fator de crescimento de tecido conectivo (CTGF); e fatores angiogênicos como VEGF (SCHILD; TRUEB, 2002; CHIQUET et al., 2003; HEINEMEIER et al., 2007; SCOTT et al., 2007; HUISMAN et al., 2014; MOUSAVIZADEH et al., 2014).

Determinados padrões de carga são conhecidos por induzir a adaptação anabólica celular do tendão, porém uma super estimulação de forma repetitiva leva a uma resposta catabólica pelo aumento de citocinas inflamatórias e enzimas degenerativas levando à tendinopatia (ARCHAMBAULT et al., 2002; MAGNUSSON et al., 2010; HEINEMEIER; KJAER 2011; NEVIASER et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2012; GALLOWAY et al., 2013).

Nesse contexto, o uso excessivo do tendão é classificado como um fator extrínseco que pode levar à lesão (REES et al., 2009). Outros fatores como a biomecânica e alinhamento corporal incorreto também são denominadas causas extrínsecas de tendinopatia (REES et al., 2006). No entanto, a fisiopatologia do tendinopatia comumente é atribuída também à fatores intrínsecos envolvidos no processo de degeneração do tecido e são atribuídos a diversas hipóteses como a obesidade, presença de mediadores inflamatórios, estresse oxidativo, desregulação de metaloproteases, desordens hereditárias entre outras desordens sistêmicas (SHARMA; MAFFULLI, 2006; MAGRA; MAFFULLI, 2008; FRANCESCHI, 2014). E, apesar do enquadramento didático das causas em

duas categorias, a interação entre eles é comum no surgimento do quadro (REES, 2009).

O tendão é integrado ao músculo (junção miotendínea) de onde é produzida toda tensão transmitida aos tendões que por sua vez se integra também ao osso (entese) a fim de gerar movimento articular (KANNUS, 2000; VIDAL, 2003; SHARMA; MAFFULLI, 2006; FRANCHI et al., 2007; RILEY, 2008).

Esses locais de transição, e as diferenças de forma e maneira como os tendões são ligados ao osso, muitas vezes são potenciais para o surgimento de lesões. Os variados tendões são sujeitos a diferentes distribuições de tensões, e dentre todos, o tendão calcâneo (ou de Aquiles), que liga os músculos sóleo e gastrocnêmio ao osso calcâneo é descrito pela literatura como o tendão de alta incidência à lesão, apesar de ser considerado o mais resistente do corpo humano (KANNUS, 2000; REES et al., 2006; LAVAGNINO et al., 2015).

Responsável pela extensão do pé, o tendão calcâneo está diretamente responsável pela marcha do indivíduo, logo, é frequentemente solicitado e, talvez esta seja a justificativa em ser um dos mais acometidos. Diante da problemática, nos propomos neste trabalho investigá-lo (KANNUS, 2000; COOK, 2002).

A compreensão da relação da mecanobiologia tanto para a fisiopatologia quanto para a reabilitação precisam ser mais bem compreendidas, no entanto, de forma consensual a tensão no qual o tendão é submetido demonstra significativa importância (LAVAGNINO et al., 2015).

Neste contexto modelos *in vitro* e *in vivo* são largamente utilizados para busca da compreensão de tais fenômenos e, dentre a gama de modelos, os ratos tem representado uma modelo eficaz dada às compatibilidades histológicas, funcionais e bioquímicas com o tendão humano (ALFREDSON et al., 2003; DAHL, 2007; SCOTT, 2007; BRING, 2007; 2008; 2012).

1.4 INVESTIGAÇÕES DE AÇÃO DO SNC APÓS LESÃO TENDINEA

Os tendões não trabalham de forma isolada, pelo contrário, a tensão recebida por eles, através dos músculos é orquestrada pelo sistema nervoso central (SNC). As terminações nervosas vistas no tendão são especializadas em

detectar mudança de tensão e pressão (mecanorreceptores), estruturas estas denominadas de órgão tendinoso de golgi (OTG); e também detectam e transmitem informação nociceptiva (nociceptores) (ACKERMANN et al., 2001; COOK, 2002; SHARMA; MAFFULLI, 2006)

Estudos em tendinopatia indicam que a lesão não se restringe às alterações estruturais do tecido conjuntivo, mas envolve uma possível participação do SNC no processo de reparo da lesão (ACKERMANN, 2013; ACKERMANN et al., 2014; ALFREDSON et al., 2014). Os nervos espinhais são os caminhos de comunicação entre o SNC (medula espinhal) e regiões específicas do corpo. A medula espinhal consiste em uma estrutura do sistema nervoso central localizada no interior do canal central da coluna vertebral que se estende desde a parte inferior do encéfalo até a borda superior da segunda vértebra lombar em humanos adultos (TORTORA; DERRICKSON, 2012).

A medula espinhal é segmentada e dela emergem 31 pares de nervos espinhais dos forames intervertebrais, separados em intervalos regulares. Não há segmentação anatômica óbvia, mas, por conveniência, a designação dos nervos espinhais baseia-se no segmento da coluna vertebral em que estão localizados. São eles: 8 cervicais (C1-C8), 12 torácicos (T1-T12), 5 lombares (L1-L5), 5 sacrais (S1-S5), e 1 par de nervos coccígeos (TORTORA; DERRICKSON, 2012).

Ao longo de toda extensão, a medula espinhal apresenta um alargamento visível em duas regiões, um superior denominado intumescência cervical, responsável pela comunicação nervosa dos membros superiores; e um alargamento inferior denominada intumescência lombar de onde surgem nervos destinados a inervar os membros inferiores (MACHADO, 2004; TORTORA; DERRICKSON, 2012).

Neste contexto, a intumescência lombar que se estende desde a nona até a décima segunda vértebra torácica é a região de onde emerge o nervo tibial responsável pela transmissão de informações aos músculos (gastrocnêmio e sóleo) que se ligam ao tendão calcâneo. Estas informações são conduzidas da medula ao membro ipsilateral (FISCH, 2009; DRAKE et al., 2010).

A medula espinhal é organizada em substância cinzenta e branca (figura 4), onde a branca situa-se na parte externa e a cinzenta situa-se na parte interna

formando uma estrutura em forma de H apresentando dois cornos dorsais responsáveis pela retransmissão de informações sensoriais e dois cornos ventrais responsáveis pela retransmissão de informações motoras, todos unidos pela comissura cinzenta ao redor do canal central, desenvolvido a partir do lúmen do tubo neural embrionário e alinhado por células endoteliais (KANDEL et al., 2014; MACHADO, 2004).

As diferenças entre a substância cinzenta e branca da medula espinhal são causadas pela distribuição diferencial da bainha de mielina. Os principais componentes da substância branca são os axônios mielinizados e os oligodendrócitos produtores de mielina. A substância branca não contém corpos de células neuronais, mas estão presentes as micróglia (figura 5). A substância cinzenta contém astrócitos abundantes e grandes corpos de células neuronais, especialmente os neurônios motores nos cornos ventrais. (MESCHER, 2010)

Na tendinopatia unilateral, já foram apontados déficits bilateralmente nos sistemas sensoriais e motor, bem como aumento de celularidade e proliferação vascular. De igual modo, investigações de treinos físicos unilaterais mostram efeitos bilaterais (CARROLL et al., 2006; ANDERSSON 2011; DOBSON et al., 2014). Diante do exposto, alterações no tendão do membro contralateral à lesão podem ser mais complexas do que a influência de carga isolada, implicando em um mecanismo que envolve a sinalização do SNC, destacando a necessidade de mais estudos que investiguem essa via tanto para compreender a etiologia quanto para contribuir no tratamento da tendinopatia (SHENKER et al., 2003; O'BRIEN; SMITH, 2013)

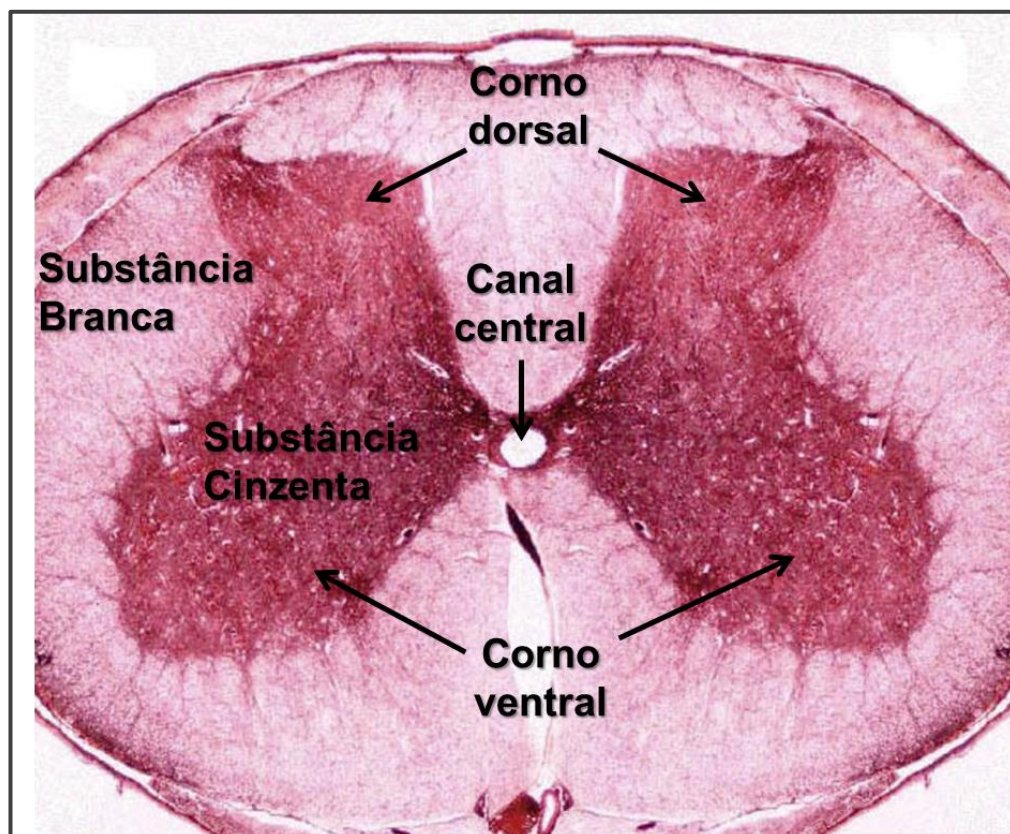


Figura 4. Estrutura e organização da medula espinhal. Secção transversal da medula espinhal corada com violeta de cresil, mostrando a substância branca na parte externa e a substância cinzenta em forma de H. No centro da medula é identificado o canal central, na região posterior os cornos dorsais e na região anterior os cornos ventrais. Fonte: modificado de www.doctorc.net/Labs/Lab9/lab9.htm acesso em 11 de abril de 2017.

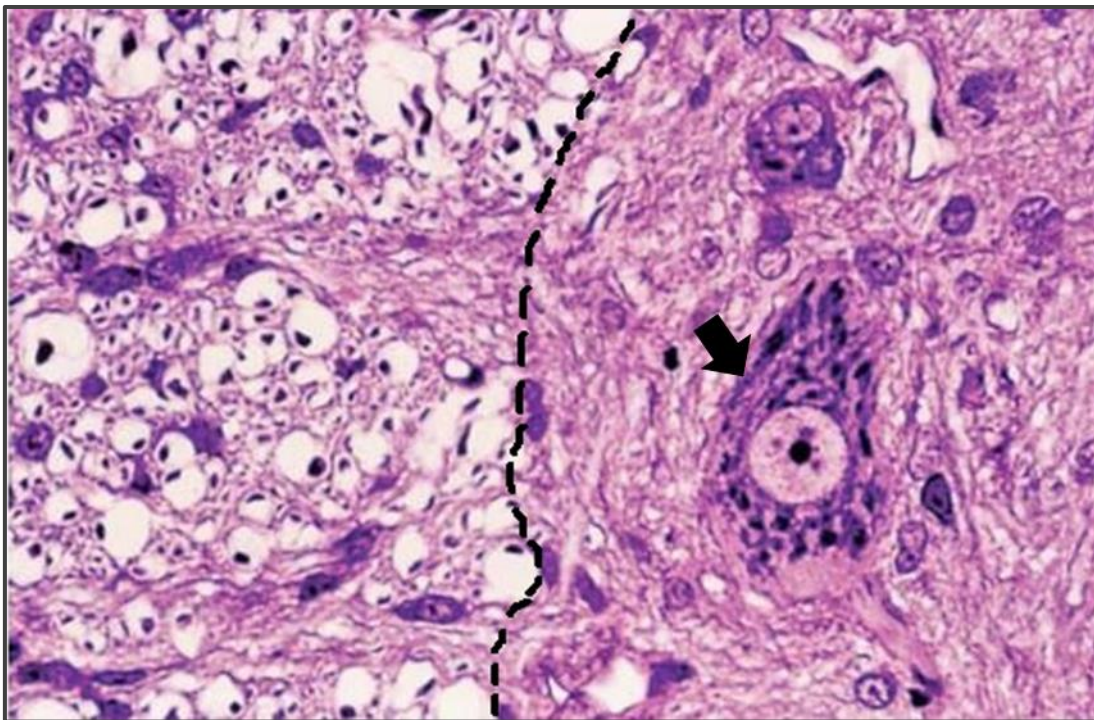


Figura 5. Fotomicrografia da medula espinhal. Secção transversal da medula corada com HE, obj 40x. Linha tracejada delimita a transição entre substância branca (à esquerda) e substância cinzenta (à direita). Seta indica um corpo de neurônio. Fonte: modificado de Mescher (2010).

Inúmeros estudos já têm se voltado a investigar a participação do sistema nervoso na fisiopatologia da tendinopatia, no entanto, com foco restrito a expressão de fatores químicos no tecido conjuntivo do tendão lesionado como exposto em tópicos acima. E, dentre a gama de investigações, o envolvimento do gás óxido nítrico (NO) tem sido alvo de estudos, uma vez que, seu papel na transmissão sináptica nociceptiva nos sistemas nervoso central (SNC) e periférico (SNP), de modo geral, já tem sido reportado (MELLER et al., 1992; LEVY; ZOCHODNE 2004; KRAYCHETE et al., 2008; FREIRE et al., 2009).

1.5 ENVOLVIMENTO DO ÓXIDO NÍTRICO (NO) NA TENDINOPATIA

De fato, diz-se que o NO está envolvido na manutenção da hiperalgesia, no qual, o aumento da síntese de NO conduz à liberação de neuropeptídeos excitatórios, citocinas e neurotransmissores e ativação do receptor de glutamato NMDA (GARTHWAITE, 1991; BREDT; SNYDER, 1992; DEYAMA et al., 2017)

Sua síntese ocorre a partir da L-arginina, pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), podendo ser expressa em 3 isoformas: eNOS (encontrada nas células endoteliais), nNOS (identificada no cérebro e tecidos neuronais) e NOS induzível (iNOS) (MONCADA et al., 1991; NATHAN; XIE, 1994). É descrito na literatura que as NO sintase são reguladas positivamente após uma lesão de nervo (NAIK et al., 2006).

O sistema nitrérgico desempenha um papel fundamental no processamento local nociceptivo na medula espinhal (MELLER; GEBHART, 1993; FREIRE et al., 2009). Hervera *et al.* (2010) demonstrou que a expressão de NOS neuronal e induzível são encontradas na medula espinhal de camundongo submetidos a constrição do nervo ciático.

No que se refere à relação do NOS na tendinopatia, dados descritos na literatura descrevem que sua atividade é baixa em um tendão sadio, porém é aumentada no caso de lesão, sendo expressa pelos fibroblastos, macrófagos e células endoteliais (PARK et al., 2000; LIN et al., 2001b; MURREL, 2007). Estudos realizados em ratos demonstraram que 4 dias após transecção do tendão calcâneo houve aumento nos níveis estacionários de RNAm e proteína para todas as 3 isoformas de NOS (LIN et al., 2001a; LIN et al., 2001b).

Estudos *in vitro* e *in vivo* descrevem que o NO tem efeito protetor ou benéfico na organização do colágeno, sugerindo que ele contribui para a cicatrização do tendão pela habilidade de promover a deposição de colágeno (XIA et al., 2006. MURREL, 1997; 2007; LIN et al., 2001b; TOMIOSSO, 2009; NICHOLS et al., 2012; SCOTT et al., 2012). Em contrapartida, um estudo realizado em nosso laboratório contrapõe está afirmativa ao observar melhora significativa nos parâmetros funcionais e no tempo da recuperação tecidual, acelerando o processo de reparo do tendão calcâneo ao utilizar um inibidor da NOS (L-NAME) (MORAES et al., 2013). A divergência entre os estudos, em partes pode ser justificada pelo papel dual do NO ou então pela diversidade das metodologias utilizadas quanto a via de administração das drogas, local *versus* sistêmica.

Diante disso, ainda permanecem dúvidas quanto ao papel do NO na tendinopatia, sobretudo não existem dados que demostrem uma possível expressão do óxido nítrico no SNC relacionado a lesões de tendão. Logo, neste trabalho propomos uma investigação da relação do sistema nitrérgico e SNC em condições experimentais de tendinopatia, bem como possíveis mudanças estruturais na medula espinhal em resposta a lesão do tendão.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os parâmetros bioquímicos e histológicos na medula espinhal causada pela ruptura total experimental do tendão de calcâneo em modelo murino.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o número de células na substância cinzenta da medula espinhal (L5) entre os grupos experimentais em 7, 14 e 21 dias pós-lesão, e o efeito da sutura no número de células.
- Analisar a imunomarcagem de GFAP em 7, 14 e 21 dias pós-lesão na medula espinhal (L5) dos animais submetidos à ruptura do tendão.
- Analisar a imunomarcagem de IBA-1 em 7, 14 e 21 dias pós-lesão na medula espinhal (L5) dos animais submetidos à ruptura do tendão.
- Investigar, por meio de dosagem de nitrito, a possível ativação nitrérgica na intumescência lombar em 7, 14 e 21 dias pós-lesão.
- Avaliar a expressão da NOS2 em 7, 14 dias pós-lesão na medula espinhal (L5) dos animais submetidos à ruptura do tendão.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados 57 camundongos jovens adultos da linhagem *Balb/C* (*Mus musculus*), com massa corporal na faixa de 25 ± 3 g provenientes do biotério central pertencente ao Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará (ICB-UFPA). Os animais permaneceram em gaiolas de polipropileno padrão, mantidas em ambiente controlado com ciclo claro/escuro de 12 horas, além de receberem água e ração *ad libitum*. Este projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa com animais de experimentação da UFPA (CEPAE-UFPA) sob o parecer 2066070716.

3.2 TENOTOMIA CIRÚRGICA

Os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina 10% (90mg/kg) e cloridrato de xilazina a 2% (5mg/kg) com aplicação intraperitoneal. A pele sobre a região dorsal da tíbia do membro posterior direito foi tricotomizada manualmente.

Posteriormente à assepsia local, realizou-se uma incisão longitudinal de cerca de 0,3 cm na pele acima da inserção calcânea para ter acesso ao tendão calcâneo. Após a dissecação foi realizada com a linha de sutura um ponto simples em dois pontos equidistantes em relação ao ponto distal e medial do tendão. Em seguida, o mesmo foi seccionado totalmente por cisalhamento transversal. Posteriormente, o tendão e a pele foram suturados com fio de poliamida monofilamento não absorvível número 4.0 e submetida novamente à assepsia local. Um dos grupos experimentais não passou pelo processo de sutura do tendão de calcâneo, dessa forma, não houve a união do tecido.

Após a lesão não houve nenhuma restrição ou imobilização do segmento, apenas higienização diária com solução fisiológica até a cicatrização da pele.

3.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Esta pesquisa propôs três grupos experimentais; o primeiro foi constituído de animais considerados sadios (controle; n=12). O segundo grupo foi submetido à ruptura do tendão calcâneo (ruptura; n=36). O terceiro foi sujeito à lesão experimental em seguida o tendão foi suturado (ruptura+sutura; n=9).

3.4 DISSECÇÃO DA MEDULA ESPINHAL

Após anestesia, foi realizado a eutanásia dos animais por perfusão transcardíaca com solução salina (0,9 %) seguido de formaldeído tamponado 10% para fixação dos tecidos, ambos com pH 7,4. A medula espinhal foi então dissecada completamente do canal central das vertebrae da coluna vertebral, onde foi identificada e isolada a intumescência lombar nível de L5, para posteriores análises.

3.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA

3.5.1 Processamento histológico

Após dissecção da medula espinhal as amostras de todos os grupos foram pós-fixadas em formaldeído 10%, por 24h em temperatura ambiente. Após esse procedimento os tecidos passaram por soluções crescentes de álcool e Xilol (50%, 60%, 70%, 80%, 90%, Absoluto 1, Absoluto 2, Xilol 1 e Xilol 2) e depois passam por processo de inclusão em parafina 1, 2 e 3, com temperatura de 56,5°C, então as amostras foram emblocadas e ajustadas para corte em micrótomo com orientação transversal à uma espessura de 10µm.

Os cortes foram transferidos para lâminas histológicas. As lâminas foram criteriosamente organizadas e numeradas, sendo mantidas em temperatura ambiente em caixas até o momento do uso.

3.5.2 Coloração com hematoxilina e eosina

Para avaliar a estrutura tecidual, utilizamos a técnica de coloração por hematoxilina e eosina. Para essa coloração, as lâminas com as secções histológicas de medula espinhal foram inicialmente imersas em água destilada mantendo-as por 5 minutos. Após esse período, as lâminas foram imersas em hematoxilina de Harris por 30 segundos e lavadas em água destilada corrente posteriormente.

Em seguida, as lâminas foram imersas em eosina por mais 30 segundos e então lavadas em água destilada corrente. Após esse último passo, as lâminas foram imersas em álcool 70% e por fim montadas em Permount®(Fisher Scientific, New Jersey, USA).

Um microscópio de luz transmitida (Nikon, Eclipse E800 Yokohama, Japan) com câmera digital (Nikon, DXM 1200, Japan) acoplada foi usado para análise histológica e captura de imagens, as quais foram analisadas.

3.5.3 Contagem de células

A análise do tecido consistiu no uso de secções obtidas pelo micrótomo, como mencionado acima, as quais foram lavadas em água destilada por 5 minutos, permeabilizadas em temperatura ambiente com Triton X-100 0,1% por 10 minutos e tratadas com DAPI (1:10.000) por 1 minuto e meio para marcação do núcleo celular. Em seguida, as secções foram lavadas 3 vezes com água destilada para posteriormente serem montadas com N-propilgalato.

Um microscópio de fluorescência (Nikon, Eclipse E800 Yokohama, Japan) foi usado para análise da ocorrência da marcação, com excitação de luz ultravioleta(358nm), detectado através de um filtro azul/ciano. A área total da medula espinhal foi capturada por fotomicrografia utilizando objetiva de 20x, obtidas através de um sistema de câmera digital. A análise duplo-cego foi realizada com auxílio do programa ImageJ®, onde foram consideradas somente as áreas correspondentes aos cornos dorsais e ventrais da medula espinhal.

3.6 IMUNOMARCAÇÃO

Para as análises por imunomarcação, foi realizado primeiramente a eutanásia dos animais do grupo controle e grupo ruptura por perfusão transcardíaca com solução salina (0,9 %) seguido de paraformaldeído 4% (PFA). Em seguida a medula espinhal foi dissecada e pós-fixada em PFA 4% por 12 horas e, em seguida, lavados em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4, por 3 vezes consecutivas de 5 minutos cada. As amostras foram armazenadas e mantidas em tampão fosfato a 4°C. Antes da execução dos cortes, o tecido passou por processo de crioproteção em soluções crescentes de sacarose (10%, 20% e 30%) em temperatura ambiente e depois mantidos na solução a 30% até o momento da criomicrotomia.

Após a crioproteção, o material foi embebido em Tissue Tek® (Sakura Finetek, Inc., Califórnia, USA) para ser cortado em 10 µm de espessura com orientação transversal em criostato (Leica, CM3050 S) ajustado para -24°C. Os cortes foram transferidos para lâminas histológicas previamente gelatinizadas. As lâminas com os cortes foram criteriosamente organizadas e numeradas, sendo mantidas congeladas a -20°C em caixas até o momento do uso.

3.6.1 Imunofluorescência

Para imunomarcação da NOS2, as amostras coletadas no 7º, 14º e 21º dia pós lesão foram incubadas em solução de bloqueio (1% BSA, 0,25% Triton em PBS, pH 7,4). Os anticorpos primário e secundário foram diluídos em solução de bloqueio, primário (NOS2/rabbit - Santa Cruz Biotechnology) de 1/200 e secundário (FitC/mouse anti- rabbit, - Santa Cruz Biotechnology) de 1:1000. Para a marcação dos núcleos das células foi utilizado o marcador DAPI (1:10.000). As lâminas foram montadas com N-propilgalato e posteriormente visualizadas em microscópio de fluorescência (Nikon, Eclipse E800 Yokohama, Japan) com os filtros adequados e com a objetiva de 20x para análise de possíveis marcações.

3.6.2 Imunohistoquímica

A imuno-histoquímica para GFAP e IBA-1 foi realizada nas amostras coletadas em 7, 14 e 21 dias após a ruptura total do tendão. As amostras foram incubadas em peróxido (3%) seguida de lavagem, posteriormente foram incubadas com anticorpo primário (GFAP/ Mouse – Sigma; IBA-1 AIF1 – Merkmilipore) ambos diluídos em solução bloqueio (3% BSA, 0,3% Triton em PBS e soro de mouse ou horse respectivamente) de 1:1000(GFAP) e 1:200(IBA-1). Após lavagem, foram incubadas com anticorpo secundário diluída em solução bloqueio (Goat anti-mouse-Sigma ou Mouse anti-horse - Sigma). Por fim, as amostras foram incubadas com ABC e revelado com DAB. As lâminas então foram montadas em Entelan e posteriormente visualizadas em microscópio de campo claro (Nikon, Eclipse E800 Yokohama, Japan).

3.7 DOSAGEM DE NITRITO

Para a dosagem de nitrito, a intumescência lombar do grupo controle e dos animais que sofreram a ruptura do tendão e não se submeteram a sutura do tecido, foi fragmentada manualmente juntamente com solução de PBS (10x o volume do tecido) para homogeneização. O homogeneizado foi centrifugado e o sobrenadante foi utilizado para o ensaio colorimétrico de dosagem de nitrito através do reagente de Griess (naftleno a 0.1%, diluído em água deionizada e sulfanilamida a 1%, diluída em ácido fosfórico a 5%), no qual, foi adicionado a amostra na mesma proporção (1:1) (GREEN et al., 1982).

Os valores foram mensurados por espectrofotometria utilizando um leitor de microplaca (Biotek ELX-800) com comprimento de onda de 540nm. A concentração de nitrito das amostras foi calculada com base nos valores de absorbância obtidos de uma curva padrão de nitrito com concentrações conhecidas (0-50 μ) e posteriormente corrigidas pela concentração de proteínas contida na amostra.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O programa estatístico usado na avaliação destes experimentos foi o BioEstat 5.0, onde os dados foram analisados utilizando o teste de análise de variância (ANOVA) de um critério, seguida pelo teste tukey para comparações múltiplas. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão.

4. RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÕES DA AMOSTRA

As primeiras análises foram realizadas com o objetivo de caracterizar as amostras coletadas. Tecidos do grupo controle foram corados com hematoxilina e eosina para possibilitar a visualização da integridade estrutural do tecido, de forma que, posteriormente fossem realizadas as análises por imunomarcção.

Na figura 6A, é possível visualizar a configuração do nível L5 da medula espinhal, de onde surgem os nervos que inervam o tendão calcâneo, com nítida delimitação da substância branca (2) e substância cinzenta (1); e dos cornos ventrais (V) e cornos dorsais (D). Em maior aumento (40x- figura 6B), vemos as características histológicas da substância branca (2) constituída por células gliais, e da substância cinzenta (1) contendo corpos de neurônios (indicado pela seta).

Para a investigação do número total de células da medula espinhal (L5), foi utilizado o marcador nuclear fluorescente (DAPI). A partir da delimitação do H da medula espinhal a região da substância cinzenta foi identificada para posterior análise, uma vez que os cornos ventrais são relacionados com o controle motor do movimento e os cornos dorsais estão relacionados com as vias somatossensoriais.

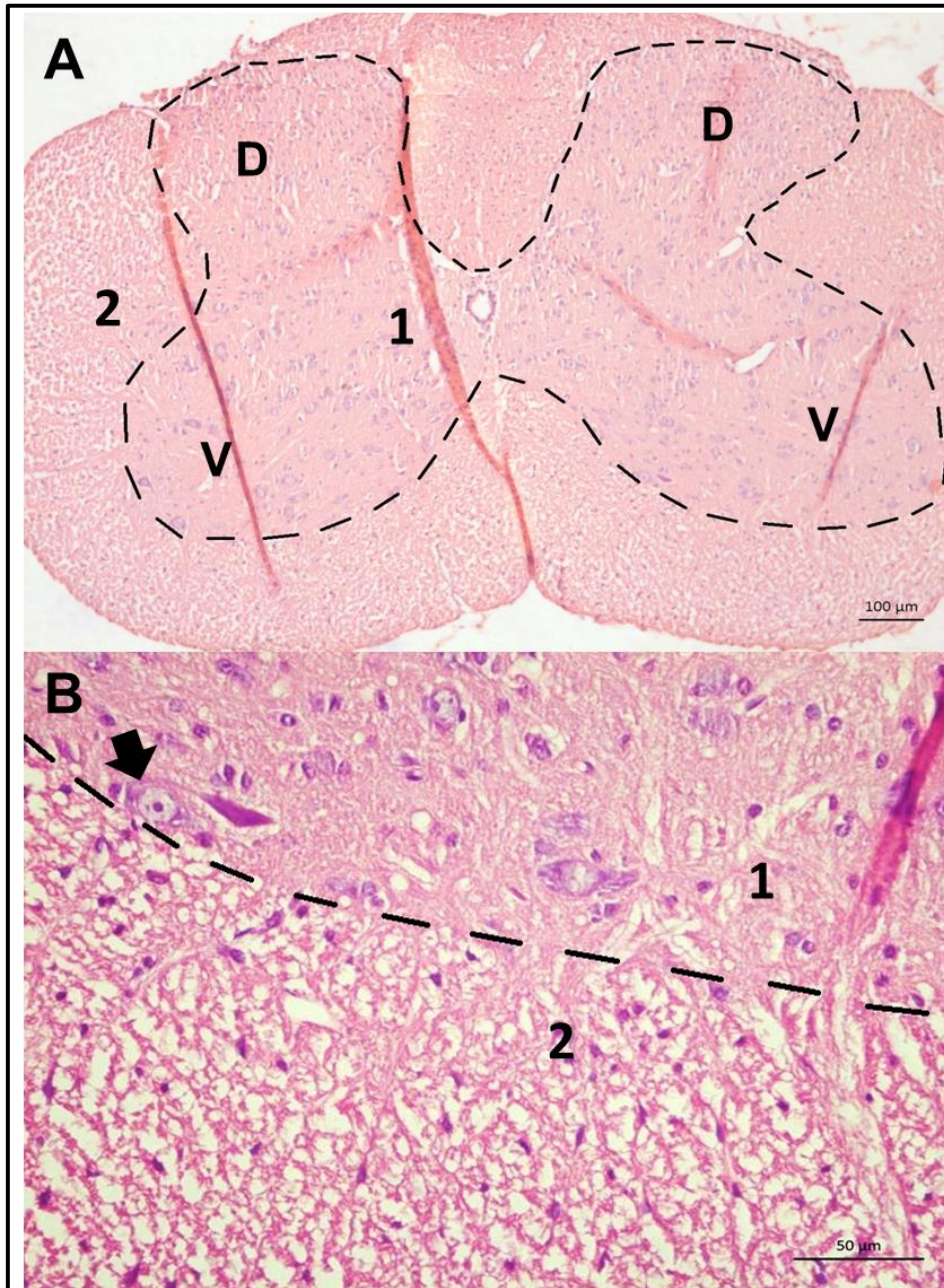


Figura 6. Medula espinhal (L5). Coloração com hematoxilina e eosina. Espessura de 10 μm e barra de escala de 50 μm (A) e 100μm(B). A e B: 1 – substância cinzenta, 2 – substância branca. D: cornos dorsais; V: cornos ventrais. Seta indica um corpo de neurônio.

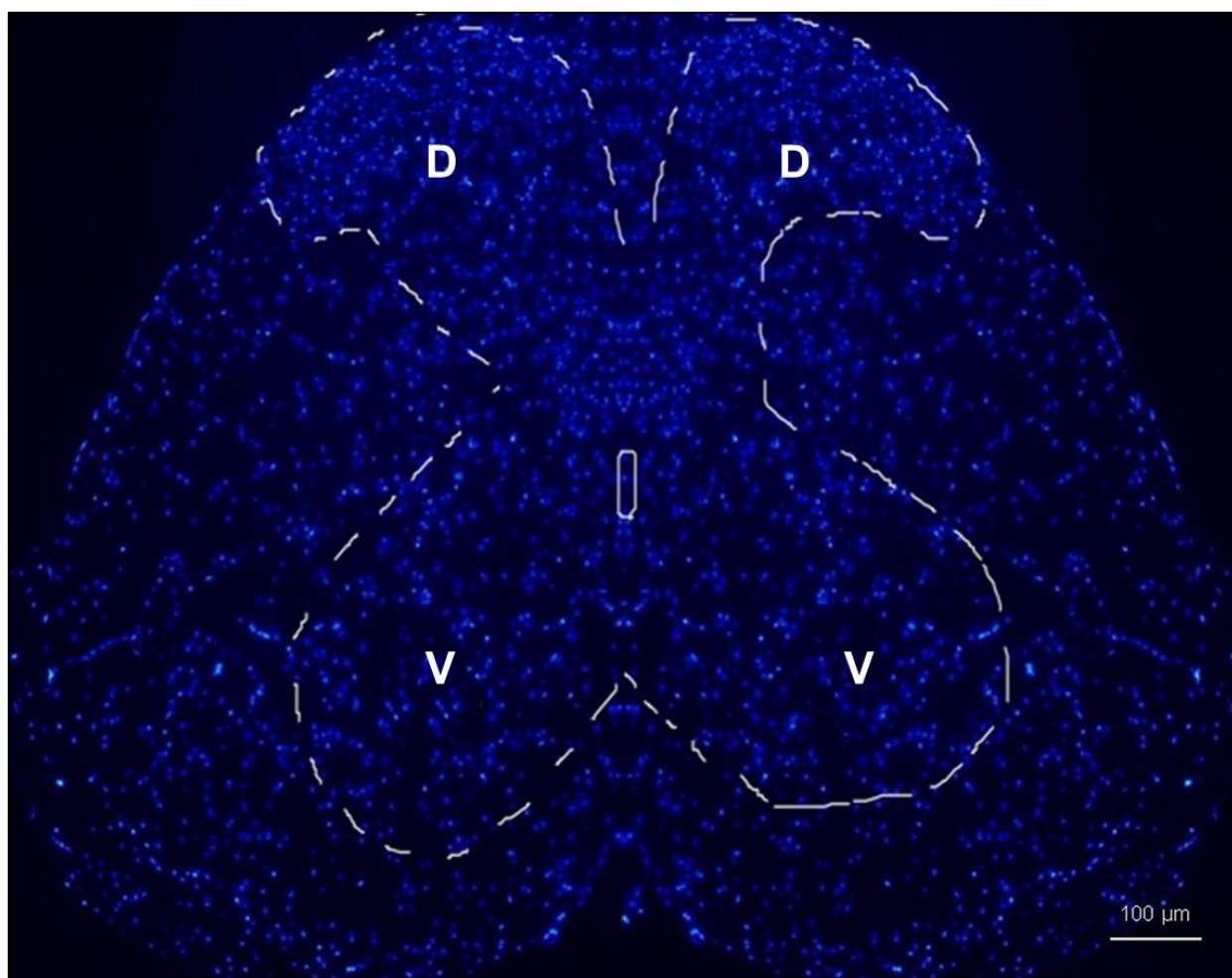


Figura 7. Marcação nuclear da medula espinhal (L5). Marcação em DAPI. Espessura de 10 μm e barra de escala de 100 μm. **D** – Cornos dorsais, **V** - Cornos ventrais.

4.2 ANÁLISE DO NÚMERO DE CÉLULAS NA SUBSTÂNCIA CINZENTA DA MEDULA ESPINHAL (L5) DE CAMUNDONGOS APÓS TENOTOMIA.

Com o intuito de investigar se a ruptura total no tendão calcâneo influencia na quantidade de células nos cornos ventrais e dorsais da medula espinhal (L5) em 7, 14 e 21 dias após tenotomia, quantificamos o número de células na substância cinzenta. Pelo mesmo procedimento foi analisado a influência da sutura após a tenotomia na quantidade de células na substância cinzenta da medula espinhal.

As análises feitas no sétimo dia após a ruptura total do tendão calcâneo seguido de sutura ou não, demonstrou não haver diferença estatística entre o grupo Ruptura+Sutura ($1655 \pm 66,5$) e o grupo Controle ($1668 \pm 52,3$). No entanto, a quantidade de células no grupo Ruptura apresentou diferença significativa ($1408,33 \pm 58,59$) em relação ao grupo controle ($p < 0,05$) e em comparação ao grupo Ruptura+Sutura ($p < 0,05$) (figura 8).

Na investigação do 14º dia após a lesão, não houve diferença estatisticamente significativa do grupo Ruptura+Sutura ($1639 \pm 48,5$) em relação ao grupo controle ($1668 \pm 52,3$) entretanto, o grupo Ruptura ($1402,7 \pm 72,7$) apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$) e grupo Ruptura+Sutura ($p < 0,05$). (figura 8).

Da mesma forma, no 21º dia pós-lesão não foi identificado diferença significativa do grupo Ruptura+Sutura ($1668,3 \pm 14,1$) em relação ao grupo controle ($1668 \pm 52,3$), porém o grupo Ruptura ($1374,5 \pm 74,2$) apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($1668 \pm 52,3$; $p < 0,01$) e grupo Ruptura+Sutura ($1668,3 \pm 14,1$; $p < 0,01$) (figura 8), demonstrando desta forma que no processo de reparo da lesão do tendão calcâneo ocorre diminuição do número de células da medula espinhal (L5) mas, que, quando a lesão é seguida do reparo cirúrgico não é visto alterações no número total de células.

Quando comparado o número de células intra-grupo em todos os dias analisados (7, 14 e 21) não foi observado diferença no grupo Ruptura ($p = 0,854$) e grupo Ruptura+Sutura ($p = 0,7255$).

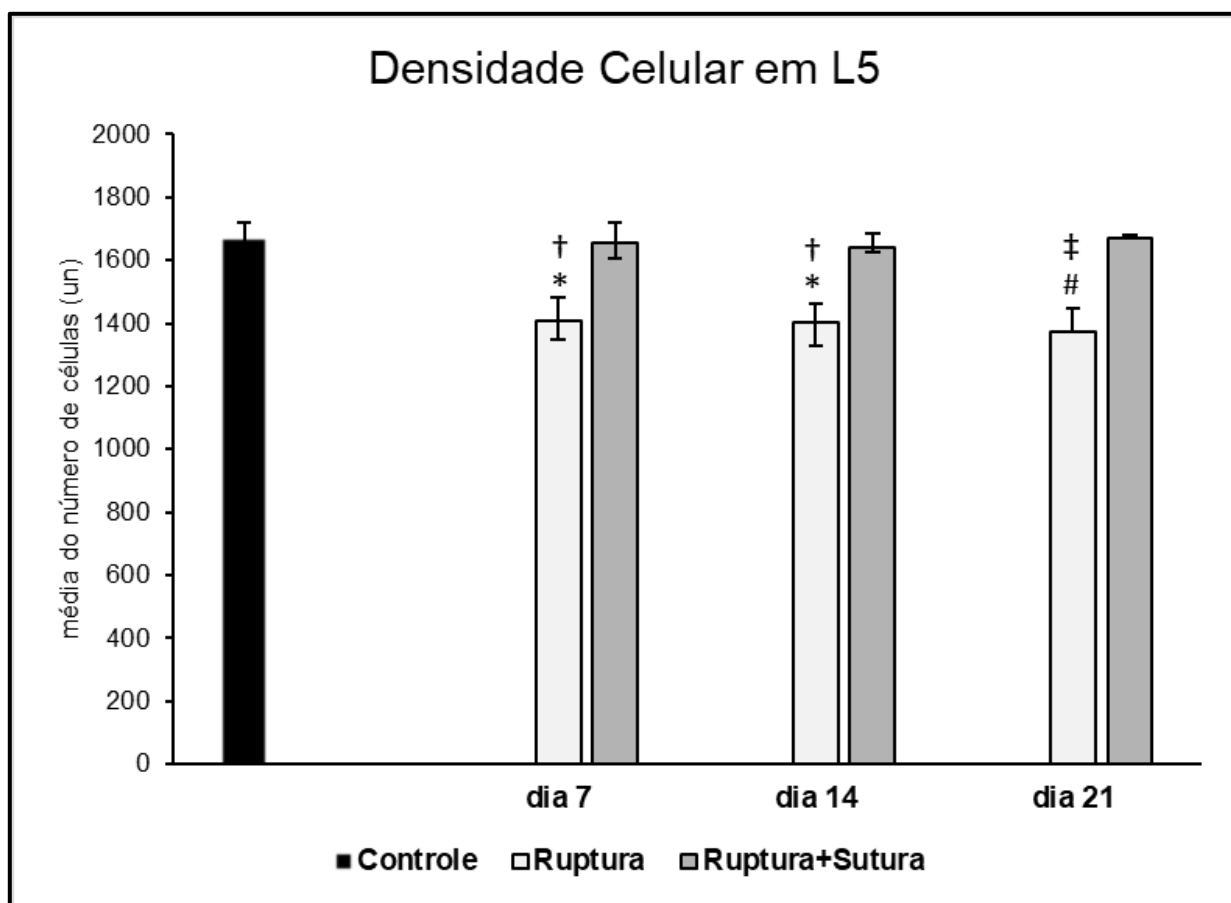


Figura 8 – Número de células na substância cinzenta da medula espinhal de camundongos, nos dias 7, 14 e 21 pós tenotomia seguida ou não de sutura. Dados expressos em média \pm desvio padrão, n=3 (ANOVA-Tukey. * p < 0,05 e # p < 0,01 vs Controle; † p < 0,05 e ‡ p < 0,01 vs ruptura+sutura)

4.3 ANÁLISE DE MARCAÇÃO DE MICROGLIAS (IBA1) NA MEDULA ESPINHAL (L5) APÓS TENOTOMIA

A reatividade das células microglias no segmento L5 da medula espinhal dos camundongos em resposta à ruptura do tendão calcâneo foi avaliada por imunomarcção com o anticorpo anti-iba1. As fotomicrografias do grupo controle demonstram não haver atividade microglial em condições normais, com o tendão calcâneo íntegro (figura 9).

As análises do grupo ruptura após 7 dias de ruptura do tendão não diferiram do grupo controle, indicando desta forma que, decorrido uma semana após ruptura do tendão calcâneo não se vê a participação microglial na medula espinhal. A análise do 14^o dia após a ruptura do tendão calcâneo identificou a ocorrência de ativação microglial e, estas células foram identificadas em todos os cornos avaliados como mostrado na figura 9. Para melhor visualização, os quadros a esquerda mostram em maior aumento o formato das células reativas.

Já, nas análises de 21 dias após a lesão, não foram identificadas microglias reativas em nenhum dos cornos. Desta forma, fica evidente primeiramente que as microglias atuam na medula espinhal (L5) em resposta à ruptura do tendão calcâneo, e que, sua atividade ocorre em 14 dias após a lesão, retornando ao padrão normal já em 21 dias pós lesão.

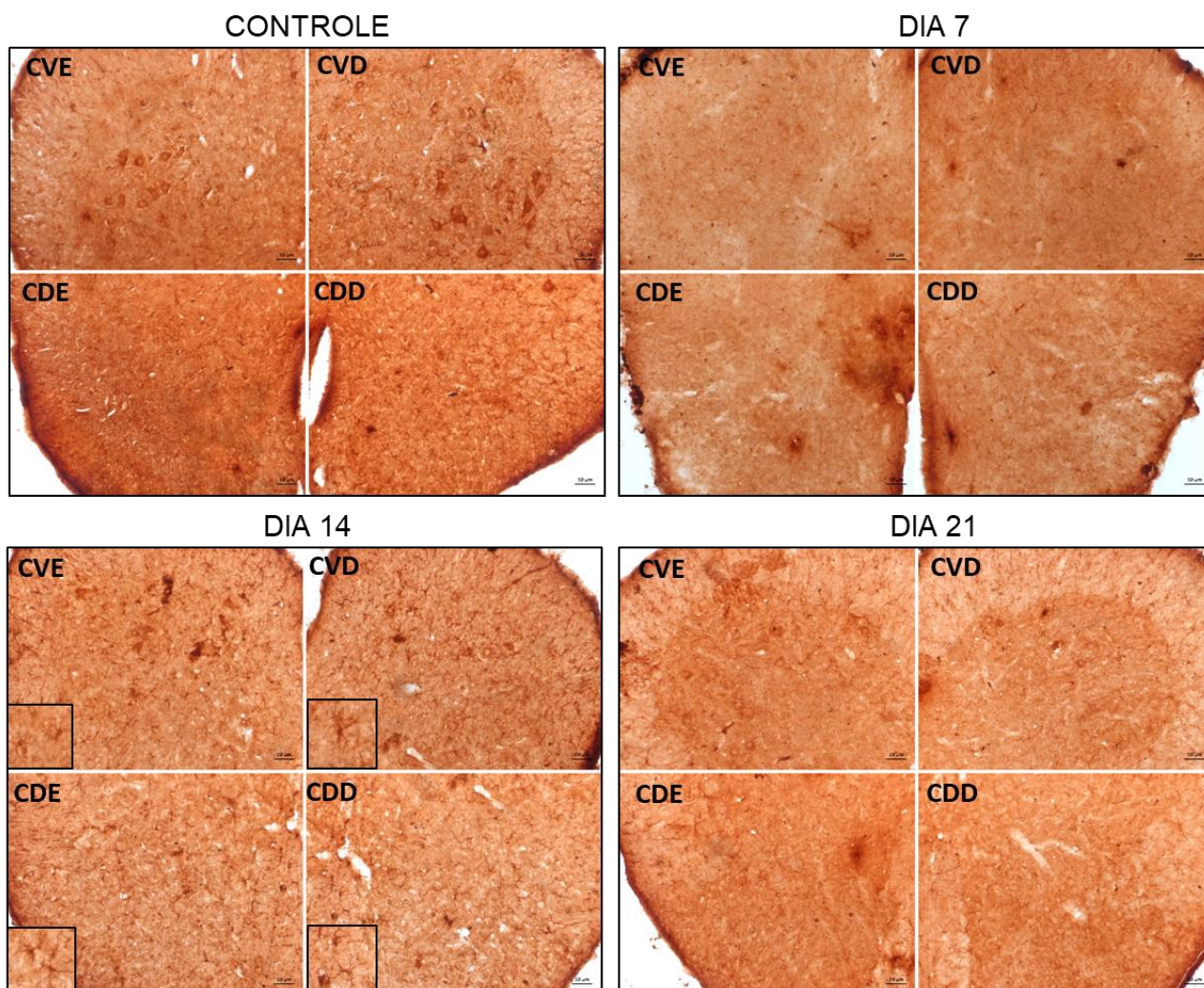


Figura 9 – Imunomarcção para microglias no segmento L5 da medula espinhal. Avaliação por imuno-histoquímica (iba-1) associado à ruptura do tendão calcâneo em 7, 14 e 21 dias após lesão e do grupo controle. CVE: corno ventral esquerdo; CVD: corno ventral direito; CDE: corno dorsal esquerdo; CDD: corno dorsal direito. Objetiva de 40x, barra da escala 50µm, n= 3.

4.4 EXPRESSÃO DE ASTRÓCITOS (GFAP) NA MEDULA ESPINHAL (L5) RELACIONADA A TENOTOMIA

A avaliação da reatividade de astrócitos neste trabalho foi avaliada com o intuito de verificar se estas células tem participação no processo de recuperação da ruptura do tendão calcâneo de camundongos. A figura 10 mostra as micrografias do grupo controle e do grupo ruptura nos dias 7, 14 e 21 pós lesão.

As análises do grupo controle demonstraram que não houve reatividade de astrócitos no segmento L5 da medula espinhal, contudo, em apenas uma semana (dia 7) após a ruptura do tendão calcâneo, ocorreu uma intensa reatividade astrocitária que pode ser vista em maior quantidade nos cornos ventral e dorsal do lado ipsilateral a lesão e em menor expressão nos cornos ventral e dorsal do lado contralateral a lesão. Os quadros à esquerda de cada micrografia mostram em maior aumento as células reativas.

Ao avaliarmos o segmento L5 da medula espinhal em 14 dias após a lesão, também identificamos astrócitos reativos em todos os cornos investigados, porém quando comparado ao dia 7 observa-se que esta marcação já está diminuída, porém ainda bem evidente quando comparado ao grupo controle.

As fotomicrografias do dia 21 demonstram uma diminuição na expressão de astrócitos reativos quando comparado ao dia 14 e dia 7, entretanto ainda se difere do grupo controle. Desta forma, estes resultados apontam que a ruptura do tendão calcâneo é capaz de suscitar a reatividade astrocitária na medula espinhal (L5).

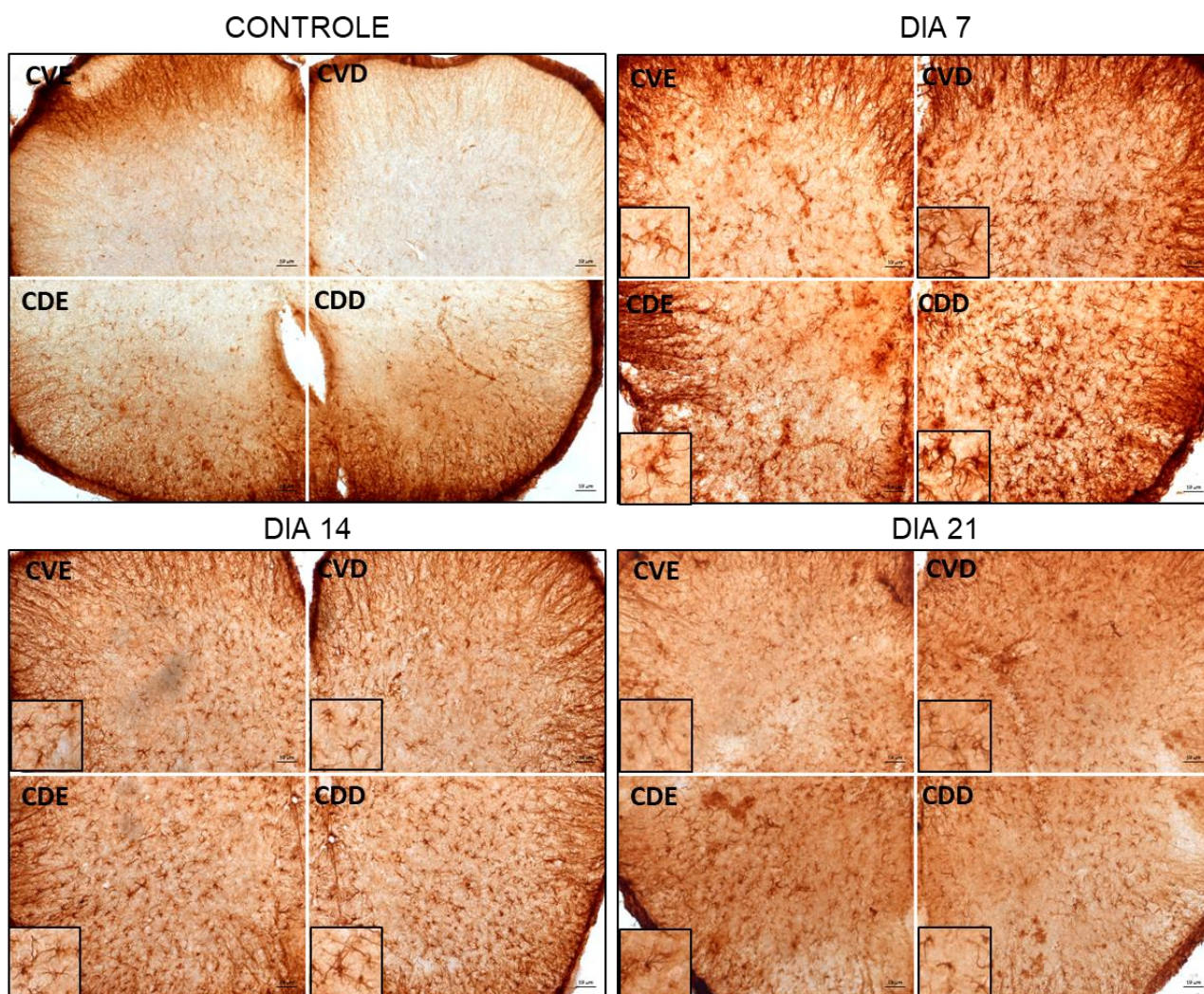


Figura 10 – Imunomarcção para astrócitos no segmento L5 da medula espinhal. Avaliação por imuno-histoquímica (Gfap) associado à ruptura do tendão calcâneo em 7, 14 e 21 dias após lesão e do grupo controle. CVE: corno ventral esquerdo; CVD: corno ventral direito; CDE: corno dorsal esquerdo; CDD: corno dorsal direito. Objetiva de 40x, barra da escala 50µm, n= 3.

4.5 ALTERAÇÕES NOS NÍVEIS DE NITRITO NA MEDULA ESPINHAL RELACIONADO À TENOTOMIA.

A fim de investigar se os níveis de nitrito na medula espinhal são modificados frente a ocorrência de ruptura total do tendão calcâneo, estes níveis foram quantificados por espectrofotometria em 7, 14 e 21 dias após a lesão no tendão do grupo ruptura.

Verificamos que após 7 dias de lesão os níveis de nitrito do grupo Ruptura ($0,0004 \pm 10,8 \times 10^{-5}$) foi significativamente ($p < 0,01$) mais alto se comparado ao grupo controle ($0,0002 \pm 3,45 \times 10^{-5}$) (Figura 11). A análise realizada 14 dias após a lesão demonstrou um aumento estatisticamente significativo nos níveis de nitrito do grupo Ruptura ($0,0006 \pm 1,06 \times 10^{-5}$) em relação ao grupo controle ($p < 0,01$) e em relação aos resultados observados no dia 7 para este mesmo grupo ($p < 0,01$) (Figura 11).

Em 21 dias após a ruptura total do tendão calcâneo, os valores de nitrito foram diminuídos ($0,0003 \pm 2,79 \times 10^{-5}$), apresentando diferença estatística significativa em relação aos dias 7 ($p < 0,05$) e 14 ($p < 0,05$), entretanto, não diferiu do grupo controle (Figura 11).

Dessa forma, verificamos que a medula espinhal sofreu modificações no que se refere à quantidade de nitrito tecidual após a ruptura do tendão calcâneo, sugerindo uma participação da atividade nitrérgica no SNC em caso de ruptura total do tendão calcâneo.

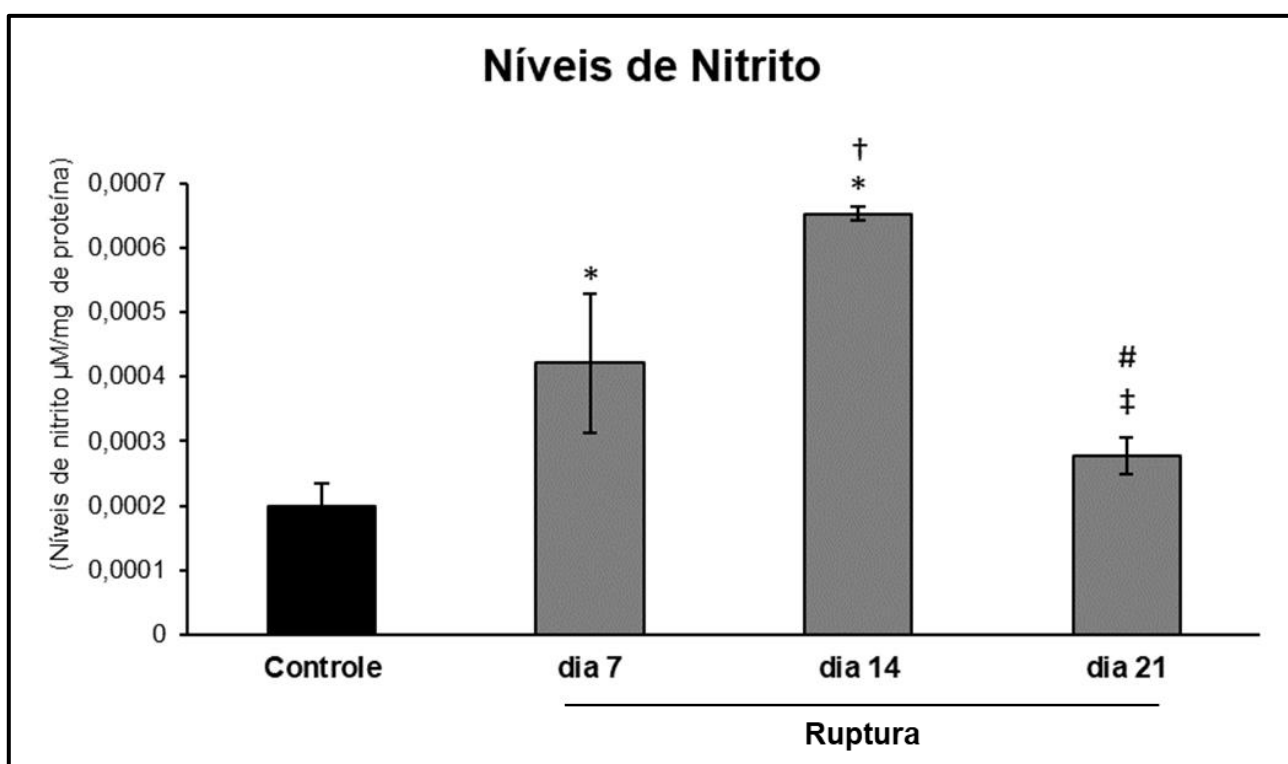


Figura 11 – Níveis teciduais de nitrito. Aumento nos níveis de nitrito na medula espinhal (lombar) associado à ruptura do tendão calcâneo em 7, 14 e 21 dias após lesão e do grupo controle. Os valores são expressos em média \pm desvio padrão, $n=6$ (ANOVA-Tukey, * $p<0.01$ vs controle; † $p<0.01$ e ‡ $p<0.05$ vs ruptura-dia 7; # $p<0.05$ vs ruptura-dia 14).

4.6 EXPRESSÃO DE iNOS (anti-NOS2) NA MEDULA ESPINHAL (L5) RELACIONADA A TENOTOMIA

A avaliação de iNOS neste trabalho foi realizada para investigação da possível expressão desta isoforma na medula espinhal em decorrência da ruptura total do tendão calcâneo. Em decorrência dos resultados obtidos dos níveis de nitrito as análises foram concentradas em 7 e 14 dias após a lesão.

As fotomicrografias do grupo controle demonstram primeiramente na imagem de Dapi a estrutura correspondente ao segmento L5 da medula espinhal. A fotomicrografia correspondente a imunomarcação para iNOS indica não haver marcação em condições normais. (Figura 12)

Em 7 dias após ruptura do tendão calcâneo, de igual modo, não foram identificadas nenhuma marcação para iNOS. Já nas análises de 14 dias após a lesão do tendão, é possível identificar um padrão de marcação que se concentra em maior parte nos cornos dorsais do segmento L5 da medula espinhal dos camundongos, entretanto, há marcação também no corno ventral direito. (Figura 12)

Por fim, estes resultados apontam para uma participação nitrérgica, via iNOS, em 14 dias após a ruptura do tendão calcâneo que provavelmente tem relação mais próxima com as vias sensoriais e pouco menos com as vias motoras por apresentar uma marcação prevalente na região dorsal bilateral e ventral unilateral da substância cinzenta. (Figura 12)

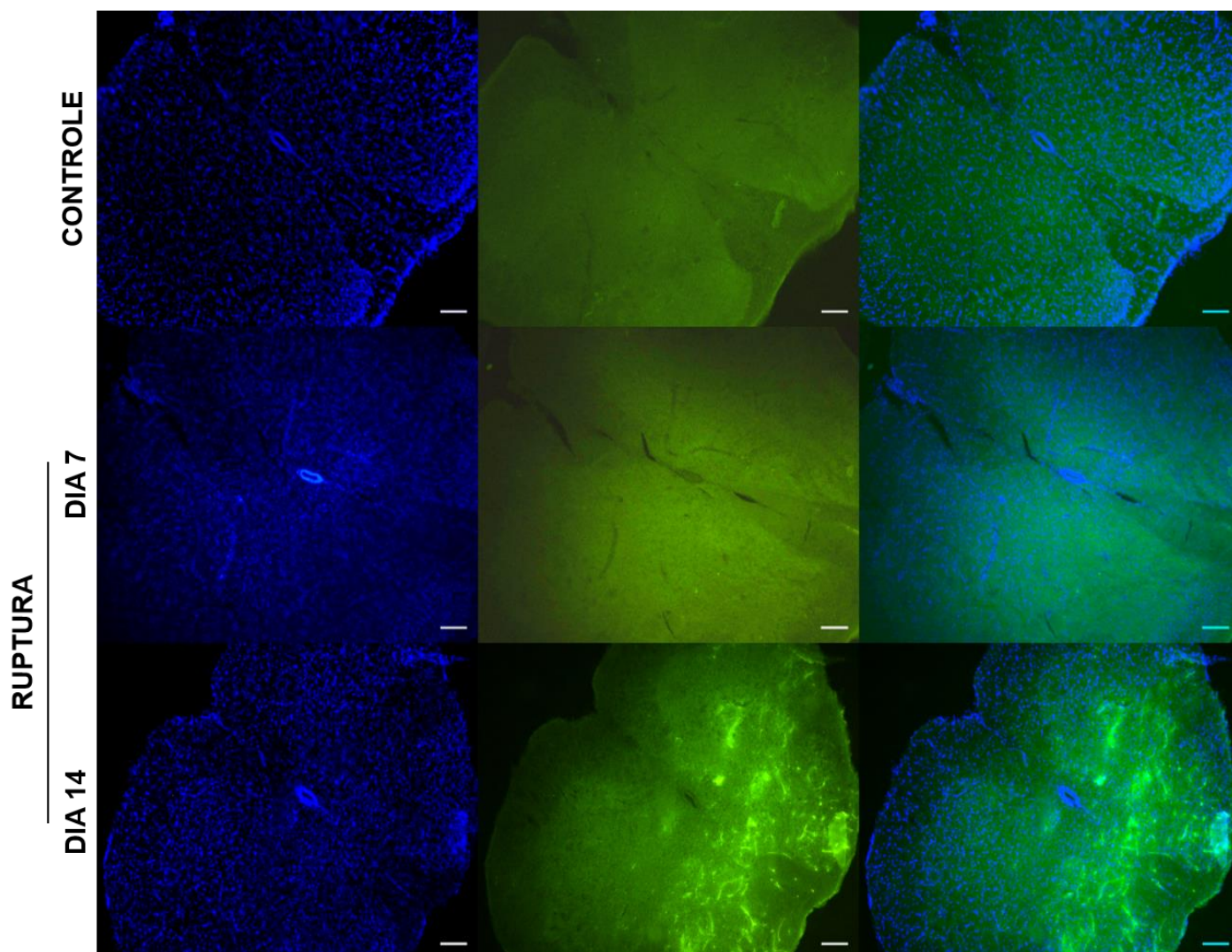


Figura 12 – Imunomarcção para iNOS no segmento L5 da medula espinhal. Avaliação por imunofluorescência (anti-NOS2) associado à ruptura do tendão calcâneo em 7 e 14 dias após lesão e do grupo controle. Marcação com Dapi em azul. Objetiva de 20x, barra da escala 500 μ m, n= 3. Imunomarcção para iNOS em verde. Objetiva de 20x, barra da escala 500 μ m, n= 3.

5. DISCUSSÃO

Os achados iniciais do presente estudo trazem à tona uma importante questão sobre a relação da ausência do reparo cirúrgico do tendão calcâneo e o desenvolvimento de lesão no sistema nervoso central. Nossos dados demonstram, pela primeira vez, que uma lesão periférica que compromete a união osteomiotendínea promove alterações histológicas e bioquímicas na medula espinhal dos animais avaliados. He e Dishman (2010) já demonstraram que a inatividade muscular por imobilização articular pode contribuir para o mecanismo de alterações degenerativas na medula espinhal de roedores. Contudo, o presente estudo é pioneiro em demonstrar tal alteração relacionada a lesão de tendão calcâneo.

Para determinar se o manejo cirúrgico iria induzir respostas diferentes ou semelhantes na medula espinhal, a quantidade de células foi avaliada, demonstrando que o reparo cirúrgico imediato é capaz de preservar as estruturas celulares. Por outro lado, na ausência de sutura é visto a diminuição do número de células a partir de 7 dias após a lesão. Estes dados somam a um estudo que comprova a influência do tempo de atraso da lesão à cirurgia, entretanto, os danos são atribuídos apenas ao tendão e possível re-ruptura desta estrutura em humanos, sem adentrar à discussão da possível participação do SNC nestes efeitos negativos (SVEDMAN et al., 2018).

A diminuição no número de células visto em nossos achados podem apontar possível morte celular, uma vez que, estudos anteriores têm demonstrado que lesões periféricas de nervo provocam morte celular na medula espinhal e na raiz do gânglio dorsal, mediadas pela expressão de genes relacionados à apoptose, a saber, Bax, Bcl2 e caspase-3 (POLGÁR et al., 2005; SCHOLZ et al., 2005; YOWTAK et al., 2013; SHAMS et al., 2017; INQUIMBERT et al., 2018).

A morte dessas células tem sido atribuída a recuperação sensorial deficiente e redução da função motora após lesão do nervo periférico (SHAMS et al., 2017). Na tendinopatia, a função motora e a dor também são problemáticas amplamente discutidas, entretanto os procedimentos adotados frente esta lesão não agrega conhecimentos de alterações no SNC.

Este primeiro resultado demonstra que a lesão no tendão calcâneo atinge mais estruturas do que as conhecidas até o momento. E neste sentido, contrapõe estudos prévios que sugerem que o reparo cirúrgico não oferece nenhuma vantagem sobre o manejo não operatório em 15 dias após a lesão (MURREL et al., 1993) destacando então, que a análise de parâmetros funcional, biomecânico e histológico do tendão, não devem ser adotados como os únicos parâmetros determinantes à cura desta lesão.

Em soma a provável neurodegeneração na medula espinhal, os achados de nossa pesquisa mostraram que a lesão no tendão foi responsável por ativar as células gliais em L5, fato este, ainda não reportado na literatura, mas que corrobora a estudos prévios em modelo experimental de osteoartrite no joelho (ADÃES et al., 2017). Já em lesões de nervos periféricos, uma gama de estudos tem identificado microglia e astrócitos reativos na medula espinhal (L3-5) após a constrição do nervo ciático (BIANCO et al., 2012; XU et al., 2016). Neste contexto, também são identificados na medula espinhal a expressão de neurotrofinas (FUNAKOSHI et al., 1993), de fatores de transcrição (TSUJINO et al., 2000), neuropeptídeos (WAKISAKA et al., 1991) e neurotransmissores como Gaba e Glutamato (DE LUCA et al., 2015; CIRILLO et al., 2016).

Neste trabalho, a imunorreatividade de microglias foi investigada pela expressão de IBA-1, demonstrando que 14 dias após a ruptura do tendão calcâneo as microglias são ativadas na medula espinhal (L5). A participação das células gliais em lesões periféricas são atribuídas aos processos degenerativos neuronais e, no caso específico das micróglias, é atribuído um papel especial na sustentação da resposta inflamatória (DE LUCA et al., 2015).

A conhecida participação das microglias na inflamação e reparação do SNC reforçam a hipótese de alterações no SNC decorrente de uma lesão no tendão calcâneo (SOMINSKY et al., 2018). Sobretudo, quando somado à resultados de pesquisas ainda em lesões de nervos periférico que demonstram a regulação positiva de diversos mediadores inflamatórios na medula espinhal, dentre eles, a ciclooxigenase-2 (COX-2) é descrita por desempenhar um papel importante durante esses processos (SCHAFERS et al., 2003; JI; XU; GHAO 2014; SHAMS et al., 2017; SOMMER; LEINDERS; ÜÇEYLER, 2018) Além disto, também é reportado a diminuição nas atividades de enzimas antioxidantes (SOD

e CAT) culminando em um status pró-oxidativo na medula espinhal e, em consequência, um processo de degeneração axonal (SHAMS et al., 2017).

Neste contexto, nossos resultados abrem um novo caminho na compreensão da problemática da dor nesta lesão, uma vez que, em princípio, a dor na tendinopatia era atribuída somente ao aumento de substâncias químicas no local da lesão. Contudo, o entendimento de que as microglias são consideradas o agente central nos mecanismos de dor neuropática, promovendo o início da dor através da liberação de citocinas e fatores de crescimento na medula espinhal (PENG et al., 2016; TSUDA, 2016) podem contribuir para a compreensão de provável justificativa para o quadro algico.

Desta forma, nossos achados leva-nos a compreensão de que a dor crônica na lesão tendínea provavelmente não está relacionada somente às alterações no tendão, mais também a sensibilização central em resposta a inflamação periférica já descrita (JI; XU; GHAO 2014). Cabe destacar que a imunomarcagem para microglia nesta pesquisa foram expressas em ambos lados da medula espinhal (fig.9) corroborando a estudos prévios que observaram expressão semelhante após lesão de nervo ciático (LIU et al., 2017) Podendo desta forma, ser um indício que justifique as alterações no tendão contralateral ao lado lesionado descritas na literatura (HEALES et al., 2013)

A investigação da ativação de astrócitos mostrou que os mesmos são ativados na medula espinhal (L5) em resposta a lesão do tendão calcâneo, dado este, ainda não reportado na literatura mais que se assemelha a estudos anteriores em lesões periféricas que demonstram a expressão de astrócitos conjuntamente a expressão de microglias, em que, acredita-se haver um caminho direto de comunicação entre esses dois tipos de células gliais para coordenar seus padrões temporais de ativação (GARRISON et al., 1991; SCHOLZ; WOOLF, 2005; XU et al., 2016; ADÃES et al., 2017).

Em 7 dias após a lesão foi identificado a expressão de GFAP, e, em 14 e 21 dias esta expressão foi diminuída, porém ainda bem visível (fig. 10). Em divergência aos resultados citados, a literatura descreve que a resposta microglial à lesão de nervo periférico precede a ativação astrogliar, entretanto em nosso modelo experimental de lesão tendínea foi identificado que ocorre o oposto, pois em 7 dias após a lesão é visto a ativação somente dos astrócitos enquanto que

só em 14 dias após a lesão no tendão é que as microglias foram ativadas (SCHOLZ; WOOLF, 2005).

O aumento da imunomarcção da GFAP neste estudo foi observado em predominância no corno dorsal da medula ipsilateral à lesão, conforme achados de lesões de nervo periférico (GARRISON et al., 1991; YANG et al., 2017), e, neste mesmo modelo de lesão é descrito a relação da ativação dos astrócitos com a expressão e liberação da quimiocina CCL2, conhecida por recrutar monócitos, células T de memória e células dendríticas para os locais de inflamação produzidos por lesão ou infecção tecidual (YANG et al., 2017) sustentando a provável relação da lesão tendínea com as alterações na medula espinhal (L5) visto em nosso trabalho.

A ativação de astrócitos na medula espinhal no lado contralateral à lesão do tendão foi identificado em nossa pesquisa, demonstrando então, que uma lesão unilateral no tendão calcâneo, contribui para ativação de astrócitos na medula espinhal bilateralmente. Obata et al. (2010), ao identificar resposta semelhante em lesões de nervo periférico, descreveram a contribuição deste tipo celular de forma preponderante para o desenvolvimento da dor neuropática em ratos, sobretudo, contribuindo também para a dor na pata contralateral à lesionada. Em contraste a microglia, Ji; Xu e Ghao (2014) descrevem que os astrócitos parecem apoiar a manutenção da dor em vez do seu desenvolvimento inicial, atribuindo este fato à indução de uma alta expressão duradoura de CCL7 em astrócitos após lesão do nervo de camundongos.

Em nossa avaliação, a região ventral da medula espinhal também apresenta ativação astrocitária. E, este resultado converge aos eventos descritos em lesões do nervo periférico, reportado por acompanhar a regulação positiva de neurotrofinas (BDNF, NGF e NT-3) nesta região, sobretudo indicando possível contribuição para a regeneração nervosa e consequente recuperação da função motora (QIAN et al., 2018)

Considerando que as células gliais são as principais células imunes inatas no SNC, os achados de nossa pesquisa da ativação de forma conjunta de microglias e astrócitos, destaca em nosso modelo experimental que há

alterações no SNC em resposta a possíveis danos, indicando provável correlação entre a plasticidade na medula espinhal e a lesão do tendão calcâneo.

A avaliação da provável participação do sistema nitrérgico no SNC após lesão do tendão calcâneo ainda não havia sido reportada na literatura, e, neste trabalho, foi demonstrado primeiramente sob a avaliação do produto da síntese de NO (nitrito), que em 7 dias após a lesão do tendão calcâneo ocorre o aumento de NO na medula espinhal (lombar), e que em 14 dias esses níveis são ainda aumentados, retornando aos níveis basais em 21 dias.

Em estudo feito por Murrell et al. (1997) a participação do NO em lesões tendíneas foi identificada no tendão em 7 dias após a lesão semelhante ao aumento na medula espinhal visto em nosso trabalho. Em 14 dias após a lesão, os níveis de nitrito ainda se encontram elevados na medula espinhal, sobretudo, significativamente maiores aos encontrados em 7 dias nesta pesquisa. E, em comparação aos resultados investigados por Murrell et al. (1997), diferentemente no tendão a atividade da NOS retornam aos níveis basais em 14 dias.

Na medula espinhal, a indução de NOS tem sido atribuída a morte de motoneurônios (WU 1993; WU; LI, 1993), sobretudo pelo aumento gradual da expressão de nNOS na medula espinhal em decorrência de inatividade muscular (HE; DISHMAN, 2010). Em contrapartida, o NO mediado por nNOS, também é reportado na literatura por ter um papel essencial na sobrevivência e recuperação celular após lesão de nervo periférico (KEILHOFF; FANSA; WOLF, 2004)

Desta forma, fica evidente que assim como no tendão, na medula espinhal o NO também é apontado por apresentar um efeito dual, sendo descrito por seu papel neuroprotetor ao mesmo tempo que é tido como um agente indutor de neurodegeneração, a depender das concentrações. Contudo, os efeitos relatados são decorrentes de lesões de nervo periférico, não havendo dados na literatura que aponte efeitos decorrentes de lesão do tendão (LIU; MARTIN, 2001; YU, 2002; WU et al., 2003; KEILHOFF; FANSA; WOLF, 2004).

Nossas análises da imunorreatividade de iNOS em L5, mostraram que não há atividade desta isoforma em 7 dias após a lesão (fig. 12), portanto, o NO identificado pela quantidade de nitrito no resultado anterior provavelmente não é induzido via iNOS. Sobretudo em 14 dias após a lesão do tendão foi identificado a expressão de iNOS na medula espinhal dos camundongos (fig. 12), com

predominância no corno dorsal ipsilateral e, em menor expressão no corno dorsal contralateral.

A participação nitrérgica nesta lesão, sobretudo nestas regiões relacionadas a comunicação sensorial, corrobora a dados na literatura que sugere que o NO desempenha importante papel na neurotransmissão da medula espinhal por diversas vias, incluindo a somatossensorial (SAITO et al., 1994). E ainda, que a expressão desta isoforma no tecido nervoso se dá em resposta a mediadores inflamatórios e pró-inflamatórios que atuam sobre macrófagos, astrócitos e microglia. Portanto, reforçam a provável relação do NO e da reatividade glial identificado neste trabalho, ao que já tem sido descrito em estudos anteriores sobre a capacidade de indução da iNOS em células gliais (FILHO, B. ZILBERSTEIN 2000; FREIRE et al., 2009; LEE et al., 2009)

Além da relação com eventos inflamatórios, o NO tem sido reportado por estar envolvido em um complexo e diverso papel na modulação da dor, demonstrando paradigmas fisiológicos e fisiopatológicos, no qual, no corno dorsal da medula espinhal, contribui para o desenvolvimento da sensibilização central e, em contrapartida, dados experimentais também demonstraram que o NO inibe a nocicepção no sistema nervoso periférico e também no sistema nervoso central (WU et al., 2004; KRAYCHETE et al., 2008; SCHMIDTKO et al., 2009; CURY et al., 2011; GALDINO et al., 2014; NAZERI et al., 2014).

Sobre a iNOS, apesar de haver discordâncias quanto a expressão desta isoforma na medula espinhal, neste estudo demostramos a expressão desta isoforma em resposta a lesão no tendão calcâneo, alinhado a estudos prévios que já demonstraram sua expressão em condições de dor neuropática e inflamatórias (GUHRING et al., 2000; TAO et al., 2003; CURY et al., 2011; AHLAWAT; SHARMA, 2018). Em condições semelhantes à de nosso modelo experimental já tem sido atribuído a produção imediata de NO via iNOS na medula espinhal em consequência a indução precoce de dano tecidual periférico e inflamação (GUHRING et al., 2000; LIANG et al., 2017).

Interessantemente, a expressão em ambos lados do corno dorsal visto em nossa investigação se assemelha a dados descritos na literatura em modelo experimental de monoartrite, que demonstra a indução de mudanças rápidas e persistentes no lado contralateral da medula espinhal atribuindo este fato a uma piora à hipersensibilidade a dor através da regulação positiva da iNOS (ZHAO et

al 2018). Desta forma, a inibição da atividade da iNOS juntamente com inibição da ativação microglial já tem sido sugerida por apresentar um potencial neuroprotetor em algumas desordens neurológicas investigadas em modelo animal. Neste mesmo contexto, é reportado que uma redução no óxido nítrico parece ser um efeito comum da inibição da ativação microglial (ZEMKE; MAJID, 2004).

Em termos gerais, as alterações ocorridas na medula espinhal decorrentes de uma lesão no tendão calcâneo visto em nossa pesquisa desponta a necessidade de novos direcionamentos no manejo terapêutico e farmacológico da tendinopatia. Trazendo indicativos de possíveis eventos degenerativos, oxidativos, inflamatórios e de plasticidade neural na medula espinhal decorrente desta lesão. Neste contexto, fica evidente que a dor e a incapacidade comum à lesão, não devem ser ancoradas somente às estruturas periféricas aliados aos eventos ocorridos em estruturas adjacentes, mas, que necessitam ampliar o campo estrutural de intervenção sobretudo o SNC.

6. CONCLUSÃO

- A ausência de reparo cirúrgico após ruptura total do tendão calcâneo causa diminuição na quantidade de células na substância cinzenta da medula espinhal (L5) de camundongos em 7, 14 e 21 dias após lesão
- A ruptura do tendão calcâneo induz reatividade microglial na medula espinhal (L5) de camundongos no 14º dia após a lesão
- Astrócitos são ativados na medula espinhal (L5) de camundongos em 7, 14 e 21 dias após a ruptura total do tendão calcâneo
- A ruptura do tendão calcâneo resulta em aumentos nos níveis de nitrito na medula espinhal (lombar) em 7 e 14 dias após a lesão
- A isoforma induzível de NOS é expressa na medula espinhal em 14 dias após a ruptura do tendão calcâneo
- A ruptura total do tendão calcâneo unilateral de camundongos induziu alterações na medula espinhal bilateralmente.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARON B.B. & GOSLINE J.M. Elastin as a random-network elastomer: a mechanical and optical analysis of single elastin fibers. **Biopolymers** 20, 1247–1260, 1981.

ABATE, M.; GRAVARE-SILBERNAGEL, K.; SILJEHOLM, C.; DI IORIO, A.; DE AMICIS, D.; SALINI, V; WERNER, S; PAGANELLI, R. Pathogenesis of tendinopathies: inflammation or degeneration? **Arthritis Res Ther.** 11: 235-250, 2009.

ACKERMANN PW, LI J, FINN A, AHMED M, KREICBERGS A. Autonomic innervation of tendons, ligaments and joint capsules. A morphologic and quantitative study in the rat. **J Orthop Res**, 2001.

ACKERMANN, P, W. Neuronal regulation of tendon homeostasis. **Int. J. Exp. Path.** 94, 271–286, 2013.

ACKERMANN, P, W.; AHMED, M.; KREICBERGS, A. Early nerve regeneration after Achilles tendon rupture – a prerequisite for healing? A study in the rat. **Journal of Orthopaedic Research** 20 (2002) 849-856.

ACKERMANN, P, W.; LI, J.; LUNDEBERG, T.; KREICBERGS, A. Neuronal plasticity in relation to nociception and healing of rat achilles tendo. **Journal of Orthopaedic Research** 21 (2003) 432441.

ACKERMANN, P, W; FRANKLIN, S. L; DEAN, B, J. F; CARR, A, J; SALO, P. T; HART, D. A. Neuronal pathways in tendon healing and tendinopathy – update. **Frontiers in Bioscience** 19, 1251-1278, June 1, 2014.

ADÃES S, ALMEIDA L, POTES CS, FERREIRA AR, CASTRO-LOPES JM, NETO FL. Glial activation in the collagenase model of nociception associated with osteoarthritis. **Mol Pain.** 2017;13:1-12. doi:10.1177/1744806916688219

AHLAWAT A, SHARMA S. A new promising simultaneous approach for attenuating type II diabetes mellitus induced neuropathic pain in rats: iNOS inhibition and neuroregeneration. **Eur J Pharmacol.** 2018; 818:419-428. doi:10.1016/j.ejphar.2017.11.010

AHMED, A. S.; LI, J; ABDUL, A. M. D.; AHMED M, OSTENSON, C-G; SALO, P. T, et al. (2017) Compromised Neurotrophic and Angiogenic Regenerative Capability during Tendon Healing in a Rat Model of Type-II Diabetes. **PLoS ONE** 12(1): e0170748. doi:10.1371/journal.pone.0170748.

ALBANI, M.; CHATZISOTIRIOU, A.; GOUGOULIAS, N. From muscle research to clinical applications: Do glutamate antagonists aid muscle recovery? **Muscles, Ligaments and Tendons Journal** 2012; 2 (2): 64-69.

ALENCAR, M. C. B.; OTA, N. H. O afastamento do trabalho por LER/DORT: repercussões na saúde mental. **Rev. Ter. Ocup. Univ. São Paulo**, v. 22, n. 1, p. 60-67, jan./abr. 2011.

ALFREDSON H, OHBERG L, FORSGREN S. Is vasculo-neural ingrowth the cause of pain in chronic Achilles tendinosis? An investigation using ultrasonography and colour Doppler, immunohistochemistry, and diagnostic injections. **Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.** 2003.

ALFREDSON H, SPANG C, FORSGREN S. Unilateral surgical treatment for patients with midportion Achilles tendinopathy may result in bilateral recovery. **Br J Sports Med**, 2014; 48: 1421–1424. doi:10.1136/bjsports-2012-091399.

ALFREDSON, H; FORSGREN, S; THORSEN, KIM.; FAHLSTRÖM, M.; JOHANSSON, H.; LORENTZON, R. Glutamate NMDAR1 receptors localised to nerves in human Achilles tendons. Implications for treatment? **Knee Surg, Sports Traumatol, Arthrosc.** (2001) 9 :123–126 DOI 10.1007/s001670000188

ALFREDSON, H; LORENTZON, R. Chronic Tendon Pain: No Signs of Chemical Inflammation but High Concentrations of the Neurotransmitter Glutamate. Implications for Treatment? **Current Drug Targets**, 2002, 3, 43-54.

ALFREDSON, H; LORENTZON, R. Intratendinous glutamate levels and eccentric training in chronic Achilles tendinosis: a prospective study using microdialysis technique. **Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc** (2003) 11: 196–199. DOI 10.1007/s00167-003-0360-0

ALMEIDA, M. C. V; CEZAR-VAZ, M. R; ROCHA, L.P; CARDOSO, L.S. Trabalhador portuário: perfil de doenças ocupacionais diagnosticadas em serviço de saúde ocupacional. **Acta Paul Enferm.** 2012; 25(2):270-6.

ANDERSSON, G; FORSGREN, S; SCOTT, A; GAIDA, J. E; STJERNFELDT, J. E; LORENTZON, R; ALFREDSON, H; BACKMAN, C; DANIELSON, P. Tenocyte hypercellularity and vascular proliferation in a rabbit model of tendinopathy: contralateral effects suggest the involvement of central neuronal mechanisms. *Br J Sports Med* 2011; **45**:399–406. doi:10.1136/bjism.2009.068122

ARAÚJO, M. A; PAULA, M. V. Q. Ler/Dort: Um grave problema de saúde pública que acomete os cirurgiões-dentistas. **Revista APS**, v.6, n.2, p.87-93, jul./dez. 2003

ARCHAMBAULT, J; TSUZAKI, M; HERZOG, W; BANES, A. J. Stretch and interleukin- 1 p induce matrix metalloproteinases in rabbit tendon cells in vitro. *Journal of Orthopaedic Research* 20 (2002) 36-39

BACKMAN, L. J.; FONG, G.; ANDERSSON, G.; SCOTT, A.; DANIELSON, P. Substance P Is a Mechanoresponsive, Autocrine Regulator of Human Tenocyte Proliferation. **PLoS ONE** 6(2011): e27209. doi:10.1371/journal.pone.0027209

BAGGE, J; LORENTZON, R; ALFREDSON, H; FORSGREN, S. Unexpected presence of the neurotrophins NGF and BDNF and the neurotrophin receptor p75 in the tendon cells of the human Achilles tendon. **Histol Histopathol** (2009) 24: 839-848.

BAGGE. J; GAIDA, J. E.; DANIELSON, P; ALFREDSON, H; FORSGREN, S. Physical activity level in Achilles tendinosis is associated with blood levels of pain-related factors: a pilot study. **Scand J Med Sci Sports** 2011: 21: e430–e438 & 2011 John Wiley & Sons A/S doi: 10.1111/j.1600-0838.2011.01358.x

BERGLUND, M. E; HART, D. A; RENO, C; WIIG, M. Growth Factor and Protease Expression during Different Phases of Healing after Rabbit Deep Flexor Tendon Repair. **J Orthop Res** 29:886–892, 2011. DOI 10.1002/jor.21330

BIANCO MR, CIRILLO G, PETROSINO V, et al. Neuropathic pain and reactive gliosis are reversed by dialdehydic compound in neuropathic pain rat models. **Neurosci Lett.** 2012;530(1):85-90. doi:10.1016/j.neulet.2012.08.088

BJUR, D; ALFREDSON, H; FORSGREN, S. The innervation pattern of the human Achilles tendon: studies of the normal and tendinosis tendon with markers for general and sensory innervation. **Cell Tissue Res** (2005) 320: 201–206 DOI 10.1007/s00441-004-1014-3

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. Área Técnica da Saúde do Trabalhador. **Diagnóstico, tratamento, reabilitação e fisiopatologia das LER/DORT / Ministério da Saúde, Departamento de Ações Programáticas e Estratégicas. Área Técnica de Saúde do Trabalhador**; elaboração Maria Maeno *et al.*,. Brasília: Ministério da Saúde, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador. **Dor relacionada ao trabalho: lesões por esforços repetitivos (LER): distúrbios osteomusculares relacionados ao trabalho (Dort)** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2012.

BRETT, D.S.; SNYDER, S.H. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. **Neuron** 1992, 8, 3–11.

BRING, D K.-I; PAULSON, K.; RENSTROM, P; SALO, P; HART, D. A; ACKERMAN, P. W. Residual substance P levels after capsaicin treatment correlate with tendon repair. **Wound Rep Reg** 20 50–60, 2012.

BRING, D K.-I; RENO C; RENSTROM, P; SALO, P; HART, D. A; ACKERMAN, P. W. Joint Immobilization Reduces the Expression of Sensory Neuropeptide Receptors and Impairs Healing after Tendon Rupture in a Rat Model. **J Orthop Res** 27:274–280, 2008.

BRING, D. K-I; KREICBERGS, A.; RENSTROM Per A. F. H; ACKERMANN, P. W. Physical Activity Modulates Nerve Plasticity and Stimulates Repair after Achilles Tendon Rupture. **Journal of Orthopaedic Research**. 25: 164-72, 2007.

BRING, D.; RENO, C.; RENSTROM, P.; SALO, P.; HART, D.; ACKERMANN, P. Prolonged immobilization compromises up-regulation of repair genes after tendon rupture in a rat model. *Scand J Med Sci Sports*. 2010 Jun;20(3):411-7. doi: 10.1111/j.1600-0838.2009.00954.x. Epub 2009 Jul 2.

CARROLL, T. J; HERBERT, R. D; MUNN, J; LEE, M; GANDEVIA, S. C. Contralateral effects of unilateral strength training: evidence and possible mechanisms. **J Appl Physiol** 101: 1514–1522, 2006; doi:10.1152/jappphysiol.00531.2006.

CHIQUET, M; GELMAN, L; LUTZ, R; MAIER, S. From mechanotransduction to extracellular matrix gene expression in fibroblasts. **Biochimica et Biophysica Acta** 1793 (2009) 911–920.

CHIQUET, M; RENEDO, A. S; HUBER, F; FLUCK, M. How do fibroblasts translate mechanical signals into changes in extracellular matrix production? **Matrix Biology** 22 (2003) 73–80

CIRILLO G, COLANGELO AM, DE LUCA C, et al. Modulation of matrix metalloproteinases activity in the ventral horn of the spinal cord re-stores neuroglial synaptic homeostasis and neurotrophic support following peripheral nerve injury. *PLoS One*. 2016;11(3):1-12. doi:10.1371/journal.pone.0152750

COOK, J. L; KHAN, K, M; PURDAM, C. Achilles tendinopathy. **Manual Therapy** 7(3), 121-130, 2002.

CURY Y, PICOLO G, GUTIERREZ VP, FERREIRA SH. Pain and analgesia: The dual effect of nitric oxide in the nociceptive system. **Nitric Oxide - Biol Chem**. 2011;25(3):243-254. doi:10.1016/j.niox.2011.06.004

DAHL, J; LI, J; BRING, DANIEL K.-I; PER RENSTROM; ACKERMANN, PAUL W. Intermittent Pneumatic Compression Enhances Neurovascular Ingrowth and Tissue Proliferation during Connective Tissue Healing: A Study in the Rat. **Journal of orthopaedic research** 25:1185–1192, 2007.

DE LUCA C, SAVARESE L, COLANGELO AM, et al. Astrocytes and Microglia-Mediated Immune Response in Maladaptive Plasticity is Differently Modulated by NGF in the Ventral Horn of the Spinal Cord Following Peripheral Nerve Injury. **Cell Mol Neurobiol**. 2015;36(1):37-46. doi:10.1007/s10571-015-0218-2

DE MOS, M.; VAN EL, B.; DE GROOT, J.; JAHR, H.; VAN SCHIE, H. T. M.; VAN ARKEL, E. R.; TOL, H.; HEIJBOER, R.; VAN OSCH, G. J. V. M.; VERHAAR, J. A. N. Achilles Tendinosis. Changes in Biochemical Composition and Collagen Turnover Rate. **The American Journal of Sports Medicine**. Vol. 35, No. 9, 2007.

DEAN, B. J. F; SNELLING, S. J. B; DAKIN, S. G; JAVAID, M. K; CARR, A. J. In Vitro Effects of Glutamate and N-Methyl-D-Aspartate Receptor (NMDAR) Antagonism on Human Tendon Derived Cells. **Journal of orthopaedic research** (2015). DOI 10.1002/jor.22923abstractGroup>

DEAN, B. J. F; SNELLING, S. J. B; DAKIN, S. G; MURPHY, R. J; JAVAID, M. K; CARR, A. J. Differences in glutamate receptors and inflammatory cell numbers are associated with the resolution of pain in human rotator cuff tendinopathy. **Arthritis Research & Therapy** (2015) 17:176 DOI 10.1186/s13075-015-0691-5.

DEYAMA, S., SUGANO, Y., MORI, S., AMANO, T., YOSHIOKA, M., KANEDA, K., MINAMI, M., Activation of the NMDA receptor–neuronal nitric oxide synthase pathway within the ventral bed nucleus of the stria terminalis mediates the negative affective component of pain. **Neuropharmacology** (2017), doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.03.008.

DOBSON, J. L; MCMILLAN, J; LI, L. Benefits of exercise intervention in reducing neuropathic pain. **Frontiers in Cellular Neuroscience**. Vol 8, 2014. doi: 10.3389/fncel.2014.00102

DOCHEVA, D; MÜLLER, S. A; MAJEWSKI, M; EVANS, C. Biologics for tendon repair. **Advanced Drug Delivery Reviews**. (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2014.11.015>

DOCKING, S. I; ROSENGARTEN, S. D; DAFFY, J; COOK, J. Structural integrity is decreased in both Achilles tendons in people with unilateral Achilles tendinopathy. **Journal of Science and Medicine in Sport** 18 (2015) 383–387. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsams.2014.06.004>

DOCKING, S.; RIO, E.; FORTINGTON, L.; ORCHARD, J.; COOK, J. Prevalence and impact of achilles and patellar tendinopathy in the Australian Football League: The role of imaging in the diagnosis and prediction of symptoms. **Journal of science and medicine in sport**. Vol.20, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsams.2017.01.188>

DRAKE, R.; VOGL, W.; MITCHELL, A. W. M. **Gray's Anatomy for Students**. 2nd Edition. Churchill Livingstone, 2010.

FILHO, R. FLORA; ZILBERSTEIN B. Oxido Nitrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. **Metabolismo, síntese e funções**. **Rev Ass Med Bras**. 2000:265-271.

FISCH, A. **Neuroanatomy: Draw It to Know It**. Oxford, 2nd Edition. 2009.
FRANCESCHI F, PAPALIA R, PACIOTTI M, FRANCESCHETTI E, DI MARTINO A, MAFFULLI N, DENARO V. Obesity as a risk factor for tendinopathy: a systematic review. **Int J Endocrinol**. 2014:670262. Epub 2014 Aug 19, 2014.

FRANCHI, M; TRIRÈ, A; QUARANTA, M; ORSINI, E; OTTANI, V. Collagen Structure of Tendon Relates to Function. **The Scientific World Journal**, 7, 404–420, 2007.

FRANKLIN, S. L; DEAN, B. J. F; WHEWAY, K; WATKINS, B; JAVAID, M. K; CARR, A. J. Up-regulation of Glutamate in Painful Human Supraspinatus Tendon Tears. **Am J Sports Med** 2014. DOI: 10.1177/0363546514532754

FREDBERG, U. Tendinopathy-tendinitis or tendinosis? The question is still open. **Scan J Med Sci Sports**. 14;270-2, 2004

FREIRE, M.A.M; GUIMARÃES, J,S; GOMES-LEAL, W; PEREIRA, A. Pain modulation by nitric oxide in the spinal cord. **Frontiers in Neuroscience**. (2009) Vol 3. doi: 10.3389/neuro.01.024.2009

FUNAKOSHI H, FRISÉN J, BARBANY G, et al. Differential expression of mRNAs for neurotrophins and their receptors after axotomy of the sciatic nerve. **J Cell Biol**. 1993;123(2):455-465. doi:10.1083/jcb.123.2.455

GABEL GT. Acute and chronic tendinopathies at the elbow. **Curr Opin Rheumatol**. 1999.

GAJHEDE-KNUDSEN, M.; EKSTRAND, J.; MAGNUSSON, H.; MAFFULLI, N. Recurrence of Achilles tendon injuries in elite male football players is more common after early return to play: an 11-year follow-up of the UEFA Champions League injury study. **Br J Sports Med**. 2013 Aug;47(12):763-8. doi: 10.1136/bjsports-2013-092271.

GALDINO GS, XAVIER CH, ALMEIDA R, et al. The Nitric oxide/C GMP/KATP pathway mediates systemic and central antinociception induced by resistance exercise in rats. **Int J Neurosci**. 2014;125(10):765-773. doi:10.3109/00207454.2014.970256

GALLOWAY, M. T; LALLEY, A. L; SHEARN, J. T. The Role of Mechanical Loading in Tendon Development, Maintenance, Injury, and Repair. **J Bone Joint Surg Am**. 2013;95:1620-8. <http://dx.doi.org/10.2106/JBJS.L.01004>

GARRISON CJ, DOUGHERTY PM, KAJANDER KC, CARLTON SM. Staining of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in lumbar spinal cord increases following a sciatic nerve constriction injury. **Brain Res**. 1991;565(1):1-7. doi:10.1016/0006-8993(91)91729-K

GARTHWAITE, J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. **Trends Neurosci**. 1991,14, 60–67.

GIBBON, W W; COOPER, J R; RADCLIFFE, G S. Sonographic incidence of tendon microtears in athletes with chronic Achilles tendinoses. **Br J Sports Med**; 33:129–130, 1999.

GIBSON, W; ARENDT-NIELSEN, L; SESSLE, B. J; GRAVEN-NIELSEN, T. Glutamate and capsaicin-induced pain, hyperalgesia and modulatory interactions in human tendon tissue. **Exp Brain Res** (2009) 194:173–182. DOI 10.1007/s00221-008-1683-3.

GOSLINE, J.; LILLIE, M.; CARRINGTON, E.; GUERETTE, P.; ORTLEPP, C.; SAVAGE, K. Elastic proteins: biological roles and mechanical properties. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.** Feb 28;357(1418):121-32, 2002.

GREEN, LC; WAGNER, DA; GLOGOWSKI, J; SKIPPER, PL; WISHNOK, JS; TANNENBAUM, SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Analytical Biochem** 1982. 126(1) 131-138. Doi: 10.1016/0003-2697(82)90118-X

GÜHRING H, GÖRIG M, ATEŞ M, et al. Suppressed Injury-Induced Rise in Spinal Prostaglandin E 2 Production and Reduced Early Thermal Hyperalgesia in iNOS-Deficient Mice. **J Neurosci.** 2000;20(17):6714-6720. doi:10.1523/jneurosci.20-17-06714.2000

HE X, DISHMAN V. Spinal Motor Neuronal Degeneration After Knee Joint Immobilization in the Guinea Pig. **J Manipulative Physiol Ther.** 2010;33(5):328-337. doi:10.1016/j.jmpt.2010.05.001

HEALES, L.J; LIM, E.C.W; HODGES, P.W; VICENZINO, B. Sensory and motor deficits exist on the non-injured side of patients with unilateral tendon pain and disability—implications for central nervous system involvement: a systematic review with meta-analysis. **Br J Sports Med** 2014; 48:1400–1406. doi:10.1136/bjsports-2013-092535

HEINEMEIER, K. M. ; OLESEN, J. L. ; HADDAD, F; LANGBERG1, H; KJAER, M; BALDWIN, K. M; SCHJERLING, P. Expression of collagen and related growth factors in rat tendon and skeletal muscle in response to specific contraction types. **J Physiol** 582.3 (2007) pp 1303–1316.

HEINEMEIER, K. M; KJAER, M. *In vivo* investigation of tendon responses to mechanical loading. **J Musculoskelet Neuronal Interact** 2011; 11(2):115-123. HERVERA, A.; NEGRETE, R.; LEANEZ, S.; MARTIN-CAMPOS, J.M.; POL, O. The spinal cord expression of neuronal and inducible nitric oxide synthases and their contribution in the maintenance of neuropathic pain in mice. **PLoS ONE** 2010, 5, e14321.

HUISMAN, E; LU, A; MCCORMACK, R. G; SCOTT, A. Enhanced collagen type I synthesis by human tenocytes subjected to periodic in vitro mechanical stimulation. **BMC Musculoskeletal Disorders** 2014, 15:386

INQUIMBERT P, MOLL M, LATREMOLIERE A, et al. NMDA Receptor Activation Underlies the Loss of Spinal Dorsal Horn Neurons and the Transition to Persistent Pain after Peripheral Nerve Injury. **Cell Rep.** 2018; 23(9):2678-2689. doi:10.1016/j.celrep.2018.04.107

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa Nacional de Saúde 2013.** Rio de Janeiro: IBGE; 2013. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/pns/2013/>

JHINGAN, S; PERRY, M; O'DRISCOLL, G; LEWIN, C; TEATINO, R; MALLIARAS, P; MAFFULLI, M; MORRISSEY, D. Thicker Achilles tendons are a risk factor to develop Achilles tendinopathy in elite professional soccer players. **Muscles, Ligaments and Tendons Journal** 2011; 1 (2) 51-56.

JI, RU-RONG; XU, ZHEN-ZHONG; GAO Y-J. Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain. **Nat Rev Drug Discov**. 2014;100(2):130-134. doi:10.1016/j.pestbp.2011.02.012.Investigations

JÓZSA L, KANNUS P. Histopathological findings in spontaneous tendon ruptures. **Scand J Med Sci Sports**. Apr;7(2):113-8, 1997.

KANDEL, E.R., SCHWARTZ, J.H., JESSELL, T.M.; SIEGELBAUM, S. A.; HUDSPETH, A. J. **Princípios de neurociências**. 5. ed. Porto Alegre: AMGH, 2014.

KANNUS P. Structure of the tendon connective tissue. **Scand. J. Med. Sci. Sports** 10, 312–320, 2000.

KEILHOFF G, FANSA H, WOLF G. Neuronal NOS deficiency promotes apoptotic cell death of spinal cord neurons after peripheral nerve transection. **Nitric Oxide - Biol Chem**. 2004;10(2):101-111. doi:10.1016/j.niox.2004.03.008

KILLIAN, M.L; CAVINATTO, L; GALATZ, L. M; THOMOPOULOS. S. The role of mechanobiology in tendon healing. **J Shoulder Elbow Surg**. 2012 February ; 21(2): 228–237. doi:10.1016/j.jse.2011.11.002.

KOROL, R. M; FINLAY, H, M; JOSSEAU, M, J; LUCAS, A, R; CANHAM, P, B. Fluorescence spectroscopy and birefringence of molecular changes in maturing rat tail tendon. **Journal of Biomedical Optics** 12(2), 024011, 2007.

KRAYCHETE, D.C, GOZZANI, J.L, KRAYCHETE, A.C. Dor Neuropática – Aspectos Neuroquímicos. **Rev Bras Anestesiol**, 2008; 58: 5: 492-505.

KUO, C. K; PETERSEN, B. C; TUAN, R. S. Spatiotemporal protein distribution of TGF- β 's, their receptors, and extracellular matrix molecules during embryonic tendon development. **Dev Dyn**. 2008 May; 237(5): 1477–1489. doi:10.1002/dvdy.21547.

LAVAGNINO, M; ARNOCZKY, S. P; KEPICH, E; CABALLERO, E; HAUT, R. C. A finite element model predicts the mechanotransduction response of tendon cells to cyclic tensile loading. **Biomechan Model Mechanobiol**. 2008. DOI 10.1007/s10237-007-0104-z

LAVAGNINO, M; WALL, M. E; LITTLE, D; BANES, A. J; GUILAK, F; ARNOCZKY, S. P. Tendon Mechanobiology: Current Knowledge and Future Research Opportunities. **J Orthop Res**. 2015 June; 33(6): 813–822. doi:10.1002/jor.22871.

LEE J, RYU H, KOWALL NW. Differential regulation of neuronal and inducible nitric oxide synthase (NOS) in the spinal cord of mutant SOD1 (G93A) ALS mice.

Biochem Biophys Res Commun. 2009; 387(1):202-206.
doi:10.1016/j.bbrc.2009.07.007

LEVY, D; ZOCHODNE, D.W. NO Pain: Potential Roles of Nitric Oxide in Neuropathic Pain. **Pain Practice**, Volume 4, Issue 1, 2004 11–18

LEWIN, G. R; MENDELL, L. M. Nerve growth factor and nociception. **TINS**, Vol. 16, No. 9, 1993.

LIAN, Ø; DAHL, J; ACKERMANN, P. W; FRIHAGEN, F; ENGEBRETSEN, L; BAHN, R. Pronociceptive and Antinociceptive Neuromediators in Patellar Tendinopathy. **Am. J. Sports Med.** 2006; 34; 1801.
DOI:10.1177/0363546506289169

LIANG F, LIU M, FU X, ZHOU X, CHEN P, HAN F. Dexmedetomidine attenuates neuropathic pain in chronic constriction injury by suppressing NR2B, NF-κB, and iNOS activation. **Saudi Pharm J.** 2017;25(4):649-654.
doi:10.1016/j.jsps.2017.04.039

LIN, J; WANG, M.-X; WEI, A; ZHU, W; MURRELL, G. A. C. The cell specific temporal expression of nitric oxide synthase isoforms during Achilles tendon healing. **Inflamm. res.** 50 (2001b) 515–522.

LIN, J; WANG, M; WEI, A; ZHU, W; DIWAN, A; MURRELL, GA. Temporal expression of nitric oxide synthase isoforms in healing Achilles tendon. **J Orthop Res.** 19(1): 136-42, 2001.

LIU Y, ZHOU L-J, WANG J, et al. TNF-α Differentially Regulates Synaptic Plasticity in the Hippocampus and Spinal Cord by Microglia-Dependent Mechanisms after Peripheral Nerve Injury. **J Neurosci.** 2017;37(4):871-881.
doi:10.1523/jneurosci.2235-16.2016

LIU Z, MARTIN LJ. Motor neurons rapidly accumulate DNA single-strand breaks after in vitro exposure to nitric oxide and peroxynitrite and in vivo axotomy. **J Comp Neurol.** 2001; 432(1):35-60. doi:10.1002/cne.1087

LONGO UG, LOPPINI M, MARGIOTTI K, SALVATORE G, BERTON A, KHAN WS, MAFFULLI N, DENARO V. Unravelling the Genetic Susceptibility to Develop Ligament and Tendon Injuries. **Curr Stem Cell Res Ther**, 2014.

MACHADO, A. **Neuroanatomia Funcional**, 2ª Ed. São Paulo: Atheneu. 2004.

MACIEL, A. C. C; FERNANDES, M. B; MEDEIROS, L. S. Prevalência e fatores associados à sintomatologia dolorosa entre profissionais da indústria têxtil. **Rev Bras Epidemiol** 2006; 9(1): 94-102.

MAGNUSSON, S. P; LANGBERG, H; KJAER, M. The pathogenesis of tendinopathy: balancing the response to loading. **Nat. Rev. Rheumatol.** 6, 262–268 (2010) DOI: 10.1038/nrrheum.2010.43

MAGRA M, MAFFULLI N. Genetic aspects of tendinopathy. **J Sci Med Sport**. 2008.

MAIA, A. L. S; SAITO, C. A; OLIVEIRA, J. A.; BUSSACOS, M. A ; MAENO , M; LORENZI, R . L; SANTOS, S. A. Acidentes de trabalho no Brasil em 2013: comparação entre dados selecionados da Pesquisa Nacional de Saúde do IBGE (PNS) e do Anuário Estatístico da Previdência Social (AEPS) do Ministério da Previdência Social. **Fundacentro/Serviço de Estatística e Epidemiologia-SEE**, 2013

MELLER ST, PECHMAN PS, GEBHART GF, MAVES TJ (1992) Nitric oxide mediates the thermal hyperalgesia produced in a model of neuropathic pain in the rat. **Neuroscience** 50: 7–10.

MELLER, S.T.; GEBHART, G.F. Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. **Pain** 1993, 52, 127–136.

MESCHER, A. L. **Junqueira's Basic Histology Text & Atlas**. The McGraw-Hill Companies, 12Th ed. 2010.

MÖLLER, M; MOVIN, T; GRANHED, H; LIND, K; FAXÉN, E; KARLSSON, J. A prospective, randomised study of comparison between surgical and non-surgical treatment. **J Bone Joint Surg [Br]** 2001;83-B:843-8.

MOLLOY, T.J; WANG, Y; HORNER, A; SKERRY, T.M; MURRELL, G.A.C. Microarray Analysis of Healing Rat Achilles Tendon: Evidence for Glutamate Signaling Mechanisms and Embryonic Gene Expression in Healing Tendon Tissue. **J Orthop Res** 24:842–855, 2006. DOI 10.1002/jor.20093.

MONCADA, S; PALMER, R. M; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Reviews**, 43(2): 109-42, 1991. MORAES, A.S; OLIVEIRA, K.R.M; LÓPEZ, M.E.C; DINIZ, D.L.W; HERCULANO, A.M. Local NO synthase inhibition produces Histological and functional recovery in achilles tendon of rats after tenotomy. **Cell tissue Res**; 353.457-463, 2013.

MOS , M.D.; VAN EL, B; DEGROOT, J; JAHR, H; VAN SCHIE , H. T. M.; VAN ARKEL , E. R.; TOL, H; HEIJBOER, R; VAN OSCH, G. J. V. M.; VERHAAR, J. A. N.. Achilles Tendinosis Changes in Biochemical Composition and Collagen Turnover Rate. **The American Journal of Sports Medicine**, Vol. 35, No. 9, 2007

MOUSAVIZADEH, R; KHOSRAVI, S; BEHZAD, H; MCCORMACK, R.G; DURONIO, V; SCOTT A. Cyclic Strain Alters the Expression and Release of Angiogenic Factors by Human Tendon Cells. **PLoS ONE** 2014; 9(5): e97356. doi:10.1371/journal.pone.0097356

MUROFUSE, N.T; MARZIALE, M.H.P. Mudanças no trabalho e na vida de bancários portadores de lesões por esforços repetitivos: LER. **Rev Latino-am Enfermagem** 2001 julho; 9(4):19-25.

MURREL, G. A. C. Oxygen free radicals and tendon healing. **J Shoulder Elbow Surg** 2007a; 16:208S-214S. doi:10.1016/j.jse.2007.03.007.

MURREL, G. A. C. Using nitric oxide to treat tendinopathy. **Br J Sports Med** 2007b; 41:227–231. doi: 10.1136/bjism.2006.034447

MURRELL GAC, LILLY EG, COLLINS A, SEABER A V., GOLDNER RD, BEST TM. Achilles Tendon Injuries: A Comparison of Surgical Repair Versus No Repair in a Rat Model. **Foot Ankle.** 1993;14(7):400-406. doi:10.1177/107110079301400706

MURRELL, G. A. C; SZABO, C; HANNAFIN, J. A; JANG, D; DOLAN, M. M; DENG, X. –H; MURRELL, D. F; WARREN, R. F. Modulation of tendon healing by nitric oxide. **Inflamm. res.** 46: (1997) 19–27.

MURRELL, G.A.C; TANG, D.G; APPELYARD, R.C; DEL SOLDATO, P; WANG, M. Addition of nitric oxide through nitric oxide-paracetamol enhances healing rat Achilles tendon. **Clin Orthop Relat Res** 466: 1618–24, 2008. doi: 10.1007/s11999-008-0271-y

NAIK, A. K; TANDAN, S. K; KUMAR, D; DUDHGAONKAR, S. P. Nitric oxide and its modulators in chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats. **European Journal of Pharmacology** 530 (2006) 59–69. doi:10.1016/j.ejphar.2005.11.029.

NATHAN, C; XIE, Q.W. (1994) Regulation of biosynthesis of nitric oxide. **J Biol Chem** 269: 13725–13728

NAZERI M, RAZAVINASAB M, ABAREGHI F, SHABANI M. Role of nitric oxide in altered nociception and memory following chronic stress. **Physiol Behav.** 2014; 129:214-220. doi:10.1016/j.physbeh.2014.02.054.

NEVIASER, A; ANDARAWIS-PURI, N; FLATOW, E. Basic mechanisms of tendon fatigue damage. **J Shoulder Elbow Surg** (2012) 21, 158-163. doi:10.1016/j.jse.2011.11.014.

NICHOLS, S.P; STORM, W.L; KOH, A; SCHOENFISCH, M.K. Local delivery of nitric oxide: targeted delivery of therapeutics to bone and connective tissues. **Adv Drug Deliv Rev.** 2012 September; 64(12): 1177–1188. doi:10.1016/j.addr.2012.03.002.

O'BRIEN M. Structure and metabolism of tendons. **Scand J Med Sci Sports** 7: 55-61, 1997.

O'BRIEN, E. J. O; SMITH, R. K. W. Science in brief: The likely role of the central nervous system in bilateral tendinopathy and tendon healing. **Equine Veterinary Journal** 45 (2013) 401–402. DOI: 10.1111/evj.12064.

OBATA H, SAKURAZAWA S, KIMURA M, SAITO S. Activation of astrocytes in the spinal cord contributes to the development of bilateral allodynia after

peripheral nerve injury in rats. **Brain Res.** 2010;1363:72-80. doi:10.1016/j.brainres.2010.09.105

ÖHBERG L, LORENTZON R, ALFREDSON H. Neovascularisation in Achilles tendons with painful tendinosis but not in normal tendons: an ultrasound investigation. **Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.** 2001.

ÖHBERG, L.; ALFREDSON, H. (2002) Ultrasound guided sclerosis of neovessels in painful chronic Achilles tendinosis: pilot study of a new treatment. **Br J Sports Med** 36:173–177

OLIVEIRA, R. R; BEZERRA, M. A; LIRA, K. D. S; NOVAES, K. A; TEIXEIRA, M. F. H. B. I; CHAVES, C. C et al. Aerobic physical training restores biomechanical properties of Achilles tendon in rats chemically induced to diabetes mellitus. **Journal of Diabetes and Its Complications** (2012). doi:10.1016/j.jdiacomp.2012.03.017.

PARK, C-H, KRISHNA, G; AHN, M-S; KANG, J-H; CHUNG, H-G; KIM, D-J et al. Differential and Constitutive Expression of Neuronal, Inducible, and Endothelial Nitric Oxide Synthase mRNAs and Proteins in Pathologically Normal Human Tissues. **NITRIC OXIDE: Biology and Chemistry.** Vol. 4, No. 5, pp. 459–471 (2000) doi:10.1006/niox.2000.0300.

PENG J, GU N, ZHOU L, et al. Microglia and monocytes synergistically promote the transition from acute to chronic pain after nerve injury. **Nat Commun.** 2016;7(May):1-13. doi:10.1038/ncomms12029

PEZET, S; McMAHON, S.B. Neurotrophins: Mediators and Modulators of Pain. **Annu. Rev. Neurosci.** 2006. 29:507–38. DOI:10.1146/annurev.neuro.29.051605.112929

PICOLOTO, D; SILVEIRA, E. Prevalência de sintomas osteomusculares e fatores associados em trabalhadores de uma indústria metalúrgica de Canoas – RS. **Ciência & Saúde Coletiva**, 13(2):507-516, 2008.

PIEPER, M. J; FLOR, P. J; DINAN, T. G; CRYAN, J. F. Exciting Times beyond the Brain: Metabotropic Glutamate Receptors in Peripheral and Non-Neural Tissues. **Pharmacol Rev** 63:35–58, 2011. doi:10.1124/pr.110.004036.

POLGAR E.; HUGHES D. I, ARHAM, A.Z, TODD, A.J. Loss of Neurons from Laminas I-III of the Spinal Dorsal Horn Is Not Required for Development of Tactile Allodynia in the Spared Nerve Injury Model of Neuropathic Pain. **J Neurosci.** 2005;25(28):6658-6666. doi:10.1523/jneurosci.1490-05.2005

PROVENZANO, P.P; VANDERBY, R. Collagen fibril morphology and organization: Implications for force transmission in ligament and tendon. **Matrix Biology** 25 (2006) 71 – 84. doi:10.1016/j.matbio.2005.09.005

QIAN C, TAN D, WANG X, et al. Peripheral Nerve Injury-Induced Astrocyte Activation in Spinal Ventral Horn Contributes to Nerve Regeneration. **Neural Plast.** 2018;2018:1-8. doi:10.1155/2018/8561704

REES, J, D; MAFFULLI, N; COOK, J. Management of Tendinopathy. **Am J Sports Med** 37: 1855, 2009

REES, J. D.; WILSON, A. M.; WOLMAN, R. L. Current concepts in the management of tendon disorders. **Rheumatology**; 45:508–521, 2006. **Rheumatology**. 43: 131–142, 2004.

RILEY, G, P; CURRY, V; DEGROOT, J; VAN EL, B; VERZIJL, N; HAZLEMAN, B, L.; BANK, R, A. Matrix metalloproteinase activities and their relationship with collagen remodelling in tendon pathology. **Matrix Biology** 21 185–195, 2002.

RILEY, G. Tendinopathy – from basic science to treatment. **Nature clinical practice rheumatology**, vol 4 no 2, 2008.

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

SAITO S, KIDD GJ, TRAPP BD, et al. Rat spinal cord neurons contain nitric oxide synthase. **Neuroscience**. 1994; 59(2):447-456. doi:10.1016/0306-4522(94)90608-4

SAMIRIC, T; PARKINSON; ILIC, M, Z.; COOK, J; FELLER , J. A.; HANDLEY, C, J.. Changes in the composition of the extracellular matrix in patellar tendinopathy. **Matrix Biology** 28 230–236, 2009.

SCHÄFERS M, SVENSSON CI, SOMMER C, SORKIN LS. Tumor Necrosis Factor- α Induces Mechanical Allodynia after Spinal Nerve Ligation by Activation of p38 MAPK in Primary Sensory Neurons. **J Neurosci**. 2003;23(7):2517-2521. doi:10.1523/jneurosci.23-07-02517.2003

SCHILD, C; TRUEB, B. Mechanical Stress Is Required for High-Level Expression of Connective Tissue Growth Factor. **Experimental Cell Research** 274, 83–91 (2002) doi:10.1006/excr.2001.5458.

SCHIZAS, N; LIAN, Ø; FRIHAGEN, F; ENGBRETSSEN, L; BAHR, R; ACKERMANN, P. W. Coexistence of up-regulated NMDA receptor 1 and glutamate on nerves, vessels and transformed tenocytes in tendinopathy. **Scand J Med Sci Sports** 2010; 20: 208–215 doi: 10.1111/j.1600-0838.2009.00913.x

SCHIZAS, N; WEISS, R; LIAN, Ø; FRIHAGEN, F; BAHR, R; ACKERMANN, P. W. Glutamate Receptors in Tendinopathic Patients. **J Orthop Res** 30:1447–1452, 2012. doi 10.1002/jor.22094.

SCHMIDTKO A, TEGEDER I, GEISSLINGER G. No NO, no pain? The role of nitric oxide and cGMP in spinal pain processing. **Trends Neurosci**. 2009;32(6):339-346. doi:10.1016/j.tins.2009.01.010

SCHOLZ J. et al. Blocking Caspase Activity Prevents Transsynaptic Neuronal Apoptosis and the Loss of Inhibition in Lamina II of the Dorsal Horn after Peripheral Nerve Injury. **J Neurosci.** 2005;25(32):7317-7323. doi:10.1523/jneurosci.1526-05.2005

SCHUBERT, T. E, WEIDLER C, LERCH K, HOFSTADTER F, STRAUB R. H. Achilles tendinosis is associated with sprouting of substance P positive nerve fibres. **Ann Rheum Dis.** 2005;64:1083–1086.

SCOTT A, DOCKING S, VICENZINO B, ALFREDSON, H; ZWERVER, J; LUNDGREEN, K et al. Sports and exercise-related tendinopathies: a review of selected topical issues by participants of the second International Scientific Tendinopathy Symposium (ISTS) Vancouver 2012. **Br J Sports Med** 2013; 00:1–12. doi:10.1136/bjsports-2013-092329.

SCOTT, A. COOK, J. L.; HART, D. A.; WALKER, D. C.; DURONIO, V.; KHAN, K, M. Tenocyte Responses to Mechanical Loading In Vivo – A Role for Local Insulin-Like Growth Factor 1 Signaling in Early Tendinosis in Rats. **Arthritis & Rheumatism.** Vol. 56, No. 3, 2007.

SCOTT, A; COOK, J. L; HART, D. A; WALKER, D.C; DURONIO, V; KHAN, K.M. Tenocyte Responses to Mechanical Loading In Vivo. A Role for Local Insulin-Like Growth Factor 1 Signaling in Early Tendinosis in Rats. **ARTHRITIS & RHEUMATISM** Vol. 56, No. 3, March 2007, pp 871–881. Doi: 0.1002/art.22446

SHAMS Z, KHALATBARY AR, AHMADVAND H, ZARE Z, KIAN K. Neuroprotective effects of hyperbaric oxygen (HBO) therapy on neuronal death induced by sciatic nerve transection in rat. **BMC Neurol.** 2017;17(1):1-10. doi:10.1186/s12883-017-1004-1

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

SHENKER, N; HAIGH, R; ROBERTS, E; MAPP, P; HARRIS, N; BLAKE, D. A review of contralateral responses to a unilateral inflammatory lesion. **Rheumatology** (2003); 42:1279–1286. doi:10.1093/rheumatology/keg397.

SILVER, F.H; FREEMAN, J.W; SEEHRA, G.P. Collagen self-assembly and the development of tendon mechanical properties. **Journal of Biomechanics** 36 (2003) 1529–1553. doi:10.1016/S0021-9290(03)00135-0.

SOMINSKY L, DE LUCA S, SPENCER SJ. Microglia: Key players in neurodevelopment and neuronal plasticity. **Int J Biochem Cell Biol.** 2018;94(September 2017):56-60. doi:10.1016/j.biocel.2017.11.012

SOMMER C, Leinders M, Üçeyler N. Inflammation in the pathophysiology of neuropathic pain. **Pain.** 2018;159(3):595-602. doi:10.1097/j.pain.0000000000001122

SVEDMAN S, JUTHBERG R, EDMAN G, ACKERMANN PW. Reduced Time to Surgery Improves Patient-Reported Outcome After Achilles Tendon Rupture. **Am J Sports Med.** 2018;46(12):2929-2934. doi:10.1177/0363546518793655

TAO F, TAO YX, MAO P, et al. Intact carrageenan-induced thermal hyperalgesia in mice lacking inducible nitric oxide synthase. **Neuroscience.** 2003;120(3):847-854. doi:10.1016/S0306-4522(03)00362-2

THORPE, C, T; BIRCH, H. L; Clegg, P. D; SCREEN , H. R.C. The role of the non-collagenous matrix in tendon function. **Int. J. Exp. Path.** 94, 248–259, 2013.

TOMIOSSO, T. C; NAKAGAKI, W.R; GOMES, L; HYSLOP, S; PIMENTEL, E.R. Organization of collagen bundles during tendon healing in rats treated with L-NAME. **Cell Tissue Res** 2009. 337(2): 235-42. doi: 10.1007/s00441-009-0819-5

TORTORA, G; DERRICKSON, B. **Principles of Anatomy and Physiology.** Wiley, 13th Ed., 2012.

TSUDA M. Microglia in the spinal cord and neuropathic pain. **J Diabetes Investig.** 2016;7(1):17-26. doi:10.1111/jdi.12379

TSUJINO H, KONDO E, FUKUOKA T, et al. Activating transcription factor 3 (ATF3) induction by axotomy in sensory and motoneurons: A novel neuronal marker of nerve injury. **Mol Cell Neurosci.** 2000;15(2):170-182. doi:10.1006/mcne.1999.0814

VIDAL, B. C. Image analysis of tendon helical superstructure using interference and polarized light microscopy. **Micron** 34 423–432, 2003.

WAKISAKA S, KAJANDER KC, BENNETT GJ. Increased neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity in rat sensory neurons following peripheral axotomy. **Neurosci Lett.** 1991;124(2):200-203. doi:10.1016/0304-3940(91)90093-9

WALL, M.E; BANES, A.J. Early responses to mechanical load in tendon: Role for calcium signaling, gap junctions and intercellular communication. **J Musculoskelet Neuronal Interact** 2005; 5(1):70-84.

WU W, LI L, YICK L, CHAI H, XIE Y. Spinal Root Avulsion in Adult Rats. **J Neurotrauma.** 2003;20(6):603-612.

WU W, LI L. Inhibition of nitric oxide synthase reduces motoneuron death due to spinal root avulsion. **Neurosci Lett.** 1993;153(2):121-124. doi:10.1016/0304-3940(93)90303-3

WU W. Expression of nitric-oxide synthase (NOS) in injured CNS neurons as shown by NADPH diaphorase histochemistry. **Exp Neurol.** 1993;120(2):153-159. doi:10.1006/exnr.1993.1050

WU WP, HAO JX, ONGINI E, et al. A nitric oxide (NO)-releasing derivative of gabapentin, NCX 8001, alleviates neuropathic pain-like behavior after spinal cord

and peripheral nerve injury. **Br J Pharmacol.** 2004; 141(1):65-74. doi:10.1038/sj.bjp.0705596

XIA, W; SZOMOR, Z; WANG, Y; MURRELL, G.A.C. Nitric Oxide Enhances Collagen Synthesis in Cultured Human Tendon Cells. *J Orthop Res* 24:159–172, 2006. Doi: 10.1002/jor.20060.

XU D, OMURA T, MASAKI N, et al. Increased arachidonic acid-containing phosphatidylcholine is associated with reactive microglia and astrocytes in the spinal cord after peripheral nerve injury. **Sci Rep.** 2016;6(May):1-11. doi:10.1038/srep26427

XU, Y; MURRELL, GAC. The basic science of tendinopathy. **Clin Orthop Relat Res.** 466: 1528–1538, 2008.

YANG QO, YANG WJ, LI J, LIU FT, YUAN H, OU YANG YP. Ryk receptors on unmyelinated nerve fibers mediate excitatory synaptic transmission and CCL2 release during neuropathic pain induced by peripheral nerve injury. **Mol Pain.** 2017;13:1-14. doi:10.1177/1744806917709372

YOWTAK, JUNE; WANG, JIGONG; KIM, LIN, HEE YOUNG; LU, YING; CHUNG, KYUNGSOON; CHUNG JM. Effect of antioxidant treatment on spinal GABA neurons in a neuropathic pain model in the mouse. **Pain** 2013;100(2):130-134. doi:10.1016/j.pestbp.2011.02.012.Investigations

YU WHA. Spatial and temporal correlation of nitric oxide synthase expression with CuZn-superoxide dismutase reduction in motor neurons following axotomy. **Ann N Y Acad Sci.** 2002; 962:111-121. doi:10.1111/j.1749-6632.2002.tb04061.x

ZEMKE, DANIEL; MAJID A. The potential of minocycline for neuroprotection in human neurologic disease. **Clin Neuropharmacol.** 2004;27(6):293-298. doi.org/10.1097/01.wnf.0000150867.98887.3e.

ZHAO H, LIU S, WANG C, WANG Q, LIU W, GONG M. Contralateral monoarthritis exacerbated chronic constriction injury-induced pain hypersensitivity through upregulating inducible nitric oxide synthase. **J Pain Res.** 2018;11:1433-1443. doi:10.2147/JPR.S166994

8. ANEXO (comitê de ética)



UFPA
Universidade Federal do Pará

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto Intitulado "UTILIZAÇÃO DO IMPLANTE DE POLÍMERO SATURADO COM ÁCIDO ASCÓRBICO NO TRATAMENTO DE LESÃO TENDÍNEA EXPERIMENTAL", protocolado sob o CEUA nº 2066070716, sob a responsabilidade de Karen Renata Heroulano Matos Oliveira e equipe; Martha Costa De Souza; Diego Rodrigues De Paula - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Pará (CEUA/UFPA) em reunião de 03/11/2016.

We certify that the proposal "Saturated Polymere Implant with ascorbic acid in the treatment of experimental tendon injury", utilizing 64 Heterogenics rats (64 males), protocol number CEUA 2066070716, under the responsibility of Karen Renata Heroulano Matos Oliveira and team; Martha Costa De Souza; Diego Rodrigues De Paula - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - It's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was approved by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Para (CEUA/UFPA) in the meeting of 11/03/2016.

Vigência da Proposta: de 06/2016 a 12/2019

Área: Laboratório De Neurofarmacologia Experimental

Procedência: Biotério do Laboratório de Neurofarmacologia experimental

Espécie: Ratos heterogênicos

Gênero: Machos

Idade: 4 a 4 meses N: 64

Linhagem: wistar

Peso: 250 a 300 g

Resumo: O efeito de antioxidantes sobre o reparo de tendinopatias é pouco reportado na literatura. O ácido ascórbico (AA) é uma substância que apresenta propriedades antioxidantes com eficiência comprovada em diversos tratamentos, dessa forma, o presente estudo tem como objetivo avaliar os efeitos do tratamento local dessa substância no reparo do tendão de ratos. Para esta pesquisa empregaremos um modelo experimental de ruptura total do tendão de Aquiles direito dos ratos. Os animais serão divididos em quatro grupos: Injúria+AA (30mM); Injúria+veículo (NaCl 0,9%); Injúria e grupo Controle, que não sofrerá a injúria. Todos os tratamentos serão realizados por implante de uma membrana de etileno-vinil-acetato previamente saturada com as devidas substâncias e aplicada diretamente no tendão calcâneo lesionado. Avaliaremos a marcha dos animais pelo Índice funcional de Aquiles (IFA) nos dias 7(n=40), 14(n=40) e 28(n=40). A estrutura do tecido do tendão será avaliada por autofluorescência do colágeno e a organização tecidual por coloração HE, ambos em 3, 7, 14 e 28 dias pós-lesão (n=5). Por fim, avaliaremos a expressão de macrófagos por imuno fluorescência no 3º(n=5), 7º(n=5), 14º(n=5) e 28º(n=5) dia pós-lesão. Ao elencar esse antioxidante administrado através de um implante de membrana, a presente pesquisa pretende contribuir na busca por alternativas que contribuam para a recuperação de tendinopatias.

Belém do Pará, 08 de novembro de 2016

Prof. Dr. Moisés Hamoy
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Pará