



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

**SUELLEN ALESSANDRA SOARES DE MORAES**

**REGENERAÇÃO TENDÍNEA EM MODELO MURINO: ESTUDO DA**  
**PLASTICIDADE CENTRAL E INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DA MODULAÇÃO**  
**NITRÉRGICA NA PLASTICIDADE PERIFÉRICA**

**Belém**

**2015**

SUELLEN ALESSANDRA SOARES DE MORAES

**REGENERAÇÃO TENDÍNEA EM MODELO MURINO: ESTUDO DA  
PLASTICIDADE CENTRAL E INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DA MODULAÇÃO  
NITRÉRGICA NA PLASTICIDADE PERIFÉRICA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular (Área de Concentração: Neurociências), do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de Doutor em Neurociências.

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

**Belém**

**2015**

Dados Internacionais da Catalogação-na-Publicação (CIP)

Biblioteca de Pós-Graduação do ICB-UFPA – Belém (PA)

---

Moraes, Suellen Alessandra Soares de

Regeneração tendínea em modelo murino: estudo da plasticidade central e investigação do efeito da modulação nitrérgica na plasticidade periférica / Suellen Alessandra Soares de Moraes; orientador, Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva. – 2015.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2015.

1. Tendão de Aquiles. 2. Tendão de Aquiles – Ferimentos e lesões - Tratamento. 4. Tendão de Aquiles – Regeneração. 5. Tenotomia. I. Título.

CDD – 22. ed. 717.475

---

SUELLEN ALESSANDRA SOARES DE MORAES

**REGENERAÇÃO TENDÍNEA EM MODELO MURINO: ESTUDO DA  
PLASTICIDADE CENTRAL E INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DA MODULAÇÃO  
NITRÉRGICA NA PLASTICIDADE PERIFÉRICA**

Tese de Doutorado apresentada 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 título de Doutor em Neurociências e Biologia Celular – área de concentração Neurociências.

Belém, 10 de Agosto de 2015.

---

**Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva – Orientador**

ICB - Universidade Federal do Pará

---

**Prof. Dr. Josafá Gonçalves Barreto – 1º Avaliador**

Campus Castanhal - Universidade Federal do Pará

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr. Carlomagno Pacheco Bahia – 2º Avaliador**

ICB - Universidade Federal do Pará

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr. Givago Da Silva Souza – 3º Avaliador**

ICB - Universidade Federal do Pará

---

**Prof. Dr. Evander de Jesus Batista – Suplente**

NMT/ICB – Universidade Federal do Pará

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Neurofarmacologia Experimental (LNE) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará sob orientação do Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva e no Laboratório de Biologia de Ultraestrutura de Procariotos (LABUP) do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes sob supervisão do Prof. Dr. Ulysses Garcia Casado Lins. A realização da pesquisa contou com o apoio das seguintes instituições de fomento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) e Fundação Amazônia Paraense de Amparo a Pesquisa.

Aos meus pais Ibraim Moraes e Maria LÍbia de Moraes pelo incentivo aos estudos, compreensão, apoio, paciência e amparo, sempre.

## AGRADECIMENTOS

Temos mais de cinco anos de convivência, dentre os quais passamos momentos difíceis e compartilhamos muitas alegrias e pizzas. Ele me proporcionou uma oportunidade única de adentrar e conhecer profundamente a ciência e o mundo do qual as pessoas que vivem dela fazem parte. Uma pessoa indelével que contribuiu imensamente na construção e evolução da minha vida acadêmica e científica. O **Anderson Manoel Herculano** passará de orientador a amigo, e tenho certeza que muitas colaborações e artigos ainda publicaremos na área da lesão tendínea. Muitíssimo obrigado pelos conselhos, atenção, apoio, ideias e por me transferir parte dessa sede incontrolável de questionar e tentar elaborar perguntas ou explicações para fenômenos observados em análises de dados de um simples seminário.

Agradeço também aos doutores que compõem a banca por terem aceitado tão gentilmente o convite para dela participar. Por isso, muito obrigada Dr. **Josafá Gonçalves Barreto**, Dr. **Carlomagno Pacheco Bahia** e Dr. **Givago da Silva Souza**.

Uma vez dentro do dia-a-dia da pesquisa na academia, diversas pessoas foram se tornando amigos e colaboradores. Aos amigos de LNE agradeço todos os favores, apoio e cuidados, em especial da **Martha, Dlánio, Hellen, Diego, Analú** e as pessoas que por mais tempo me acompanharam nessa trajetória, a **Tarcyane** e **Adriene**. Muitos galhos quebrados já salvaram experimentos e até qualificação da tese, por isso agradeço imensamente a todos do LNE: **Bruna, Luana, Dani, Tatiana, Lizandra, Nadime, Nayara, Ana Paula, Lucas, a Profª. Drª. Karen** e imensamente ao **Prof. Dr. Evander**. Não posso deixar de agradecer as meninas **Celice Cordeiro** e **Rosana Lopes**, que são uns amores e me ensinaram a dissecar a medula e realizar a perfusão em ratos, bem como o **Ijair Rogério**, que ajudou muito concedendo espaço em seu laboratório para que eu realizasse as perfusões.

Agradeço também ao imenso acolhimento que tive no Rio de Janeiro em 2014, onde realizei parte dos experimentos no laboratório de Biologia de Ultraestrutura de Procariotos. Lá conheci pessoas maravilhosas e o mundo das bactérias magnéticas. Agradeço a **Dani, Lia, Ana, Pedro, Jefferson, Clarissa, Fernanda, Sidney, Marlon, Beatriz** e ao professor **Dr. Ulysses Lins** pela enorme contribuição com a microscopia eletrônica, me deixando até cortar material no ultramicrotomo com navalha de diamante (tudo bem que tinha uns dentes, rs).

Gostaria muito de agradecer ao Laboratório de Biologia Estrutural de Vírus (LABEV), na figura do **Dr. André Gomes**, onde as imagens de microscopia confocal foram realizadas, ao Laboratório de Neurogênese, na figura do técnico **José Nilson**, onde boa parte dos cortes de medula foi realizada e ao técnico **Hélcio** e a Prof. **Dra. Rossiane Vommaro**, ambos do Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer pela ajuda com os animais.

A minha família é sem dúvida a melhor do mundo. Não pode haver melhor! Acredito no amor e na união da família para que a vida das pessoas faça sentido e tenha um objetivo bem delineado. Nesse quesito a minha me tornou certamente uma pessoa feliz e cheia de metas, e sempre recebi total apoio para cada decisão tomada. Por isso agradeço aos meus queridos irmãos, **Fernando, Ibraim, Gilmar e Alexandre** *in memoriam* e as minhas lindas irmãs, **Solange, Suane e Sônia**. Aos meus queridos e amados pais **Maria Líbia Soares de Moraes** e **Ibraim José Barbosa Soares de Moraes**. Sem contar, é claro, com os 18 sobrinhos, dos quais com um em especial (pelo motivo de estudar na mesma instituição onde pesquiso) pude contar com diversos favores, não é mesmo **Thais Sousa**, futura odontóloga e representante dos sobrinhos nos agradecimentos da tese. A todos vocês, muito obrigada por nem sequer medirem esforços para me ajudar e apoiar sempre. Obrigada pela família que tenho.

Agora é chegado o momento mais especial dos agradecimentos, pois se não fosse essa tese aqui, não o conheceria e nem estaria noiva dele. Graças a uma paixão que compartilhamos em comum, dentre várias outras que descobrimos depois, a ciência traçou caminhos para que nos conhecêssemos em um Simpósio de Microscopia de Fluorescência em Buenos Aires. Ele carioca e eu paraense trocamos facebook e depois de um pouco mais de um ano começamos a namorar a distância por um longo período. Hoje, noivos e dividindo um apê onde toda essa tese foi escrita arduamente, só tenho a agradecer por cuidar tão carinhosamente de mim. Obrigada por TODO o apoio e ajuda **Dr. Carlos Marques**.

Por fim, a contribuição sem a qual este trabalho não aconteceria, o apoio financeiro e estrutural da **CAPES, CNPQ, FAPESPA, UFPA, UFRJ e PPNBC**. A cada um também devo enorme gratidão.



“Era homem como os outros; outros Aquiles andam por aí e são da cabeça aos pés um imenso calcanhar”

*Machado de Assis*

## RESUMO

As lesões tendíneas causam forte impacto sobre as pessoas em decorrência da dor e limitação funcional dela resultante. Após a lesão, o tecido passa a apresentar uma rede de nervos. Adicionalmente, há indícios da ocorrência de plasticidade central na medula após a lesão. Dentre os fatores moleculares envolvidos no reparo da lesão, o óxido nítrico (NO) é implicado na remodelagem tecidual, contudo seus efeitos ainda não são bem compreendidos. A proposta deste estudo é averiguar a existência de plasticidade central e a influência do NO na plasticidade periférica, limitação funcional e regeneração tendínea em modelo murino. Para estudar os efeitos do NO na plasticidade periférica, utilizamos animais controle (CTRL, sem lesão) ou tratados com salina (SAL, NaCl 0,9%), L-nitro-arginina-metil-éster (L-NAME, inibidor da síntese de NO) ou nitroprussiato de sódio (SNP, doador de NO) em dias alternados até o 21º dia pós-lesão (DPL). Para avaliar a ocorrência de plasticidade central (segmento L5), apenas a lesão foi realizada e a medula coletada em 2 ou 21 DPL. Analisamos a integridade e a organização tecidual nas amostras de tendão por H&E, microscopia eletrônica de transmissão e imunofluorescência, que também foi usada para avaliar a plasticidade periférica. Para verificar a recuperação funcional do tendão, determinamos o índice funcional de Aquiles, o ângulo articular e o campo aberto. No estudo da medula espinhal, investigamos a reatividade glial e o envolvimento neuronal após a injúria através de colocalizações com o indicador de ativação celular c-Fos. Os achados desta pesquisa mostram que a inibição do NO promove a organização tecidual em associação ao aumento da síntese, secreção e deposição de colágeno. Além disso, a administração local de L-NAME parece favorecer a diferenciação celular para tipos morfológicos análogos a tenócitos e melhorar a organização de ramos nervosos por dentro a malha de colágeno em correlação com a recuperação funcional em 21 DPL. Por outro lado, o aumento nos níveis de NO através de SNP promoveu uma piora em quase todos os parâmetros analisados. Nossos dados mostram ainda que a injúria tendínea desencadeia um processo de plasticidade central com aumento da reatividade glial em 2 DPL e da ativação celular ipsilateral à lesão em 2 e 21 DPL. Em suma, nossos achados indicam a ocorrência de plasticidade central após a lesão tendínea e o favorecimento do reparo tecidual e da plasticidade periférica através do bloqueio nitrérgico, revelando aspectos fundamentais da recuperação tecidual que podem representar novos alvos para uma nova abordagem terapêutica em lesões tendíneas.

**Palavras-chaves:** lesão tendínea, óxido nítrico, plasticidade neural, tendão de Aquiles.

## ABSTRACT

Tendon injuries cause strong impact on people due to pain and functional limitation resulting therefrom. After injury, the tissue starts to present a network of nerves. Furthermore, there is evidence for the occurrence of central plasticity after injury. Among the molecular factors involved in injury repair, nitric oxide (NO) is implicated in tissue remodeling, but its effects are not yet well understood. The purpose of this study is to ascertain the existence of central plasticity and the influence of NO in peripheral plasticity, functional limitation and tendon regeneration in murine model. To study the effects of NO in peripheral plasticity, we used control animals (CTRL, without injury) or animals treated with saline (SAL, 0.9% NaCl), L-nitro-arginine-methyl-ester (L-NAME, NO-synthesis inhibitor) and sodium nitroprusside (SNP, NO donor) every other day until the 21st day post injury (DPI). To evaluate central plasticity (L5 segment), an injury was performed alone and the spinal cord collected at 2 or 21 DPI. We analyzed the integrity and tissue organization in tendon samples by H&E, transmission electron microscopy and immunofluorescence, which was also used to evaluate peripheral plasticity. To assess tendon functional recovery, we determined the Achilles functional index, the joint angle and the open field. In spinal cord studies, we investigated glial reactivity and neuron involvement after injury by co-localizations with the cell activation indicator c-Fos. The findings of this research show that NO inhibition promotes tissue organization in association to an increase in collagen synthesis, secretion and deposition. Besides, L-NAME local administration seems to favor cell differentiation to tenocyte-like morphological types and improve the organization of nerve branches in between the collagen mesh in correlation with functional recovery at 21 DPI. On the other hand, increased levels of NO by SNP promoted worsening in almost all parameters analyzed. Our data also show tendon injury triggers a central plasticity process with an increase in glial reactivity at 2 DPI and ipsilateral cell activation at 2 and 21 DPI. Afterall, our findings point out occurrence of central plasticity after tendon injury and favoring of tissue repair and peripheral plasticity through nitrergic blockage, unraveling fundamental aspects of tissue recovery that may represent new targets for a therapeutical approach in tendon injuries.

**Keywords:** Achilles tendon, neural plasticity, nitric oxide, tendon injury.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BSA – Albumina sérica bovina

c-Fos – Fos celular (marcador da proteína produto de *c-fos*, gene de ativação imediata após estímulo nervoso)

CGRP – Proteína relacionada ao Gene da calcitonina

COL1A1 – Cadeia alfa 1 do colágeno tipo I

DAPI - 4'6-diamino-2-fenilindol

DORT - Distúrbios Osteomusculares Relacionados ao Trabalho

DPL – Dia (s) pós-lesão

GFAP – Proteína glial fibrilar ácida

H&E – Hematoxilina e Eosina

IFA – Índice funcional de Aquiles

INSS - Instituto Nacional de Seguridade Social

ITF - Fator teste intermediário

L5 – Segmento lombar 5

MMP - Metaloproteases de matriz

NF200 – Neurofilamento 200

NO – Óxido nítrico

NOS – Oxido nítrico sintase

PBS – Tampão fosfato salina

PFA - Paraformaldeído

PFL - Fator de comprimento da pegada

SNC - Sistema nervoso central

SP - Substância P

TCS – Tampão cacodilato de sódio

TF – Tampão fosfato

TIMP – Inibidor tecidual de metaloprotease

TSF - Fator de espalhamento dos dedos do pé

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	17
1.1	ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E FISIOPATOLÓGICOS DA LESÃO TENDÍNEA	17
1.2	ALTERAÇÕES NA ORGANIZAÇÃO, INERVAÇÃO E VASCULARIZAÇÃO DO TENDÃO	20
1.3	PLASTICIDADE NEURAL NA TENDINOPATIA	21
1.3.1	Ativação central decorrente de lesões periféricas: a resposta medular	23
1.4	DOR E LIMITAÇÃO FUNCIONAL NA TENDINOPATIA	24
1.5	ÓXIDO NÍTRICO NO REPARO TENDÍNEO	26
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	29
2.1	OBJETIVO GERAL	29
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	31
3.1	ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS	31
3.2	PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	31
3.3	PESAGEM DOS ANIMAIS	33
3.4	MICROTOMIA	33
3.5	COLORAÇÃO POR HEMATOXILINA EOSINA	35
3.6	CONTAGEM DE CÉLULAS	35
3.7	IMUNOFLUORESCÊNCIA	36
3.8	MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA CONVENCIONAL E CONFOCAL DE ESCANEAMENTO A LASER	38
3.9	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)	38
3.10	ÍNDICE FUNCIONAL DE AQUILES	39
3.11	ÂNGULO ARTICULAR	41
3.12	ATIVIDADE LOCOMOTORA	43
3.13	ESTATÍSTICA	44
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	45
4.1	EFEITO DA MODULAÇÃO NITRÉRGICA NO GANHO DE MASSA CORPÓREA DE RATOS TENOTOMIZADOS	45
4.2	EFEITO DA MODULAÇÃO NITRÉRGICA NA ATIVIDADE EXPLORATÓRIA E DESEMPENHO FUNCIONAL DE RATOS TENOTOMIZADOS	45
4.3	EFEITO DA MODULAÇÃO NITRÉRGICA NA ORGANIZAÇÃO DO TECIDO EM TENDÕES DE RATOS TENOTOMIZADOS	53

4.4. IMPLICAÇÃO DA MODULAÇÃO NITRÉRGICA NO NÚMERO E ORGANIZAÇÃO DE CÉLULAS EM TENDÕES DE RATOS TENOTOMIZADOS. ....	53
4.5. EFEITO DA MODULAÇÃO NITRÉRGICA NA EXPRESSÃO DE COLÁGENO TIPO I EM TENDÕES TENOTOMIZADOS .....	56
4.6. IMPLICAÇÃO DA MODULAÇÃO NITRÉRGICA NA ULTRAESTRUTURA DO TENDÃO DE ANIMAIS TENOTOMIZADOS .....	56
4.7. EFEITO DA MODULAÇÃO NITRÉRGICA NO DIÂMETRO DE SECÇÕES TRANSVERSAS DE FIBRILAS DE COLÁGENO: ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL .....	58
4.8. PAPEL DA MODULAÇÃO NITRÉRGICA NA PLASTICIDADE PERIFÉRICA ATRAVÉS DA EXPRESÃO DE GFAP NO TENDÃO DE AQUILES DE RATOS .....	61
4.9. EFEITO DA MODULAÇÃO NITRÉRGICA NA PLASTICIDADE PERIFÉRICA: EXPRESSÃO DE NF200 NO TENDÃO DE AQUILES DE RATOS .....	64
.....	66
.....	66
4.10. ESTUDO DA PLASTICIDADE NA MEDULA ESPINHAL APÓS LESÃO TENDÍNEA: CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA E EXPRESÃO DE GFAP .....	67
4.11. EFEITO DA MODULAÇÃO NITRÉRGICA NA PLASTICIDADE DO SNC: EXPRESSÃO DE GFAP E CO-LOCALIZAÇÃO COM c-Fos NO SEGMENTO L5 DA MEDULA ESPINHAL. ....	75
4.12. IMPLICAÇÃO DA MODULAÇÃO NITRÉRGICA NA PLASTICIDADE DO SNC: EXPRESSÃO DE NF200 E CO-LOCALIZAÇÃO COM c-Fos NO SEGMENTO L5 DA MEDULA ESPINHAL. ....	75
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	81
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	89
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	90

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURA 1. TENDÃO DE AQUILES .....	19
FIGURA 2. NEUROPLASTICIDADE NO TENDÃO.....	22
FIGURA 3. DIFERENÇAS NAS PEGADAS DURANTE A MARCHA LIVRE DE UM ANIMAL SADIO (NORMAL) E COM LESÃO TENDÍNEA EM FASE INICIAL (EXPERIMENTAL). .....	25
FIGURA 4. PROCEDIMENTO DE RUPTURA CIRÚRGICA E SUTURA DO TENDÃO DE AQUILES.....	34
FIGURA 5. APARATO EM MADEIRA UTILIZADO PARA COLETAR AS PEGADAS IMPRESSAS DOS ANIMAIS PARA O CÁLCULO DO ÍNDICE FUNCIONAL DE AQUILES.....	40
FIGURA 6. OBTENÇÃO DAS MEDIAS PARA O CÁLCULO DO IFA. ....	42
FIGURA 7. EFEITO DA MODULAÇÃO NITRÉRGICA NO GANHO DE MASSA CORPÓREA DE RATOS SUJEITOS A RUPTURA CIRÚRGICA DO TENDÃO DE AQUILES DIREITO .....	46
FIGURA 8. EFEITO DA MODULAÇÃO NITRÉRGICA NO NÍVEL DE ATIVIDADE EXPLORATÓRIA .....	47
FIGURA 9. PAPEL DA MODULAÇÃO NITRÉRGICA NA RECUPERAÇÃO FUNCIONAL: ÍNDICE FUNCIONAL DE AQUILES .....	49
FIGURA 10. FRAMES REPRESENTATIVOS DA MARCHA DE RATOS SUBMETIDOS A RUPTURA CIRÚRGICA DO TENDÃO DE AQUILES DIREITO.....	50
FIGURA 11. FUNÇÃO DA MODULAÇÃO NITRÉRGICA NA ANÁLISE DA MARCHA: ANÁLISE DO ÂNGULO ARTICULAR NA FASE DE APOIO MÉDIO. ....	51
FIGURA 12. FUNÇÃO DA MODULAÇÃO NITRÉRGICA NA ANÁLISE DA MARCHA: ANÁLISE DO ÂNGULO ARTICULAR NA FASE DE PRÉ-BALANÇO .....	52
FIGURA 13. COLORAÇÃO POR HEMATOXILINA & EOSINA E AUTOFLUORESCÊNCIA.....	54
FIGURA 14. EFEITO DA MODULAÇÃO NITRÉRGICA NO NÚMERO, ORGANIZAÇÃO E MORFOLOGIA CELULAR DO TENDÃO DE AQUILES DIREITO DE RATOS TENOTOMIZADOS.....	55
FIGURA 15. MARCAÇÃO IMUNOFLUORESCENTE PARA COL1A1 EM TENDÃO DE RATOS SUBMETIDOS A RUPTURA CIRÚRGICA DO TENDÃO DE AQUILES DIREITO. ....	57
FIGURA 16. IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO MOSTRANDO A ULTRAESTRUTURA DO TENDÃO DE ANIMAIS CTRL (A E B), SAL (C E D), L-NAME (E E F) E SNP (G E H) .....	59
FIGURA 17. IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO MOSTRANDO A ULTRAESTRUTURA DO TENDÃO DE ANIMAIS CTRL (A), SAL (B), L-NAME (C) E SNP (D).....	60
FIGURA 18. IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO MOSTRANDO A ULTRAESTRUTURA DO TENDÃO DE ANIMAIS CTRL (A), SAL (B), L-NAME (C) E SNP (D).....	62
FIGURA 19. DISTRIBUIÇÃO DA FREQUÊNCIA DOS DÂMETROS DE FIBRILAS DE COLÁGENO EM TENDÕES CTRL, SAL, L-NAME E SNP .....	63
FIGURA 20. IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA GFAP E MARCAÇÃO PARA DAPI EM CORTES LONGITUDINAIS DO TENDÃO DE AQUILES DE RATOS APÓS 21 DIAS DE LESÃO TENDÍNEA ACOMPANHADA DOS TRATAMENTOS LOCAIS .....	65
FIGURA 21. MARCAÇÃO IMUNOFLUORESCENTE PARA NF200 E DAPI EM CORTES LONGITUDINAIS DE TENDÃO DE RATOS APÓS 21 DIAS DE RUPTURA CIRÚRGICA DO TENDÃO DE AQUILES DIREITO .....	66
FIGURA 22. COLORAÇÃO POR HEMATOXILINA & EOSINA EM CORTES TRANSVERSAIS DA MEDULA ESPINHAL DE RATOS. ....	68
FIGURA 23. REPRESENTAÇÃO DAS AMOSTRAS DE MEDULA UTILIZADAS NO ESTUDO DOS EFEITOS DA LESÃO NO TENDÃO DE AQUILES SOBRE A PLASTICIDADE NO SNC .....	69
FIGURA 24. MARCAÇÃO IMUNOFLUORESCENTE PARA GFAP E MARCAÇÃO PARA DAPI EM CORTES TRANSVERSAIS DO SEGMENTO L5 DA MEDULA ESPINHAL APÓS 2 (2D) E 21 DIAS (21D) DE LESÃO TENDÍNEA: REGIÃO VENTRAL DIREITA .....	70
FIGURA 25. MARCAÇÃO IMUNOFLUORESCENTE PARA GFAP E MARCAÇÃO PARA DAPI EM CORTES TRANSVERSAIS DO SEGMENTO L5 DA MEDULA ESPINHAL APÓS 2 (2D) E 21 DIAS (21D) DE LESÃO TENDÍNEA: REGIÃO DORSAL DIREITA .....	71



FIGURA 26. MARCAÇÃO IMUNOFLUORESCENTE PARA GFAP E MARCAÇÃO PARA DAPI EM CORTES TRANSVERSAIS DO SEGMENTO L5 DA MEDULA APÓS 2 (2D) E 21 DIAS (21D) DE LESÃO TENDÍNEA: REGIÃO VENTRAL ESQUERDA. ....	72
FIGURA 27. MARCAÇÃO IMUNOFLUORESCENTE PARA GFAP E MARCAÇÃO PARA DAPI EM CORTES TRANSVERSAIS DO SEGMENTO L5 DA MEDULA APÓS 2 (2D) E 21 DIAS (21D) DE LESÃO TENDÍNEA: REGIÃO DORSAL ESQUERDA. ....	73
FIGURA 28. MARCAÇÃO IMUNOFLUORESCENTE PARA GFAP E MARCAÇÃO PARA DAPI EM CORTES TRANSVERSAIS DO SEGMENTO L5 DA MEDULA: SEM LESÃO (SL) E CONTROLE NEGATIVO (NEG).....	74
FIGURA 29. DUPLA MARCAÇÃO IMUNOFLUORESCENTE PARA GFAP E C-FOS EM CORTES TRANSVERSAIS DO SEGMENTO L5 DA MEDULA APÓS 2 (2D) E 21 DIAS (21D) DE LESÃO TENDÍNEA EM RATOS: DORSAL.....	77
FIGURA 30. DUPLA MARCAÇÃO IMUNOFLUORESCENTE PARA GFAP E C-FOS EM CORTES TRANSVERSAIS DO SEGMENTO L5 DA MEDULA APÓS 2 (2D) E 21 DIAS (21D) DE LESÃO TENDÍNEA EM RATOS: VENTRAL.....	78
FIGURA 31. DUPLA MARCAÇÃO IMUNOFLUORESCENTE PARA NF200 E C-FOS EM CORTES TRANSVERSAIS DO SEGMENTO L5 DA MEDULA APÓS 2 (2D) E 21 DIAS (21D) DE LESÃO TENDÍNEA: DORSAL.....	79
FIGURA 32. DUPLA MARCAÇÃO IMUNOFLUORESCENTE PARA NF200 E C-FOS EM CORTES TRANSVERSAIS DO SEGMENTO L5 DA MEDULA APÓS 2 (2D) E 21 DIAS (21D) DE LESÃO TENDÍNEA: VENTRAL.....	80
TABELA 1. GRUPOS EXPERIMENTAIS E CONCENTRAÇÕES DAS DROGAS UTILIZADAS. ....	32
TABELA 2. LISTA DE ANTICORPOS PRIMÁRIOS E SECUNDÁRIOS UTILIZADOS PARA A IMUNOFLUORESCÊNCIA. ....	37

## 1 INTRODUÇÃO

O tendão de Aquiles – ou tendão calcâneo, conforme nomenclatura atualizada – é formado pela confluência dos tendões dos músculos gastrocnêmio (medial e lateral) e sóleo, os quais se inserem através desse tendão comum no osso calcâneo (Figura 1), garantindo a alavanca durante o movimento de flexão plantar após a contração muscular (STROM & CASILAS, 2009).

Apesar de ser um dos tendões mais fortes e resistentes do corpo, o tendão calcâneo não está isento de lesões. Pelo contrário, nas últimas décadas a prevalência de lesões tendíneas aumentou entre a população de meia idade, atletas de alto desempenho e recreacionais, embora a literatura reporte que o fenômeno não é restrito a esses grupos (CLEGG *et al.*, 2007; PADANILAM, 2009).

A tendinopatia ocupacional, causada por movimentos repetitivos (*overuse*), afeta cada vez mais a população economicamente ativa, gerando alto impacto financeiro na sociedade devido ao grande número de afastamentos do trabalho (RILEY, 2004; MOS *et al.*, 2007; ELLIOTT *et al.*, 2008; LONGO *et al.*, 2009).

Estudos realizados nas últimas décadas demonstraram que a injúria não se restringe à inflamação e disfunção cicatricial, mas envolve também uma interação bastante complexa e, até então, negligenciada com o sistema nervoso central e periférico (ACKERMANN *et al.*, 2003; BRING *et al.*, 2007; SCHIZAS *et al.*, 2010).

### 1.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E FISIOPATOLÓGICOS DA LESÃO TENDÍNEA

A ruptura do tendão de Aquiles era algo incomum antes de 1950, contudo esse quadro mudou devido à dois eventos concomitantes e antagônicos, a popularização de atividades esportivas e o aumento do estilo de vida sedentário, ambos fatores de risco para essa lesão (KVIST, 1994).

Um estudo realizado no Reino Unido mostrou que a ruptura do tendão de Aquiles tem incidência de 11,3 casos por 100.000 pessoas por ano (CLAYTON & COURT-BROWN,

2008). Na Finlândia, a incidência aumentou de 2 para 12 casos em 100.000 dos anos 1970 para os 1990, e a maioria dos casos esteve relacionado à prática esportiva (LEPPILAHTI *et al.*, 1996).

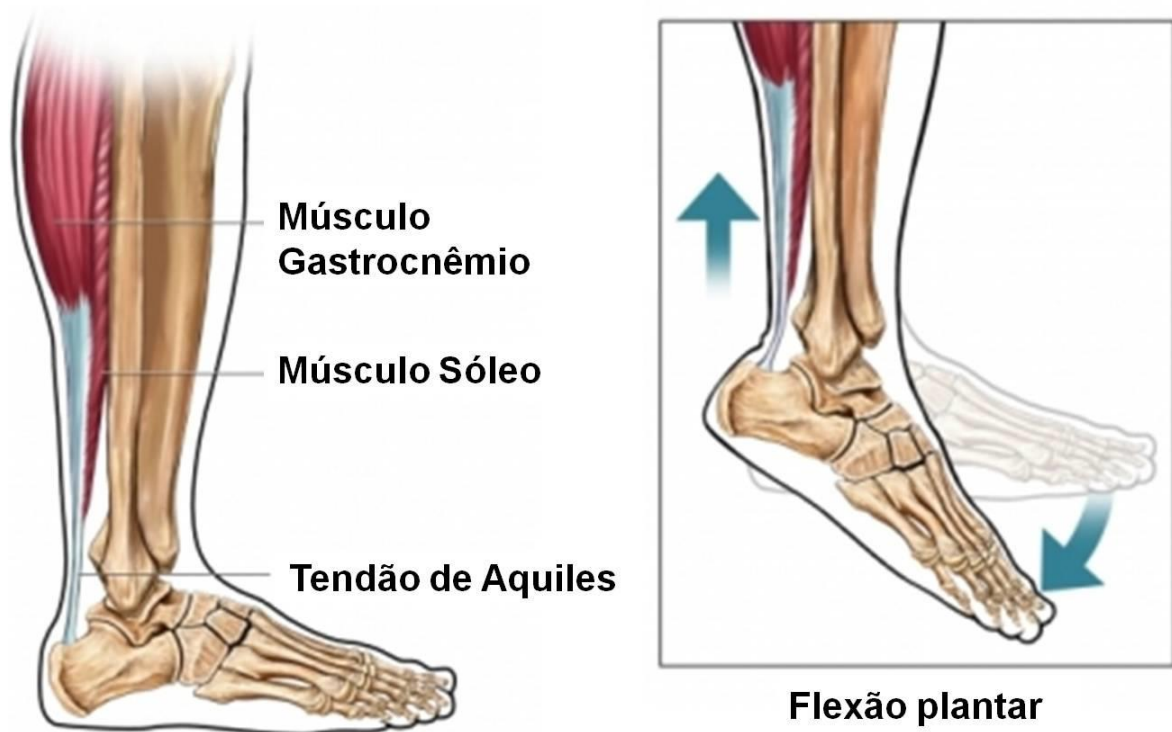
Em um estudo que fez o levantamento de pesquisas epidemiológicas, foram verificadas altas taxas de lesões principalmente em atletas, de modo que 68% apresentavam tendinopatia do tendão de Aquiles, enquanto 3% relataram a ruptura completa. Quando comparado a presença de lesões entre atletas e controles, verificou-se que 29% dos atletas contra 4% dos controles apresentavam lesão por uso repetitivo (JÄRVINEN *et al.*, 2005).

No Brasil, sabe-se que as estatísticas do Instituto Nacional de Seguridade Social (INSS) demonstram alto número de concessão de benefícios por Distúrbios Osteomusculares Relacionados ao Trabalho (DORT) (MENDONÇA JR & ASSUNÇÃO, 2005). Só no ano de 2014, o número de benefícios do auxílio-doença teve uma média mensal de 22 mil benefícios; desses, o item que trata de doenças do sistema osteomuscular e do tecido conjuntivo, no qual se enquadram também as lesões tendíneas de qualquer região do corpo, teve por si só uma média de 5.600 benefícios por mês, já demonstrando estar relacionado a um problema de saúde pública (INSS, 2015).

Acredita-se ainda que esses valores estejam subestimados, haja vista que nem toda a população que sofre com essa afecção busca tratamento, dificultando os levantamentos epidemiológicos (RILEY, 2008). Desse modo, é importante notar que a ruptura do tendão de Aquiles, além da causa acidental, pode ser o desfecho final de um problema que acomete muito mais pessoas: a tendinopatia.

Várias disfunções estão associadas ao surgimento de lesões tendíneas, que podem ser caracterizadas por dor, sensibilidade focal, edema, redução da força, limitação funcional e alteração do padrão circulatório na área afetada (RILEY, 2005; RILEY, 2008; XU & MURRELL, 2008; LONGO *et al.*, 2009). A compreensão dessa patologia não é totalmente elucidada, o que dificulta consideravelmente o desenvolvimento de estratégias de tratamento (MOS *et al.*, 2007; LONGO *et al.*, 2009).

Evidências sugerem que não há inflamação na tendinopatia crônica (ALFREDSON *et al.*, 1999). Contudo, a presença de um prolongado quadro incapacitante reflete a incerteza quanto ao tempo de recuperação. Em alguns casos, o insucesso do tratamento leva à convivência com dor e limitação funcional (MOLLOY *et al.*, 2006; FREDBERG & STENGAARD-PEDERSEN, 2008).



**Figura 1. Tendão de Aquiles.** O tendão é formado pela confluência dos tendões dos músculos gastrocnêmio e sóleo, sendo responsável pela transmissão de forças gerada pela contração dos músculos gastrocnêmio e sóleo ao osso calcâneo que, por sua vez, é puxado para cima durante a contração muscular para produzir o movimento de flexão plantar.

**Fonte:** Adaptado de Nucleus Medical Media, Inc. ©, 2011.

## 1.2 ALTERAÇÕES NA ORGANIZAÇÃO, INERVAÇÃO E VASCULARIZAÇÃO DO TENDÃO

Subsequente a uma lesão tendínea, o encadeamento de eventos que acontecem é muito bem coordenado pela liberação de diversos agentes que conduzem às fases de reparo tecidual, sendo didaticamente divididas nas fases aguda (1-5 dias pós-lesão), proliferativa (em torno de 14 dias) e de remodelagem (21 dias em diante) (BRING *et al.*, 2007; ABATE *et al.*, 2009).

O tendão saudável é constituído por um pequeno número de células denominadas tenócitos. Essas células são fibroblastos especializados, cuja morfologia alongada e disposição em fileiras são características inconfundíveis. A matriz extracelular nesse tecido é abundante e representada, sobretudo, pelo colágeno do tipo I. Essa proteína se organiza em feixes de fibras paralelas, sendo, portanto, um tipo de colágeno bastante resistente (CRIBB & SCOTT, 1995; KANNUS, 2000; RILEY, 2004).

Na lesão, o colágeno é intensamente degradado e o tecido é invadido por fibroblastos imaturos, as células-tronco mesenquimais progenitoras do tendão. A proliferação dessas células ocorre de maneira progressiva e toma conta do tecido lesionado proporcionalmente à intensidade do dano. A função dessa expressiva proliferação ainda não é totalmente elucidada, contudo, algumas evidências apontam seu envolvimento na produção de fatores da resposta de reparo (XU & MURRELL, 2008; ABATE *et al.*, 2009).

A migração celular para o local da lesão é decorrente das alterações na permeabilidade vascular causadas pelo aumento na expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em resposta à fase aguda da lesão (MOLLOY *et al.*, 2006). O tecido, naturalmente pouco vascularizado, torna-se hipervascularizado em função da lesão (PUFE *et al.*, 2005).

Junto às mudanças vasculares, a configuração da inervação é alterada, sendo essa observação relativamente nova no estudo da lesão tendínea, com relatos a partir da última década (PUFE *et al.*, 2005; ACKERMANN *et al.*, 2002).

Os tendões são conhecidos por possuírem grande função proprioceptiva, dotados de terminais nervosos: corpúsculos de Ruffini (tipo I), corpúsculos de Vater-Pacini (tipo II), órgão tendinoso de Golgi (tipo III) e terminações nervosas livres (tipo IV). Dessa forma, o tendão é sensível à pressão, tensão, aceleração e desaceleração e dor (ABATE *et al.*, 2009).

Esta inervação é dada por ramos de fibras nervosas que ficam confinadas ao paratendão (camada de tecido conjuntivo frouxo que envolve o tendão propriamente dito), contudo, a degradação tecidual após a lesão favorece a penetração de ramos nervosos por entre a malha de colágeno do tendão, caracterizando então uma plasticidade neural no tecido (Figura 2) (LIAN *et al.*, 2006; SHARMA & MAFFULLI, 2006; BRING *et al.*, 2007).

A nova configuração do tecido também é atribuída ao aumento na expressão de metaloproteases de matriz extracelular (MMPs) e inibidores teciduais de metaloproteases (TIMPs), as quais são induzidas em resposta a citocinas pró-inflamatórias. Essas enzimas participam diretamente da modulação das taxas de colágeno degradado na matriz e, portanto, da degeneração tecidual (PUFE *et al.*, 2005; POITEVIN *et al.*, 2008; ABATE *et al.*, 2009).

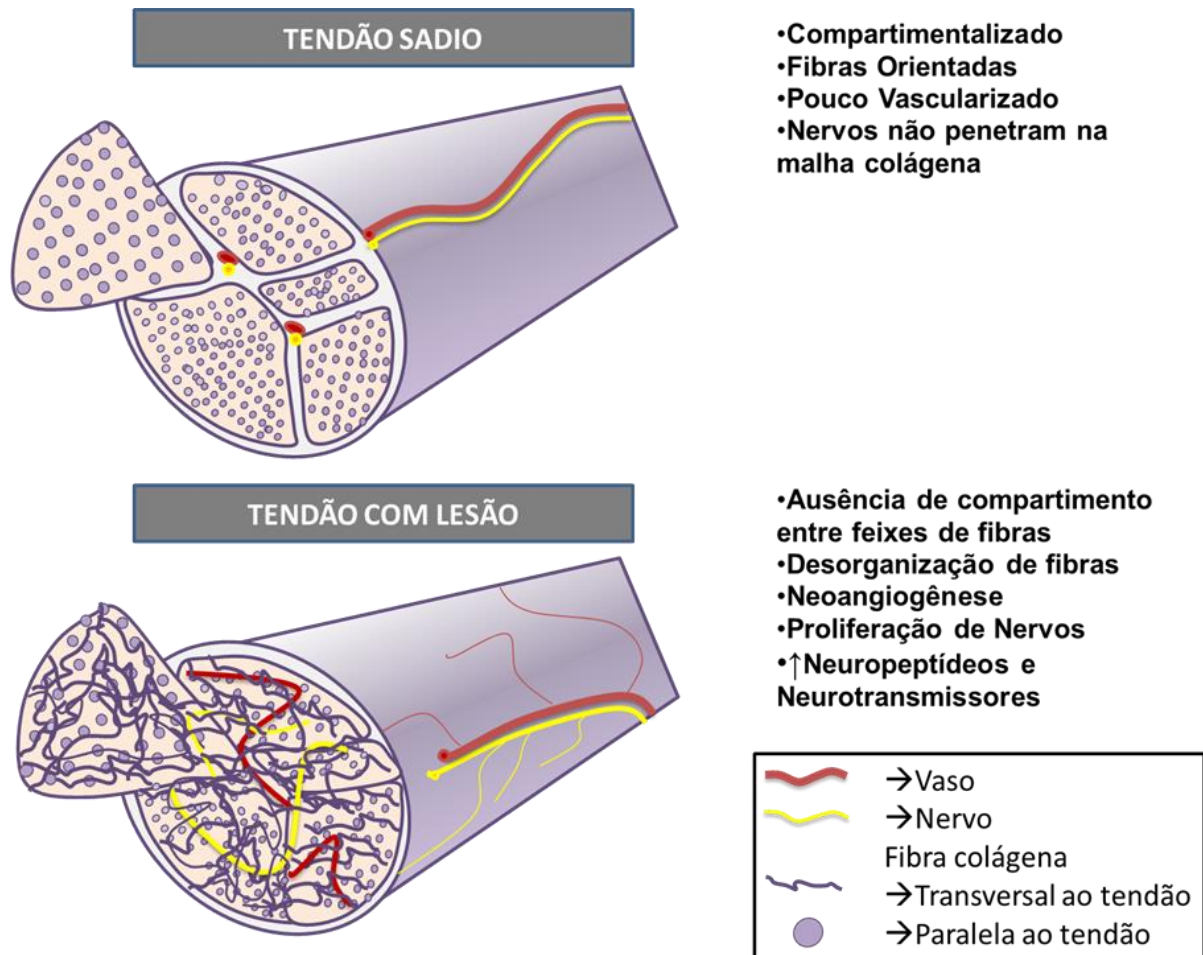
Apesar das hipóteses existentes, os fatores que levam à manutenção do quadro degenerativo e doloroso na regeneração da tendinopatia ainda não são bem claros (RILEY, 2008).

### 1.3 PLASTICIDADE NEURAL NA TENDINOPATIA

Novas evidências apontam para a produção de substâncias sinalizadoras não neuronais por tenócitos, tais como a substância P, a acetilcolina e o glutamato (ALFREDSON *et al.*, 2001; FORSGREN *et al.*, 2005; DANIELSON *et al.*, 2006; DANIELSON *et al.*, 2007).

É possível que essas substâncias estejam envolvidas na sinalização de dor por ativação de fibras nervosas aferentes. Além disso, o brotamento axonal de fibras sensoriais no tendão pode contribuir para a sensação de dor e consequente perda de função, ainda que isso não explique totalmente de onde se origina a química da dor na tendinopatia, já que não há mais indícios de inflamação na fase crônica da lesão (DANIELSON, 2009).

A participação neural nessa lesão parece mais extensa do que se sabia até então. Existem três vias neuronais pelas quais o sistema nervoso central (SNC) pode regular o processo de reparo e amplificar a inflamação: a regulação autonômica, a sensorial e a glutamatérgica. Essas vias modulam a resposta inflamatória através da liberação combinada de diversos neuropeptídeos, tais como o neuropeptídeo Y, a acetilcolina, a substância P, o CGRP, dentre outros (ACKERMANN, 2013; ACKERMANN *et al.*, 2014).



**Figura 2. Neuroplasticidade no tendão.** Desenho esquemático mostrando a neuroplasticidade e angiogênese após ruptura do tendão de Aquiles.

**Fonte:** Elaborado pelo próprio autor

### 1.3.1 Ativação central decorrente de lesões periféricas: a resposta medular

Reforçando a ideia da participação do SNC após a lesão tendínea, alterações na pata contralateral à lesão em modelo murino sugerem que o SNC tem forte envolvimento nesse controle neuroinflamatório (ANDERSSON *et al.*, 2011). Apesar de ainda não ser bem elucidado como e em que fase inflamatória ocorre, tal implicação traz um novo ponto de vista sobre a evolução da lesão e esclarece o porquê da não efetividade de drogas voltadas para a inflamação clássica nessa lesão (RILEY, 2008).

A participação do SNC no reparo após lesões periféricas se reflete principalmente em alterações observadas na medula. A medula espinhal está localizada no interior do canal vertebral da coluna entre o bulbo, como limite superior, e a segunda vértebra lombar, como limite inferior (LENT, 2010; MACHADO; HAERTEL, 2013).

Assim como o encéfalo, a medula é organizada em substância branca e cinzenta, sendo a cinzenta composta predominantemente por neurônios e a branca por células gliais. As funções motoras estão vinculadas à região ventral da medula, que convencionalmente se subdivide, na substância cinzenta, em cornos ventrais direito e esquerdo. Já as informações sensoriais são conduzidas pelos cornos dorsais direito e esquerdo. O processamento de informação reflexa ou condução de informação motora ou sensorial é ipsilateral ao hemisfério (PURVES *et al.*, 2001; MACHADO; HAERTEL, 2013).

A medula espinhal também é dividida em segmentos cervical, torácica, lombar, sacral e coccígea. Os nervos periféricos que inervam o corpo surgem a partir de 31 pares de nervos da medula espinhal, dos quais 8 são cervicais, 12 torácicos, 5 lombares, 5 sacrais e 1 coccígeo. Esses nervos deixam a coluna através dos forames intervertebrais e são responsáveis por conduzir impulsos nervosos motores, a partir das raízes ventrais, e sensoriais, nas raízes dorsais (PURVES *et al.*, 2001; MACHADO; HAERTEL, 2013).

Nas regiões cervical e lombar, existe uma área mais espessa que o diâmetro médio da medula, que constitui as intumescências cervical e lombar, respectivamente. Essas regiões acomodam um maior número de neurônios e conexões necessárias para processar e retransmitir informações relacionadas aos movimentos de membros superiores e inferiores (PURVES *et al.*, 2001). Os neurônios responsáveis por processar informações do tendão de Aquiles e dos músculos gastrocnêmio e sóleo estão localizados na intumescência lombar, mais especificamente, no segmento L5 (YOUNG *et al.*, 1983; PHILLIPS; PARK, 1991).



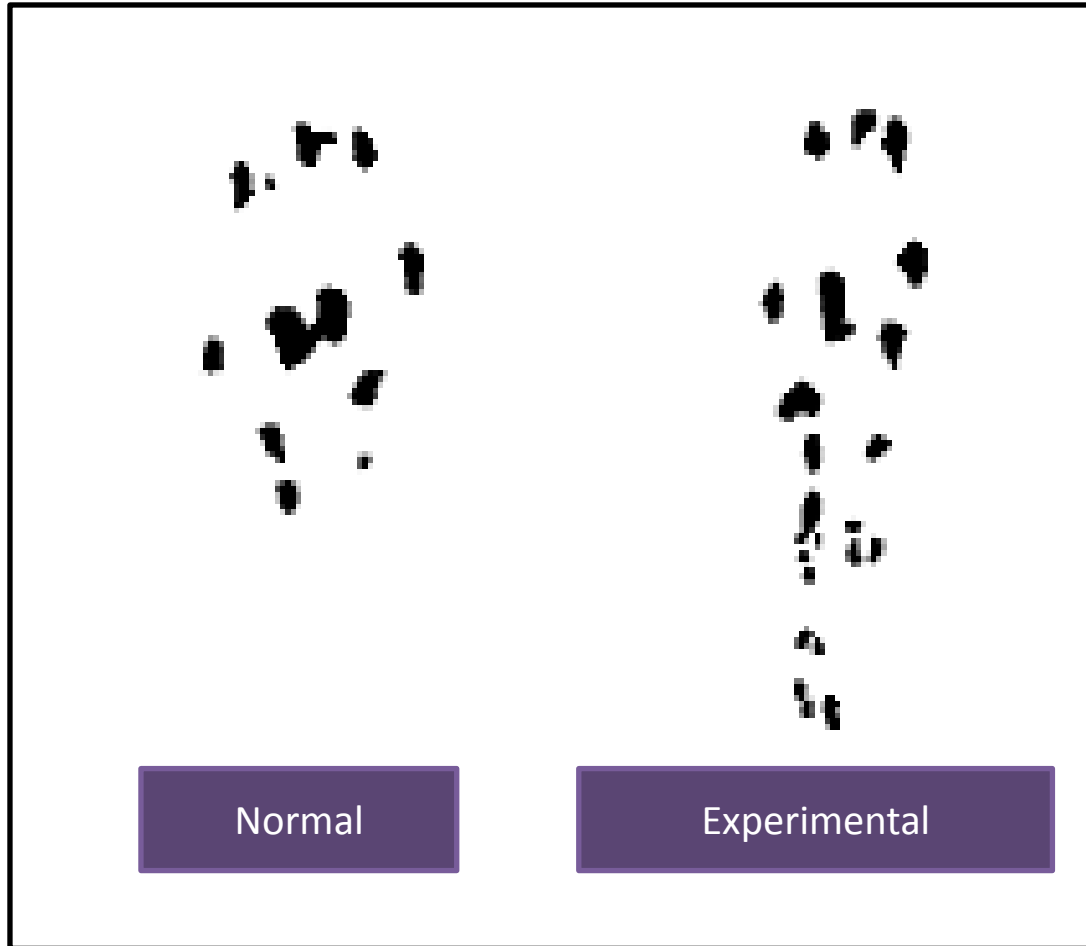
Diversas análises mostraram o envolvimento do SNC após uma lesão no SNP através da avaliação dos segmentos lombares da medula espinhal pós-neuropatia induzida por diferentes modelos de lesão em nervo periférico (GARRISON *et al.*, 1991; COYLE, 1998; WANG *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2012; MARINELLI *et al.*, 2012). O estudo da expressão de marcadores celulares associados à ativação celular, tal como o c-Fos (produto do gene imediato *c-fos*) e da reatividade glial, como o GFAP, são abordagens bastante utilizada para avaliar a plasticidade após uma lesão (WANG *et al.*, 2009).

Sabe-se que estímulos menos lesivos, tais como a retirada da carga suportada pela pata através da microgravidade e o contato do membro com estímulos térmicos, mecânicos e químicos, são capazes de causar respostas na medula. Apesar disso, notamos que não há descrições acerca de alterações medulares em resposta a condição de lesão tendínea. Portanto, ainda existe uma enorme lacuna relativa às respostas centrais após uma injúria no tendão (YANG *et al.*, 2008; McCOY *et al.*, 2012; CHELYSHEV *et al.*, 2014).

#### 1.4 DOR E LIMITAÇÃO FUNCIONAL NA TENDINOPATIA

Boa parte do conhecimento sobre as respostas fisiopatológicas às lesões tendíneas decorrem de pesquisas envolvendo o modelo murino, um excelente modelo animal para estudar alterações fisiológicas e comportamentais. A limitação funcional após a lesão tendínea nestes animais é claramente observada pela alteração no padrão da marcha, bem como através da diferença na dimensão da pegada impressa (Figura 3) (MURRELL *et al.*, 1992).

Durante a locomoção, os ratos, apesar de quadrúpedes, apresentam analogias com o padrão de marcha humano. Os membros anteriores e posteriores precisam se dissociar para que seja mantido o equilíbrio e, portanto, sempre ocorre alternância entre membros. Esses movimentos são coordenados por centros geradores de padrões rítmicos na medula e regiões supramedulares, não precisando de ativação consciente coordenada pelo córtex cerebral. Somente o conjunto completo de movimentos, a marcha propriamente dita, que depende da volição. Assim, involuntariamente, durante as fases de apoio médio e terminal, o tornozelo está em dorsiflexão, e no início da fase de balanço está em flexão plantar (YU *et al.*, 2001; LENT, 2010; LIANG *et al.*, 2012).



**Figura 3. Diferenças no padrão de pegadas durante a marcha livre de um animal sadio (normal) e com lesão tendínea em fase inicial (experimental).**

**Fonte:** Adaptado de Murrell *et al*, 1994.

Alterações na biomecânica dessas regiões podem ocorrer em função de lesões. Como consequência, variações na frequência e amplitude de movimentos, na distância percorrida pelo animal e na maneira como o animal posiciona a pata e os dedos no solo para a descarga de peso indicam perda funcional decorrente de dor ou perda da integridade do tecido (YU *et al.*, 2001).

Para mensurar as alterações funcionais, Murrell e colaboradores (1992) propuseram o índice funcional de Aquiles (IFA). Esse índice, além de sensível à lesão, possui significativa correlação com propriedades biomecânicas, tornando-se um importante indicador da recuperação funcional do animal (MURRELL *et al.*, 1992; BEST *et al.*, 1993; NG *et al.*, 2003; SEE *et al.*, 2004).

Outra maneira de medir a função do tendão de Aquiles é através da análise do ângulo articular durante a marcha. Essa análise, baseada no registro de imagem e posterior avaliação dos ângulos da articulação do tornozelo do animal durante as diferentes fases da marcha, permitem identificar a melhora funcional e correlaciona-la com o IFA e estudos biomecânicos (LIANG *et al.*, 2012).

A alteração funcional também pode estar associada à dor, definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável relacionada a um dano tecidual real ou potencial (LONGO *et al.*, 2009; LARSSON & BROMAN, 2011).

A dor, entretanto, não é o único fator limitante para o movimento. A orientação aleatória e a pouca coesão entre as fibras após a lesão favorecem um maior estiramento com menor força de tração, prejudicando as propriedades biomecânicas e promovendo a limitação funcional (REDDY *et al.*, 1999; WREN *et al.*, 2001; GIGANTE *et al.*, 2009). Essas modificações estruturais parecem contribuir para a penetração de nervos entre a malha colágena (BRING *et al.*, 2007).

## 1.5 ÓXIDO NÍTRICO NO REPARO TENDÍNEO

Em paralelo a todas as alterações descritas até agora, é reportado na literatura que após a lesão também ocorre o aumento temporalmente ordenado na expressão das enzimas da família óxido nítrico sintase (NOS) e, por conseguinte, na produção de NO a partir do aminoácido L-arginina (LIN *et al.*, 2001; LIN *et al.*, 2001b; MURRELL *et al.*, 1997).

As enzimas da família NOS podem ser expressas constitutivamente nos tecidos, como as isoformas I (NOSI) e III (NOSIII), ou após ativação do sistema imunológico, como a isoforma II (NOSII), que produz NO em larga escala e desempenha, conseqüentemente, papel essencialmente citotóxico (MONCADA & HIGGS, 1995; MONCADA *et al.*, 1991; MONCADA, 1999; VALLANCE, 2003; ABRAMSON, 2008).

O dilema sobre a contribuição ou o prejuízo do NO no processo de regeneração é extenso, principalmente quando levado em conta que essa molécula desempenha papel dual – muitas vezes dependente da concentração, do momento do reparo em que a intervenção é realizada, do modelo em questão (*in vivo* ou *in vitro*) e/ou do órgão analisado (HSU *et al.*, 2006; DOOLEY *et al.*, 2007; MATTHIESEN *et al.*, 2008; VERCELINO *et al.*, 2010; CORSETTI *et al.*, 2010).

Com relação ao efeito do NO especificamente na regeneração tendínea, a maioria dos trabalhos baseia-se na administração sistêmica de drogas que modulam a formação de NO (tal como ingestão da droga solubilizada na água ou injetada via intraperitoneal). Como resultado desse tipo de intervenção, foi observado que o NO é importante para a regeneração do tendão, pois seu bloqueio pode aumentar a desorganização tecidual, interferir na transcrição e tradução de genes relacionados à regeneração e intensificar a resposta inflamatória (MURREL *et al.*, 1997; DARMANI *et al.*, 2004; MURREL, 2008; MURREL *et al.*, 2007; TOMIOSSO *et al.*, 2009; MOLLOY *et al.*, 2006).

Contudo, o nosso grupo de trabalho resolveu considerar as próprias limitações desses estudos, representadas principalmente pelos efeitos colaterais que os animais apresentavam com a administração sistêmica, e conduzir uma pesquisa visando analisar o efeito do bloqueio nitrérgico apenas no local da lesão. Nossos dados mostraram que a inibição nitrérgica local foi bastante benéfica para o reparo tecidual do ponto de vista histológico e funcional, melhorando os aspectos estruturais do colágeno e a organização celular bem como acelerando a recuperação funcional (MORAES *et al.*, 2013).

Reiterando esse achado, Xia *et al* (2006) buscavam verificar se o bloqueio da isoforma NOSII era mais influente no suposto prejuízo da recuperação do tecido tendinoso lesionado em camundongos nocaute, entretanto o estudo findou por mostrar que esses animais recuperavam-se espontaneamente bem após a lesão no tendão, ou seja, a ausência dessa isoforma não implicava em problemas cicatriciais.

Frente aos resultados animadores sobre a remodelagem e a melhora funcional obtidas pelo nosso grupo através da modulação nitrérgica (MORAES *et al.*, 2013), somados à extensa literatura sobre a ocorrência de plasticidade neural periférica após a lesão (ALFREDSON *et al.*, 2001; FORSGREN *et al.*, 2005; DANIELSON *et al.*, 2006; DANIELSON *et al.*, 2007; BRING *et al.*, 2007; ACKERMANN, 2013; ACKERMANN *et al.*, 2014) e as mais recentes descobertas que sugerem uma possível plasticidade central (ANDERSSON *et al.*, 2011) este trabalho busca investigar os efeitos da modulação nitrérgica na plasticidade periférica após a ruptura tendínea e verificar, pela primeira vez, se ocorre plasticidade central em resposta a lesão.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar os efeitos da lesão tendínea na plasticidade do sistema nervoso central e investigar o efeito da modulação nitrérgica na plasticidade periférica e na limitação funcional em modelo murino.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

No tendão:

- Identificar o efeito da modulação nitrérgica na organização tecidual do tendão de Aquiles de ratos.
- Identificar o efeito do sistema nitrérgico sob a proliferação e morfologia celular na fase de remodelagem da lesão;
- Detectar o efeito da modulação nitrérgica na produção de colágeno tipo I na fase de remodelagem da lesão;
- Comparar o efeito da modulação nitrérgica no padrão de organização ultraestrutural do colágeno na fase de remodelagem da lesão;
- Identificar o perfil de frequências do diâmetro de fibras colágenas na fase de remodelagem da lesão após modulação nitrérgica;
- Avaliar a presença e organização de terminais axonais no tendão na fase de remodelagem da lesão em nosso modelo;
- Avaliar o efeito da modulação nitrérgica no padrão de inervação tendínea após a lesão, na fase de remodelagem;
- Avaliar o efeito da modulação nitrérgica sobre parâmetros de recuperação funcional (IFA, ângulo articular e locomoção) após a lesão;

Na medula:

- Caracterizar a região lombar da medula espinhal especificamente no segmento vertebral L5 por histoquímica, comparando-o entre 2 e 21 dias após a lesão tendínea.

- Avaliar possíveis alterações no perfil de expressão de GFAP na medula (segmento vertebral L5) na fase inicial e tardia da lesão.
- Detectar quais células são ativadas na medula (segmento L5) na fase inicial e tardia da lesão através de dupla marcação para neurônio-c-Fos ou glia-c-Fos.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para o desenvolvimento do presente trabalho utilizamos ratos adultos (*Rattus norvegicus*) da linhagem *Wistar*, todos machos, os quais foram obtidos do Biotério Central do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará (ICB-UFPA). Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno padrão, mantidas em ambiente com ciclo claro/escuro de 12 horas e recebendo água e ração balanceada *ad libitum*.

O manuseio e os procedimentos com os animais seguiram os preceitos éticos que regem a execução de testes experimentais, além disso o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFPA sob parecer 114-13.

Para a execução dos experimentos, os animais foram divididos em seis grupos experimentais, conforme descrito na Tabela 1. Os grupos SAL, L-NAME e SNP receberam tratamento entre o 2º e o 21º dia pós-lesão (DPL), o que foi estabelecido em função da preocupação em manter as defesas naturais atribuídas à fase aguda da inflamação. A administração do volume de 50 µl dos produtos, especificados na Tabela 1, foi realizada com auxílio de uma seringa de insulina na região paratendínea, a partir do 2º dia pós-lesão, e ocorreu em dias alternados visando minimizar o estresse causado pelas injeções e manipulações no animal.

#### 3.2 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Para a realização da ruptura cirúrgica do tendão de Aquiles, os animais foram anestesiados com a mistura das soluções de cloridrato de cetamina 10% (80 mg/kg) e cloridrato de xilazina a 2% (12 mg/kg) por via intraperitoneal. Após testar os reflexos dolorosos do animal para confirmar a efetividade do plano anestésico, a pele sobre a região posterior da pata posterior direita foi tricotomizada e em seguida realizou-se a assepsia do local com solução de iodo 2%.



**Tabela 1. Grupos experimentais e concentrações das drogas utilizadas.**

<b>Grupo</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Concentração</b>
CTRL	Controle, sem cirurgia	-
SAL	Salina, cirurgia + Solução isotônica de NaCl	0,9%
L-NAME	Cirurgia + L-nitro-arginina-metil-éster (Sigma, St. Louis, Mo. USA), inibidor da síntese de óxido nítrico.	5 mM <sup>1</sup>
SNP	Cirurgia + Nitroprussiato de sódio (Sigma, St. Louis, Mo. USA), um doador de NO.	3 mM <sup>2</sup>
2 dias	Cirurgia. Representa a fase aguda	-
21 dias	Cirurgia. Representa a fase de remodelagem	-

<sup>1</sup> A concentração de 5 mM já mostrou-se efetiva em trabalho previamente publicado pelo grupo (Moraes *et al.*, 2013).

<sup>2</sup> A concentração de 3 mM foi escolhida após busca na literatura sobre uso local e incubação de tecidos ou células em nitroprussiato de sódio com o modelo murino. Verificamos efetividade, nessas condições, entre as faixas de 1 mM a 3 mM, já apresentando toxicidade associada ao NO. A fim de verificar um efeito bem efetivo da droga, escolhemos a maior concentração (IZUME *et al.*, 1993; SIU *et al.*, 2004; BASTIANETTO *et al.*, 2010).

O procedimento cirúrgico (Figura 4) consistiu de uma incisão longitudinal na pele acima da inserção calcânea para ter acesso ao tendão de Aquiles, o qual foi dissecado dos tecidos envolventes e seccionado totalmente por cisalhamento transversal com auxílio de uma tesoura, seguido imediatamente por reparo segundo a técnica modificada de Kessler (MURREL *et al.*, 1992; MORAES *et al.*, 2013). A pele também foi suturada com fio de poliamida monofilamento não absorvível número 4.0 e submetida novamente à assepsia.

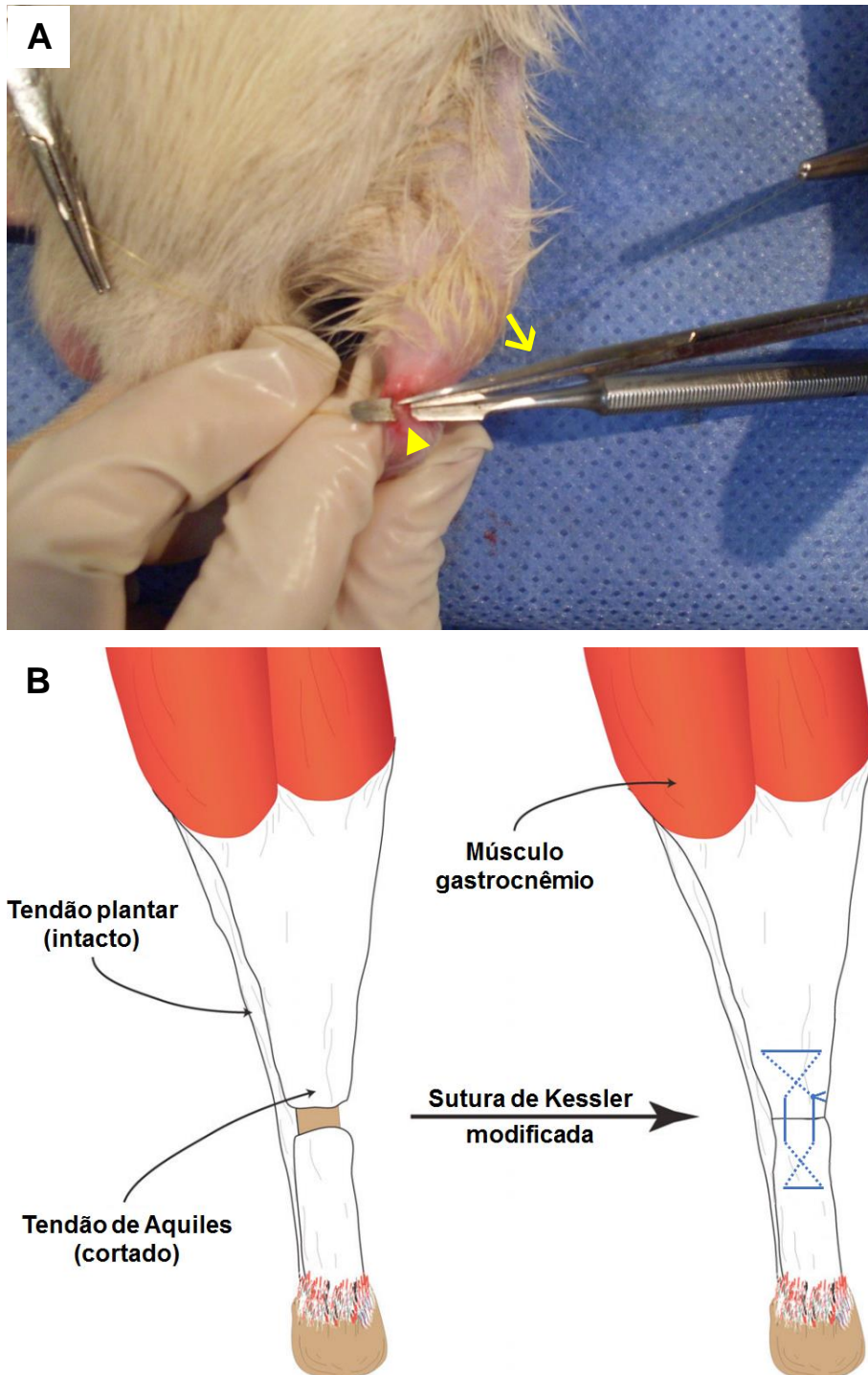
Após a lesão tendínea não houve nenhuma restrição ou imobilização do segmento, apenas higienização diária com solução fisiológica até a cicatrização da pele. Ao final dos tratamentos estabelecidos para cada grupo experimental os animais foram decapitados ou perfundidos via transcardíaca com solução salina isotônica seguido de paraformaldeído 4% (PFA), ambos com pH 7,4. A técnica de perfusão foi realizada com prévia anestesia do animal por cloridrato de cetamina 10% (80mg/kg) e cloridrato de xilazina a 2% (12 mg/kg) e na ausência de sinais dolorosos.

### 3.3 PESAGEM DOS ANIMAIS

Como um dos efeitos notáveis da inibição nitrérgica sistêmica é a perda de massa corporal (YUAN *et al.*, 2003), acompanhamos esse parâmetro para averiguar se alterações sistêmicas chegam a ser induzidas pela administração local da droga. Para isso, todos os animais foram pesados antes do início dos experimentos e uma vez por semana até o dia da decapitação ou perfusão para posterior análise comparativa com o grupo controle.

### 3.4 MICROTOMIA

As amostras de tendão e medula espinhal foram dissecadas a fim de remover os tecidos adjacentes. As amostras de tendões e de medula espinhal foram pós-fixados em PFA 4%, ambos *overnight*. Passado o tempo final de fixação, os tecidos foram lavados em tampão fosfato (TF) 0,1M, pH 7,4, por 3 vezes consecutivas de 5 minutos cada e mantidas em TF a 4°C até o preparo para os cortes. Antes da execução dos cortes, o material passou por crioproteção em soluções crescentes de sacarose (10%, 20% e 30%) em temperatura ambiente e depois mantidos em uma solução a 30% até o momento da criomicrotomia.



**Figura 4. Procedimento de ruptura cirúrgica e sutura do tendão de Aquiles.** Em A, notar o isolamento do tendão (cabeça de seta) e o momento de ruptura cirúrgica com a tesoura (seta). Em B, a representação esquemática da sutura do tendão é mostrada através da técnica de sutura de Kessler, com algumas adaptações para o tamanho reduzido do tendão de Aquiles de ratos. A linha tracejada indica que o fio de sutura está por dentro do tecido e a linha contínua mostra o que está por cima.

Para obtenção das secções histológicas, o material foi embebido em Tissue Tek (Sakura Finetek, Inc., Califórnia, USA) no ambiente do criostato (Leica, CM3050 S), cuja temperatura era mantida a  $-24^{\circ}\text{C}$ . Os tecidos foram cortados em secções de  $20\ \mu\text{m}$  de espessura com orientação longitudinal para o tendão e transversal para a medula. Todas as secções obtidas foram transferidas para lâminas histológicas previamente gelatinizadas. Cada lâmina, com no máximo 6 secções, foi criteriosamente organizada, numerada e armazenada a  $-20^{\circ}\text{C}$  em caixas organizadoras de lâminas até o momento do uso para histoquímica ou imunohistoquímica.

### 3.5 COLORAÇÃO POR HEMATOXILINA EOSINA

Para avaliar a integridade e organização tecidual no tendão de Aquiles e na medula espinhal, bem como a presença de vasos no tendão, utilizamos a técnica de coloração por hematoxilina e eosina (H&E). Como o material obtido foi congelado para a obtenção dos cortes, não necessitando de desidratação nem imersão em parafina, vários passos do protocolo convencional da H&E foram eliminados.

Sendo assim, as lâminas foram imersas em água destilada por 5 min e em seguida em solução de hematoxilina de Harris (Sigma-Aldrich) por 40 segundos, lavadas em água deionizada por 20 minutos, imersas em solução de eosina por mais 30 segundos e então lavadas em água deionizada por mais 20 minutos. Após esse último passo, as lâminas foram desidratadas ao passar por uma bateria crescente de álcool e montadas em glicerol a 30%.

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

### 3.6 CONTAGEM DE CÉLULAS

Após obtenção das secções do tendão de Aquiles na espessura de  $20\ \mu\text{m}$ , o material foi marcado com o clássico marcador nuclear 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). A marcação obtida por esse método permitiu utilizar as imagem capturadas através do microscópio de fluorescência para a quantificação do número de células. Após a aquisição das imagens,

utilizamos os recursos do programa de computação *Image J*<sup>®</sup> (National Institute of Mental Health, USA). As imagens passaram por um tratamento para aumentar o contraste, evidenciando ainda mais apenas os núcleos e evitando marcação inespecífica de fundo azulado.

A seguir, as imagens foram convertidas para o formato binário, conforme indicado pelo programa, e então foi solicitado que o programa de computação realizasse a análise de partículas, as quais tiveram os valores máximos e mínimos previamente medidos com auxílio da ferramenta “*straight line*” para ajuste do programa. Os dados de cada imagem foram salvos para posterior análise estatística.

### 3.7 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Para esta técnica foram utilizadas secções histológicas provenientes do tendão de Aquiles e da medula espinhal no local correspondente ao segmento vertebral L5, conforme mencionado previamente. Os procedimentos descritos a seguir baseiam-se no protocolo disponível no site da ABCAM<sup>®</sup>.

As secções histológicas foram lavadas em PBS por 3 vezes durante 5 minutos cada, tratados com cloreto de amônio por 40 minutos, permeabilizado a temperatura ambiente com solução de triton X-100 0,3% mais BSA 1% por 1 hora, lavados em PBS novamente e incubados *overnight* em câmara úmida à 4°C com o anticorpo primário diluído em solução de triton X-100 e BSA1%.

No dia seguinte os cortes foram lavados em PBS por 3 vezes durante 5 minutos e depois incubados por 2 horas em temperatura ambiente e protegido da luz com o anticorpo secundário diluído em solução de BSA 1%. Por fim, o material foi lavado novamente em PBS, tinham os núcleos corados com DAPI por 2 minutos e foram lavados mais 3 vezes em PBS para remover o excesso de DAPI sendo em seguida montados em N-propil-galato (20 µl).

Grupos controle negativo foram usados para avaliar a especificidade da marcação imunohistoquímica através da omissão do anticorpo primário. Para as duplas marcações, utilizamos nas fases de incubação um mix de anticorpos primários e posteriormente secundários, mantendo-se os mesmos passos acima descritos. As especificações dos anticorpos e as diluições utilizadas estão descritas na Tabela 2.

**Tabela 2. Lista de anticorpos primários e secundários utilizados para a imunofluorescência.**

<b>ANTICORPO</b>	<b>ESPECIFICAÇÃO</b>	<b>DILUIÇÃO</b>
Anti-GFAP (H-50)	IgG de coelho. Policlonal Santa Cruz Biotechnology	1:200
Anti-Neurofilamento (N-14)	IgG de coelho. Policlonal. Sigma-Aldrich	1:200
Anti-c-Fos (4)	IgG de cabra. Policlonal Santa Cruz Biotechnology	1:200
Anti-COL1A1 (D-13)	IgG de cabra. Policlonal Santa Cruz Biotechnology	1:200
Alexa Fluor 488	IgG de cabra anti-coelho Molecular Probes	1:1000
Alexa Fluor 594	IgG de coelho anti-cabra Molecular Probes	1:1000

### 3.8 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA CONVENCIONAL E CONFOCAL DE ESCANEAMENTO A LASER

As análises de microscopia foram realizadas no tecido obtido e processado para imunofluorescência ou histoquímica, tanto de medula quanto de tendão. O material final encontra-se em lâminas de vidro cobertas com lamínulas de 0,13mm de espessura e dimensões de 24x60 mm. Um microscópio de fluorescência convencional Eclipse Ni (Nikon, Yokohama, Japan) com os filtros (UV, azul e verde), lente objetiva de ampliação para 10, 20 ou 40 vezes e abertura numérica respectivamente de 0,45; 0,75 e 0,95 foi usado para análise da ocorrência e distribuição das marcações, bem como utilizamos o método de luz transmitida para a análise do tecido corado por imunohistoquímica. Toda a análise do material foi realizada por meio de fotomicrografias obtidas através de um sistema de câmera digital (Nikon, DXM 1200, Japan) acoplada ao microscópio e controlada pelo *software* NIS-Elements (Nikon). Para a microscopia confocal, o tecido foi visualizado em um microscópio LSM 510 META (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) com uma lente objetiva apocromática plana cuja ampliação é de 10 vezes e abertura numérica de 0,30 utilizando o programa ZEN 2011 (Carl Zeiss). As moléculas fluorescentes foram excitadas com linhas de laser de comprimento de onda de 488 ou 561 nm. O diâmetro da abertura do *pinhole* foi ajustado para permitir a seleção da fluorescência proveniente de fatias ópticas entre  $< 15 \mu\text{m}$  e  $140 \mu\text{m}$  no plano axial do foco da lente objetiva. A excitação do DAPI foi realizada por 2 fótons, utilizando um laser infravermelho em 780 nm.

### 3.9 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

Amostras do tendão de Aquiles dos animais também foram processadas para análise por MET. Após dissecação dos tendões, o tecido foi cortado em pedaços de aproximadamente  $1 \text{ mm}^3$  e fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio (TCS) 0,1M *overnight* a 4°C. No dia seguinte, as amostras foram submetidas a três lavagens de 30 minutos cada com TCS a 0,1M e em seguida as amostras foram pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio 1% em TCS por 1 hora em temperatura ambiente. Uma vez pós-fixado, o material foi lavado

por 3 vezes de 20 minutos cada em TCS e colocado em soluções crescentes de acetona a 50%, 70% e 95% por 1 hora cada e permaneceu *overnight* na de 100%.

Ao final da fase de desidratação, iniciou-se a fase de impregnação com resina EPON. Para isso, o material passou por diferentes concentrações de resina EPON a 30%, 50% e 100% diluída em acetona PA e permanecendo em cada etapa por 24 horas na temperatura ambiente e protegido da umidade. Depois de atingir a maior concentração de resina, a mesma foi polimerizada em estufa de secagem por 72 horas a 60°C.

A amostra foi então desenformada e preparada para ser seccionada por ultramicrotomia (Leica Microsystems, Vienna, Austria) na espessura de 70 nm com navalha de diamante. As secções ultrafinas foram coletadas com grades de cobre para microscopia eletrônica de 300 mesh e armazenados em caixas apropriadas para este fim em dessecador.

O material foi contrastado com acetato de uranila 2,5% e citrato de chumbo segundo Reynolds (1963). Todas as grades obtidas foram observadas pelo microscópio eletrônico de transmissão FEI Morgagni, 80 kV (FEI Company, Eindhoven, The Netherlands). Todo o processamento e uso do MET foi realizado no Instituto de Microbiologia Paulo Góes, na Universidade Federal do Rio de Janeiro sob supervisão do Prof. Dr. Ulysses Lins.

### 3.10 ÍNDICE FUNCIONAL DE AQUILES

Este teste comportamental foi realizado em todos os animais (4 à 5 por grupo) no período pré-operatório, assim como na fase pós-operatória em 7, 14 e 21 dias. Para a execução dessa avaliação, os ratos foram colocados em um aparato de madeira nas dimensões de 10 cm de largura por 60 cm de comprimento e 20 cm de altura (figura 5).

O assoalho desse aparato foi forrado com um papel branco e os animais tiveram suas patas traseiras pintadas com tinta atóxica para, em seguida, serem colocados no aparato para caminhar em linha reta, deixando impresso no papel as pegadas. Esse papel foi codificado e digitalizado para análise com o *software Image J*<sup>®</sup>.

A análise dos parâmetros do IFA foi realizada a partir do segundo par de pegadas do animal, e o índice foi calculado de acordo com a equação descrita abaixo:

$$\text{IFA} = 74(\text{PLF}) + 161(\text{TSF}) + 48(\text{ITF}) - 5$$





**Figura 5. Aparato em madeira utilizado para coletar as pegadas dos animais deixadas impressas em papel para o cálculo do índice funcional de Aquiles.**

Fonte: Dados do autor

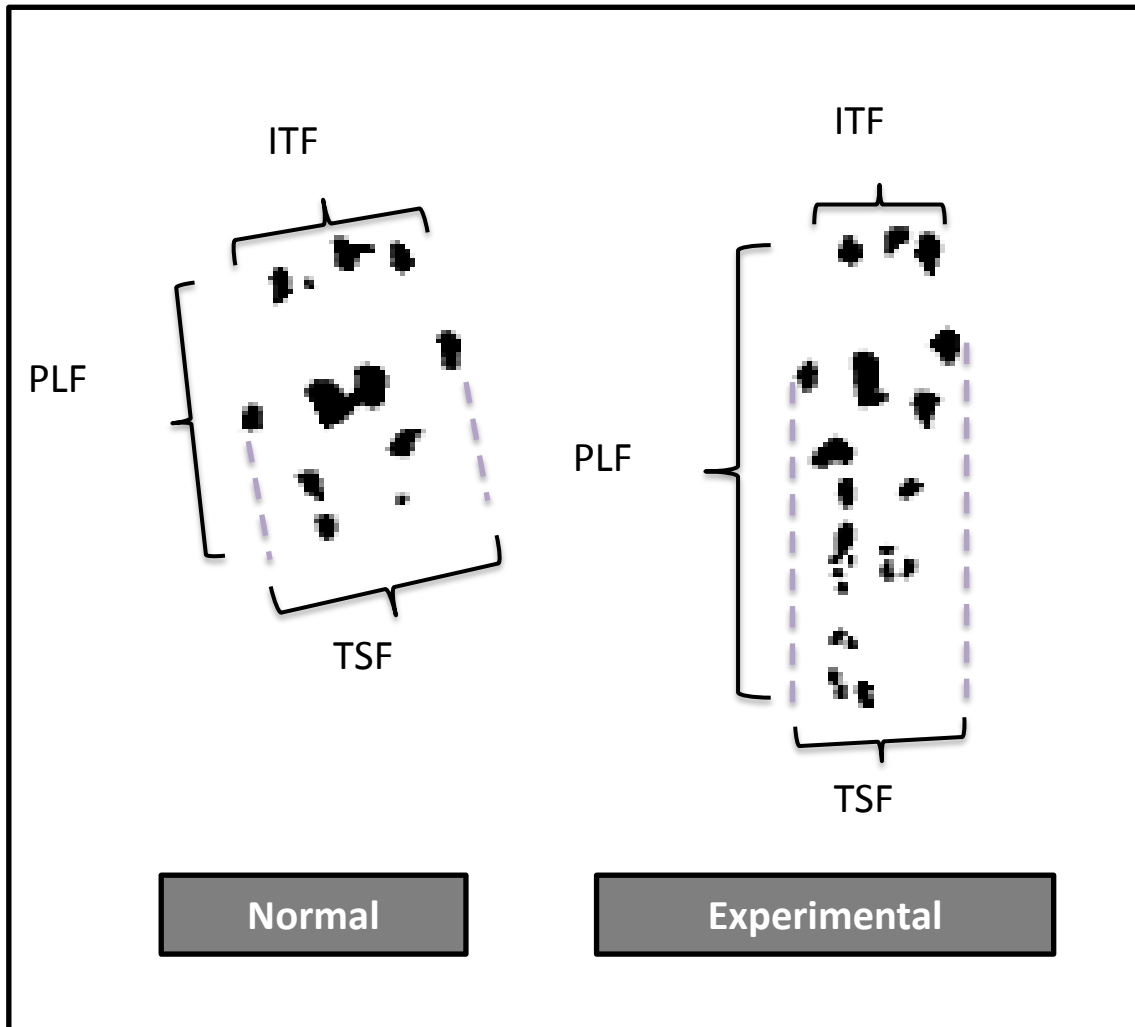
Os elementos da equação correspondem aos dados obtidos da pegada do animal (Figura 6). O máximo comprimento da pegada é definido como o fator de comprimento da pegada (PLF), e obtido por  $PLF_{\text{Esq}} - PLF_{\text{Dir}} / PLF_{\text{Dir}}$ . A distância entre o primeiro e o quinto dedo é chamado de fator de espalhamento dos dedos do pé (TSF), e obtido por  $TSF_{\text{Dir}} - TSF_{\text{Esq}} / TSF_{\text{Esq}}$ . Por fim, a distância entre o segundo e o quarto dedo é o fator teste intermediário (ITF), calculado por  $ITF_{\text{Dir}} - ITF_{\text{Esq}} / ITF_{\text{Esq}}$ . Os fatores foram previamente obtidos e calculados para compor a equação do IFA (MURRELL *et al.*, 1992).

### 3.11 ÂNGULO ARTICULAR

O ângulo articular é uma medida biomecânica referente a cinemática do movimento, a qual permite detectar a amplitude de movimento articular, que no presente trabalho se restringe ao tornozelo. A análise, fundamentada no trabalho de Liang *et al.*, 2012, foi realizada por meio da filmagem da marcha do animal em linha reta sobre o mesmo aparato usado para o IFA.

Para executar esta análise, os animais foram imobilizados e tiveram as articulações do tornozelo, joelho e quadril identificadas por meio da palpação e marcadas com caneta de maneira bem visível em pontos chave (lateral ao joelho; lateral ao tornozelo e na cabeça do quinto metatarso), de modo a ser possível observar esses pontos na filmagem. Em seguida, os animais foram colocados no aparato, entretanto este estava invertido a fim de fornecer ao animal apenas um espaço estreito para a locomoção, o que favorecia a marcha em linha reta, além de permitir a filmagem completa do animal em perfil, uma vez que as laterais estavam completamente livres.

Para a filmagem, um tripé com câmera acoplada foi posicionado a 1,20 m de altura, em relação ao solo, e à distância de 1 m do aparato. A câmera foi previamente ligada e o animal colocado no aparato. Após obtenção da filmagem (25-30 quadros/segundo) de pelo menos 3 passadas sequenciais dos animais, os vídeos foram salvos no formato AVI no computador para posterior análise.



**Figura 6. Obtenção das medias para o cálculo do IFA.**

Fonte: Adaptado de Murrel *et al*, 1992.

A análise foi realizada utilizando-se o *software Image J*<sup>®</sup>. Os vídeos foram abertos no *software*, o botão play acionado e pausado nos frames referentes às fases da marcha conhecidas como apoio médio e pré-balanço. Essas fases foram escolhidas devido ao maior tempo a elas atribuídas e a estabilidade do movimento articular das mesmas permitir a visualização adequada do ângulo articular nas condições de captura de imagem da câmera de vídeo (número de quadros/s). As demais fases são rápidas, sem contato com o solo (aéreas), ou pouco detectáveis no vídeo, inviabilizando a detecção do ângulo do movimento com exatidão. A fase de apoio médio e pré-balanço são caracterizadas, respectivamente como, o momento em que um único membro posterior está apoiando o peso do corpo enquanto o outro membro posterior entra na fase de balanço e o momento em que o membro de apoio transfere o peso do corpo para o membro contralateral e prepara-se para a fase de balanço, ou seja, para sair do contato com o solo (LIANG *et al.*, 2012).

Após a identificação dos quadros com as fases da marcha acima citadas, a ferramenta *angle* foi acionada e os pontos de referência previamente marcados no animal foram interligados para a determinação do ângulo do tornozelo com a subsequente utilização da ferramenta *measure*. Um quadro com informação sobre o ângulo medido foi informado e o dado armazenado em uma planilha para análise estatística.

### 3.12 ATIVIDADE LOCOMOTORA

Para avaliar a atividade locomotora do animal, utilizamos um aparato em madeira com formato circular (*Open Field*) e livre de odor no qual o animal foi posicionado no centro e permaneceu por 3 minutos executando movimento espontâneo, enquanto todo o seu deslocamento foi filmado. É importante ressaltar que todos os animais passaram pela habituação ao novo aparato, por duas vezes em dias diferentes, evitando assim um comportamento exploratório diferente no momento da realização do teste. Os vídeos obtidos foram analisados com auxílio do *software X-Plo-Rat*<sup>®</sup>, configurando-o para o teste de campo aberto, tipo arena 6x6, no tempo de 180s. Os dados obtidos foram salvos em planilhas eletrônicas para a análise estatística.

### 3.13 ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados foi realizada através de teste  $t$  de Student para comparação entre duas médias de grupos diferentes não pareado ou pelo teste U de Mann-Whitney, quando apropriado. Também foi realizado Análise de Variância de um fator (*one-way* ANOVA) com pós-teste de Tukey para comparações múltiplas, bem como a análise descritiva e testes de normalidade aplicados utilizando o programa Prism 5 (GraphPad, La Jolla, EUA). Os valores de  $P$  inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

## 4 RESULTADOS

### 4.1. EFEITO DA MODULAÇÃO NITRÉRGICA NO GANHO DE MASSA CORPÓREA DE RATOS TENOTOMIZADOS

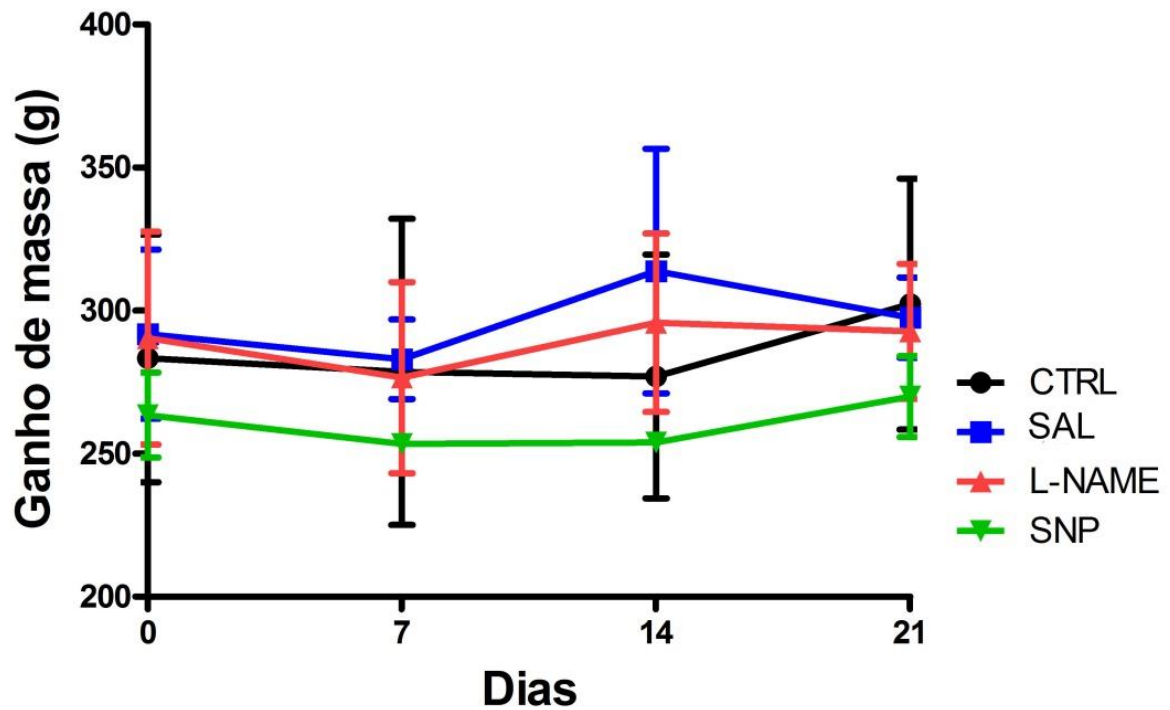
Os animais utilizados no estudo foram mantidos em iguais condições no biotério experimental, dessa forma, o ganho de peso dos mesmos deveria ser mantido semelhante entre os grupos.

Para assegurar que o efeito da modulação nitrérgica foi apenas local, além de administrar as drogas exclusivamente no local da lesão, acompanhamos o ganho de massa entre os grupos experimentais. Os animais tratados ou não com drogas injetadas no local da lesão não apresentaram variação na massa corpórea entre os grupos (Figura 7).

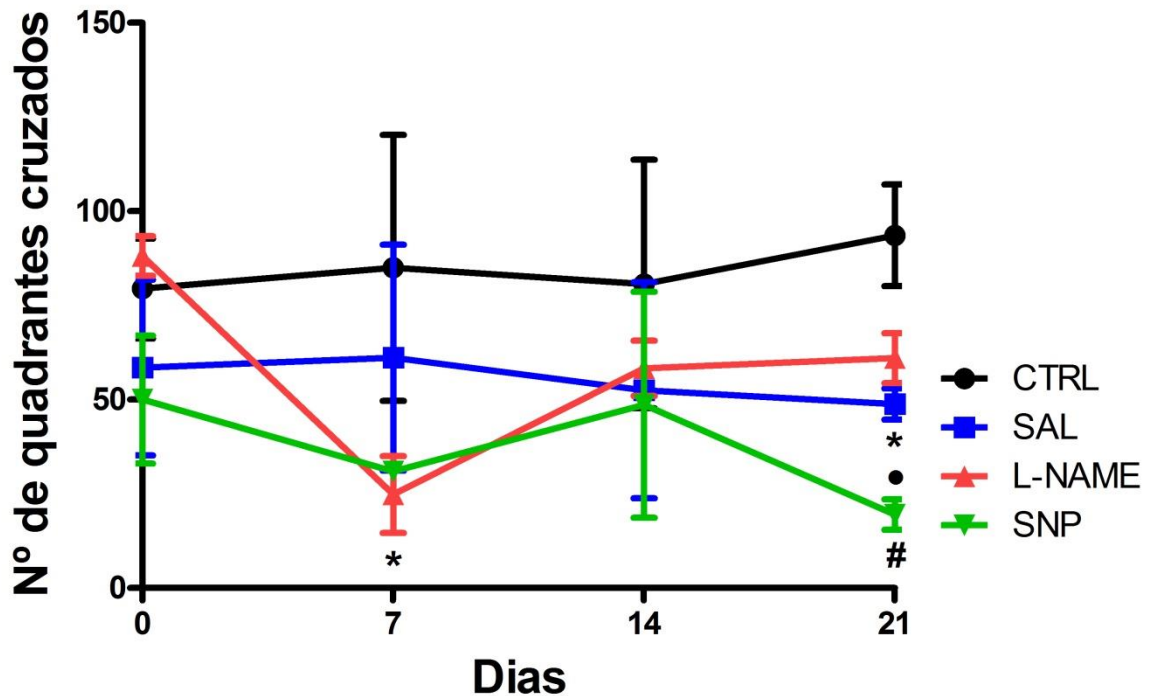
### 4.2. EFEITO DA MODULAÇÃO NITRÉRGICA NA ATIVIDADE EXPLORATÓRIA E DESEMPENHO FUNCIONAL DE RATOS TENOTOMIZADOS

Investigamos se a lesão tendínea e os respectivos tratamentos influenciaram na atividade locomotora do animal (apresentado como a quantidade de quadrantes cruzados). Verificamos que no dia zero, antes de haver lesão, os diferentes grupos não apresentaram diferenças quanto a atividade locomotora (Figura 8). Porém, no 7º DPL, todos os grupos lesionados (SAL:  $61,1 \pm 30$ ; L-NAME:  $24,8 \pm 10,2$ ; SNP:  $34,17 \pm 5,575$  vs. CTRL,  $p = 0,0019$ ) apresentaram redução na locomoção se comparado ao CTRL ( $85 \pm 35,3$ ).

Entretanto em 14 DPL a atividade locomotora de todos os grupos (SAL:  $52,5 \pm 28,6$ ; L-NAME:  $58,3 \pm 7,33$ ; SNP,  $48,66 \pm 30$  vs. CTRL, ns) volta aos níveis do CTRL ( $80,66 \pm 33$ ), porém em 21 DPL a atividade locomotora apresentou-se novamente reduzida para todos os grupos quando comparado ao CTRL (SAL:  $48,83 \pm 4,10$ ; L-NAME:  $61 \pm 6,7$ ; SNP:  $19,5 \pm 4$  vs. CTRL,  $p < 0,0001$ ). Entre os grupos, não houve diferença do SAL com o L-NAME. Contudo, frisamos que o grupo SNP apresentou o pior desempenho na locomoção, havendo redução estatisticamente significativa nesse parâmetro quanto aos demais grupos.



**Figura 7.** Efeito da modulação nitrérgica no ganho de massa corpórea de ratos sujeitos a ruptura cirúrgica do tendão de Aquiles direito. Os animais receberam água e ração *ad libitum* durante todo o período experimental.  $N \geq 4$ . Média  $\pm$  DP. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos nos períodos analisados.



**Figura 8. Efeito da modulação nitrérgica na atividade exploratória.** Os animais foram filmados dentro de um aparato por 3' ao realizar exploração livre do ambiente. N = 5 (CTRL, SAL, L-NAME) e N = 4 (SNP). Média  $\pm$  DP. ANOVA - Tukey, \* indica diferença entre todos os grupos vs. CTRL. • mostra diferença entre L-NAME vs. SNP. # indica diferença entre SAL vs. SNP.  $p = 0,0019$  para a comparação em 7 dias e  $p < 0,0001$  para a comparação em 21 dias pós-lesão.



Para a análise funcional da pata posterior dos animais, dois testes foram conduzidos: o índice funcional de Aquiles e a análise da marcha. Ambos usados com objetivo de identificar se as intervenções realizadas influenciavam na resposta funcional. Os resultados do IFA sugerem que todos os animais que sofreram injúria apresentaram queda nos valores do IFA em 7 dias, independente do tratamento ( $p = 0,0085$ ) (Figura 9).

No 14º DPL apenas o grupo SAL apresentou valores inferiores ao do CTRL ( $p = 0,0041$ ). Porém na análise em 21 DPL verificamos que os grupos SAL e SNP apresentaram valores mais negativos do IFA se comparados ao CTRL ( $p = 0,0076$ ), refletindo em pior desempenho funcional, enquanto que os animais tratados com L-NAME não diferiram do CTRL.

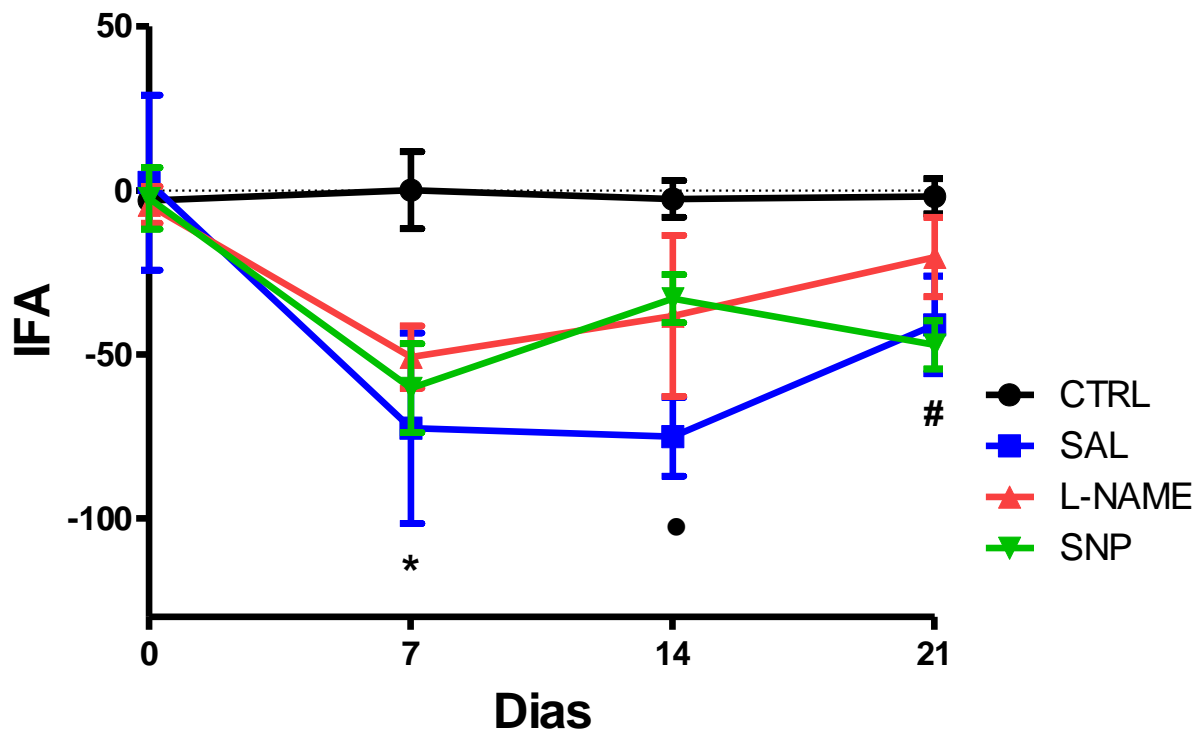
Verificamos, em dois importantes momentos da marcha, a presença de variações no ângulo articular em resposta a modulação nitrérgica. Na fase de apoio médio, a pata posterior do animal está em contato com o solo e tem o peso do corpo transferido para esta, enquanto o lado contralateral inicia a fase de balanço. A fase de pré-balanço é caracterizada pela flexão da pata analisada ao nível da junção metatarso-falangeana a fim de se preparar para sair do contato com o solo e iniciar a fase aérea (Figura 10).

Os resultados referentes ao apoio médio indicam que antes da lesão (dia 0), não houve variação no ângulo articular entre grupos. Contudo, no 7º DPL, apenas os grupos SAL e L-NAME apresentaram redução angular em relação ao CTRL (Figura 11).

Em 14 DPL todos os grupos apresentaram redução nos valores do ângulo articular comparados ao CTRL. Contudo, notamos que após 21 DPL não houve diferença entre L-NAME e CTRL, apenas SAL e SNP ainda apresentaram o ângulo articular reduzido quando comparados ao CTRL. Enfatizamos ainda que o ângulo articular do grupo SAL foi inferior não somente ao CTRL, mas também ao L-NAME.

A figura 12 mostra os resultados da análise do pré-balanço. No dia zero não houve diferença no ângulo articular entre os grupos, no entanto em 7 e 14 DPL todos os grupos apresentaram redução nos valores angulares quando comparados ao CTRL.

Já em 21 DPL, é interessante notar que não houve diferença entre o grupo L-NAME e o CTRL. Diferente do que ocorre com os grupos SAL e SNP, cuja diferença ainda é mantida em relação ao CTRL. Segundo a análise estatística, apenas o SNP apresentou diferença também em relação ao L-NAME.



**Figura 9.** Papel da modulação nitrérgica na recuperação funcional de ratos submetidos à ruptura cirúrgica do tendão de Aquiles direito através da análise do índice funcional de Aquiles. Os animais foram analisados antes da lesão e a cada 7 dias até o 21º dias de injúria.  $N \geq 4$ . Média  $\pm$  DP. ANOVA-Tukey, \*  $p = 0,0085$  todos os grupos vs CTRL. •  $p = 0,0041$  SAL vs CTRL. #  $p = 0,0076$  SNP e SAL vs CTRL.



**Figura 10.** Frames representativos da marcha de ratos submetidos à ruptura cirúrgica do tendão de Aquiles direito. As imagens mostram qual era o posicionamento articular do tornozelo (pata direita) dos animais na fase de pré-balanço e apoio médio em cada grupo de tratamento após 21 dias de lesão ou de acompanhamento de animais sem lesão.

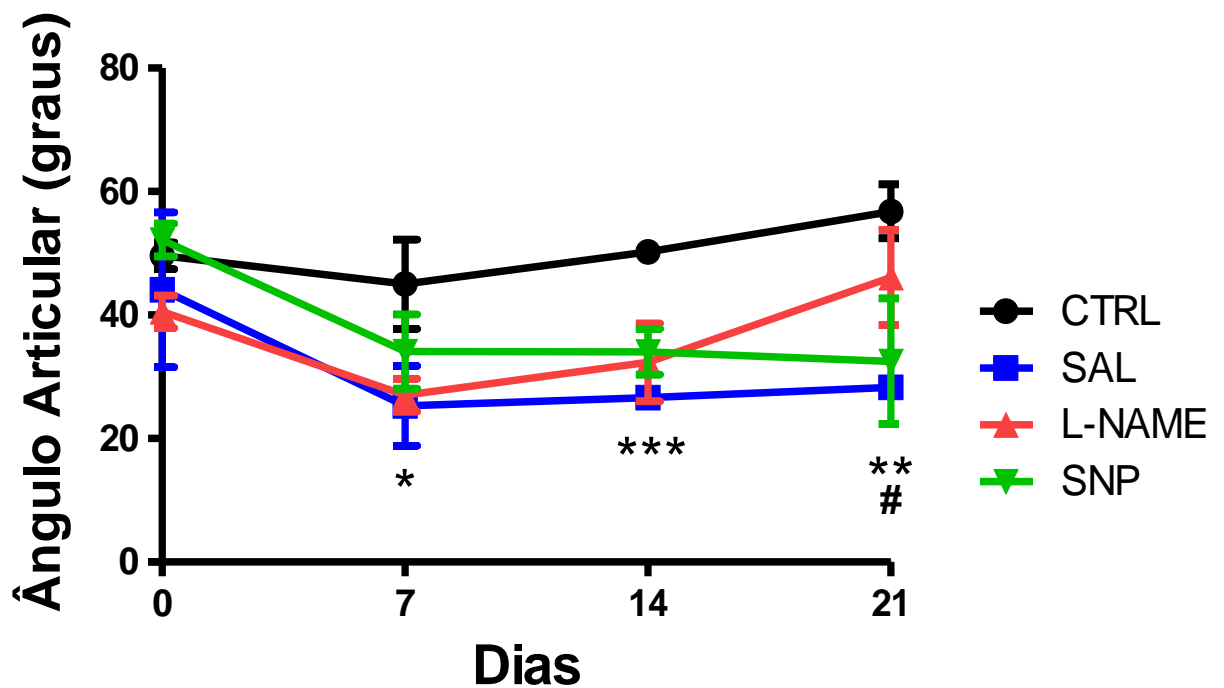
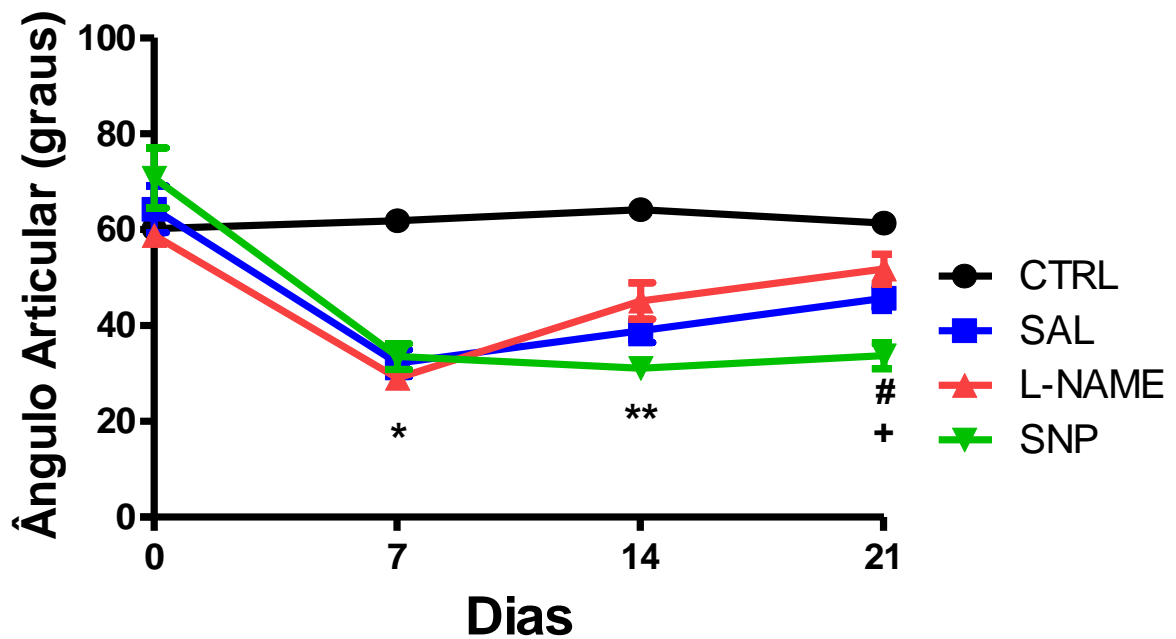


Figura 11. Função da modulação nitrérgica na análise da marcha de ratos submetidos à ruptura cirúrgica do tendão de Aquiles direito: análise do ângulo articular na fase de apoio médio. Os animais foram analisados antes da lesão e a cada 7 dias até o 21º dia pós-lesão.  $N \geq 4$ . Média  $\pm$  DP. ANOVA-Tukey, \*  $p = 0,016$  SAL e L-NAME vs. CTRL. \*\*\*  $p = 0,0007$  todos os grupos vs. CTRL. \*\*  $p = 0,003$  SAL e SNP vs. CTRL. #  $p = 0,003$  SAL vs L-NAME.



**Figura 12. Função da modulação nitrérgica na análise da marcha de ratos submetidos à ruptura cirúrgica do tendão de Aquiles direito: análise do ângulo articular na fase de pré-balanço.** Os animais foram analisados antes da lesão e a cada 7 dias até o 21º dia pós lesão.  $N \geq 4$ . Média  $\pm$  DP. ANOVA-Tukey, \*  $p > 0,0001$  todos os grupos vs. CTRL. \*\*  $p = 0,004$  todos os grupos vs. CTRL. #  $p = 0,0017$  SAL e SNP vs. CTRL. +  $p < 0,01$  SNP vs. L-NAME.

#### 4.3. EFEITO DA MODULAÇÃO NITRÉRGICA NA ORGANIZAÇÃO DO TECIDO EM TENDÕES DE RATOS TENOTOMIZADOS

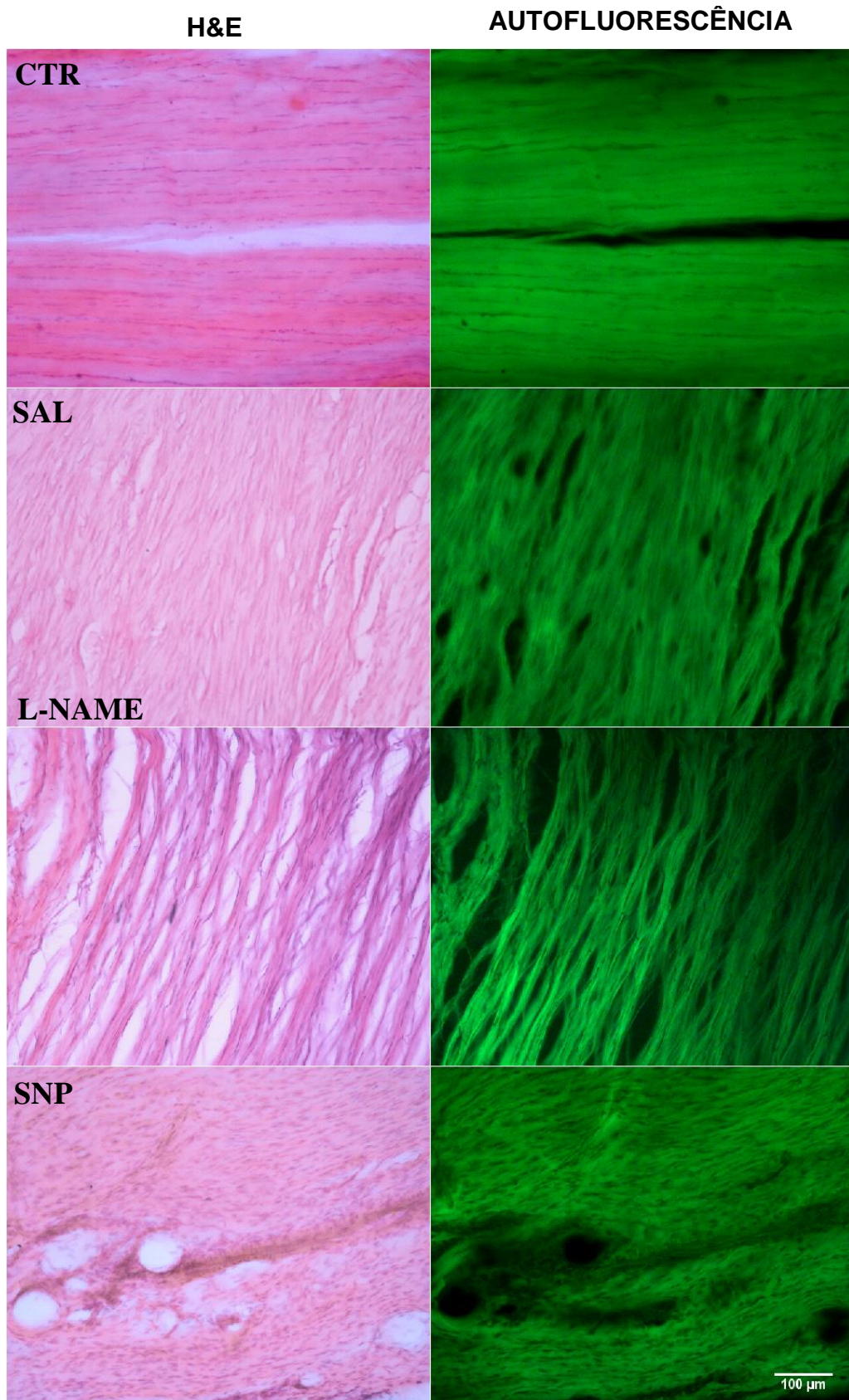
O tecido tendíneo do grupo CTRL apresentou as características histológicas normais, descritas a seguir: pouca densidade de células (tenocitos), de morfologia alongada e orientação em fileira; ausência de vasos sanguíneos ou terminais nervosos e matriz extracelular em abundância, tendo o colágeno tipo I como o principal constituinte, são outras características bem descritas do tendão, o qual é o principal exemplo de tecido conjuntivo denso modelado na classificação histológica do tecido conjuntivo.

Nos grupos SAL, L-NAME e SNP, a desorganização celular e tecidual é evidente em relação ao grupo CTRL. Contudo, destacamos a melhor organização tecidual (colágeno) do grupo L-NAME e pior padrão de organização no grupo SNP. O grupo SAL apresentou organização intermediária se comparada a esses grupos, evidente na HE e autofluorescência (Figura 13).

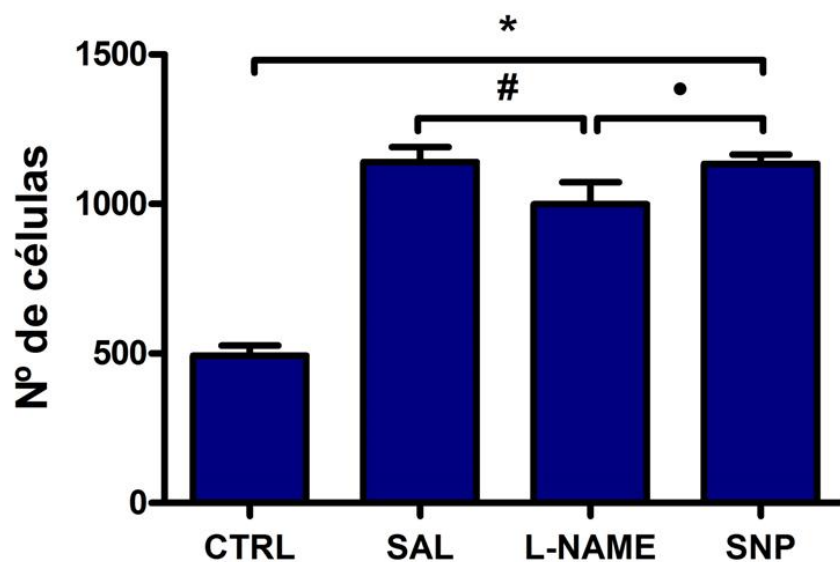
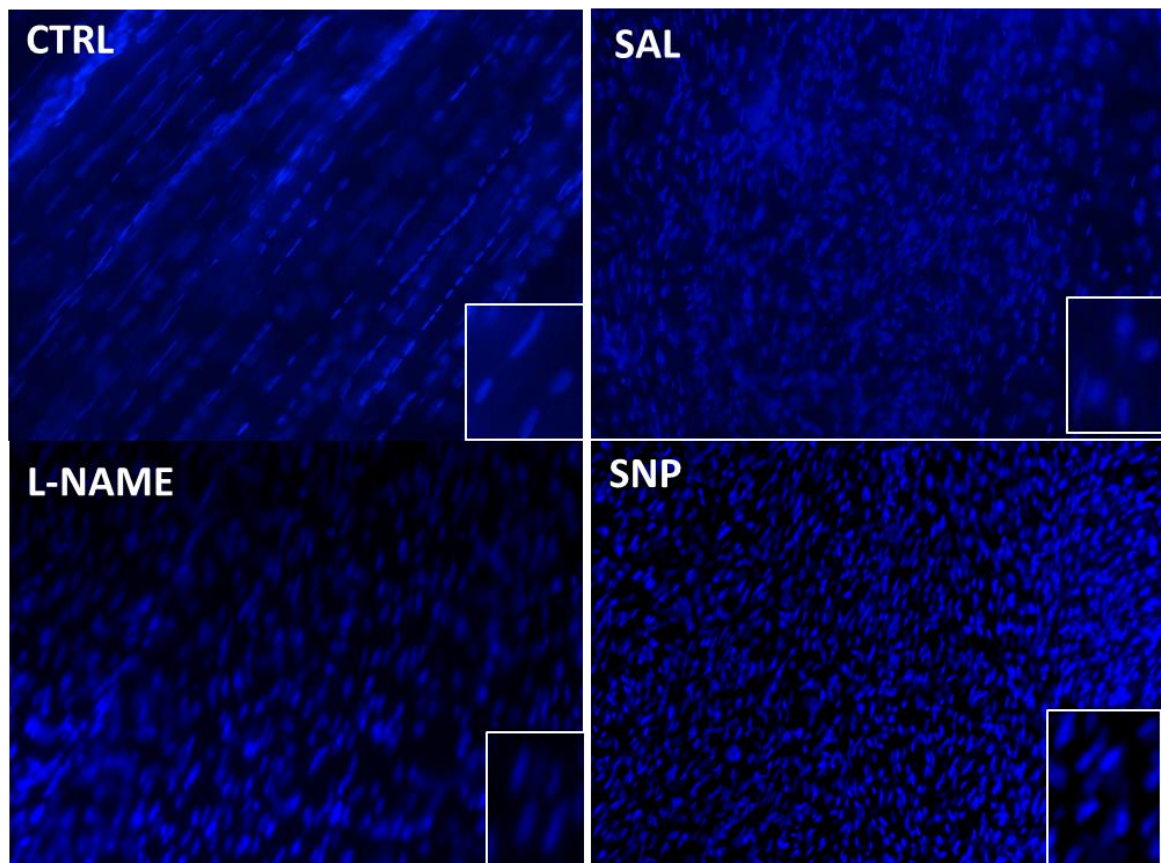
Os grupos SAL e SNP parecem conter maior número de células se comparado ao grupo L-NAME (quantificado a seguir). Ressaltamos que os grupos SAL e SNP apresentaram maior vascularização em relação ao L-NAME, sendo novamente mais um ponto favorável para a inibição nitrérgica no tecido sob o parâmetro de regeneração e reorganização tecidual.

#### 4.4. IMPLICAÇÃO DA MODULAÇÃO NITRÉRGICA NO NÚMERO E ORGANIZAÇÃO DE CÉLULAS EM TENDÕES DE RATOS TENOTOMIZADOS.

A quantificação do número de células no tecido é parâmetro indicativo de recuperação, isso ocorre quando a densidade celular está mais baixa. Observamos através da marcação para DAPI (Figura 14) que houve um aumento no número de células no tecido de todos os animais lesionados em relação ao grupo CTRL ( $492,7 \pm 34,5$  vs. SAL, L-NAME e SNP;  $p < 0,0001$ ). Entretanto o tratamento com L-NAME ( $999 \pm 73,6$  vs. SAL e SNP;  $p < 0,0001$ ) resultou em menos células no tecido quando comparados aos grupos SAL ( $1140 \pm 51,2$ ) e SNP ( $1134 \pm 31,5$ ). Notamos também que a organização e morfologia mais alongada, análoga ao CTRL, foi encontrada no grupo L-NAME, enquanto mais desalinhamento e morfologia celular arredonda foi verificada nos grupos SAL e SNP.



**Figura 13.** Coloração para hematoxilina & eosina e autofluorescência em cortes longitudinais do tendão de Aquiles de ratos após 21 dias de lesão tendínea acompanhada dos tratamentos locais. Barra da escala: 100  $\mu\text{m}$



**Figura 14.** Efeito da modulação nitrérgica no número, organização e morfologia celular do tendão de Aquiles direito de ratos tenotomizados. As secções histológicas foram marcadas com DAPI e analisadas com microscopia de fluorescência. Os quadros inseridos mostram a morfologia nuclear/celular. A análise foi realizada com auxílio do *software Image J*<sup>®</sup>. N = 6. Média ± DP. \* CTRL vs. demais grupos, # SAL vs. L-NAME, • SNP vs. L-NAME,  $p < 0,0001$ .



#### 4.5. EFEITO DA MODULAÇÃO NITRÉRGICA NA EXPRESSÃO DE COLÁGENO TIPO I EM TENDÕES TENOTOMIZADOS

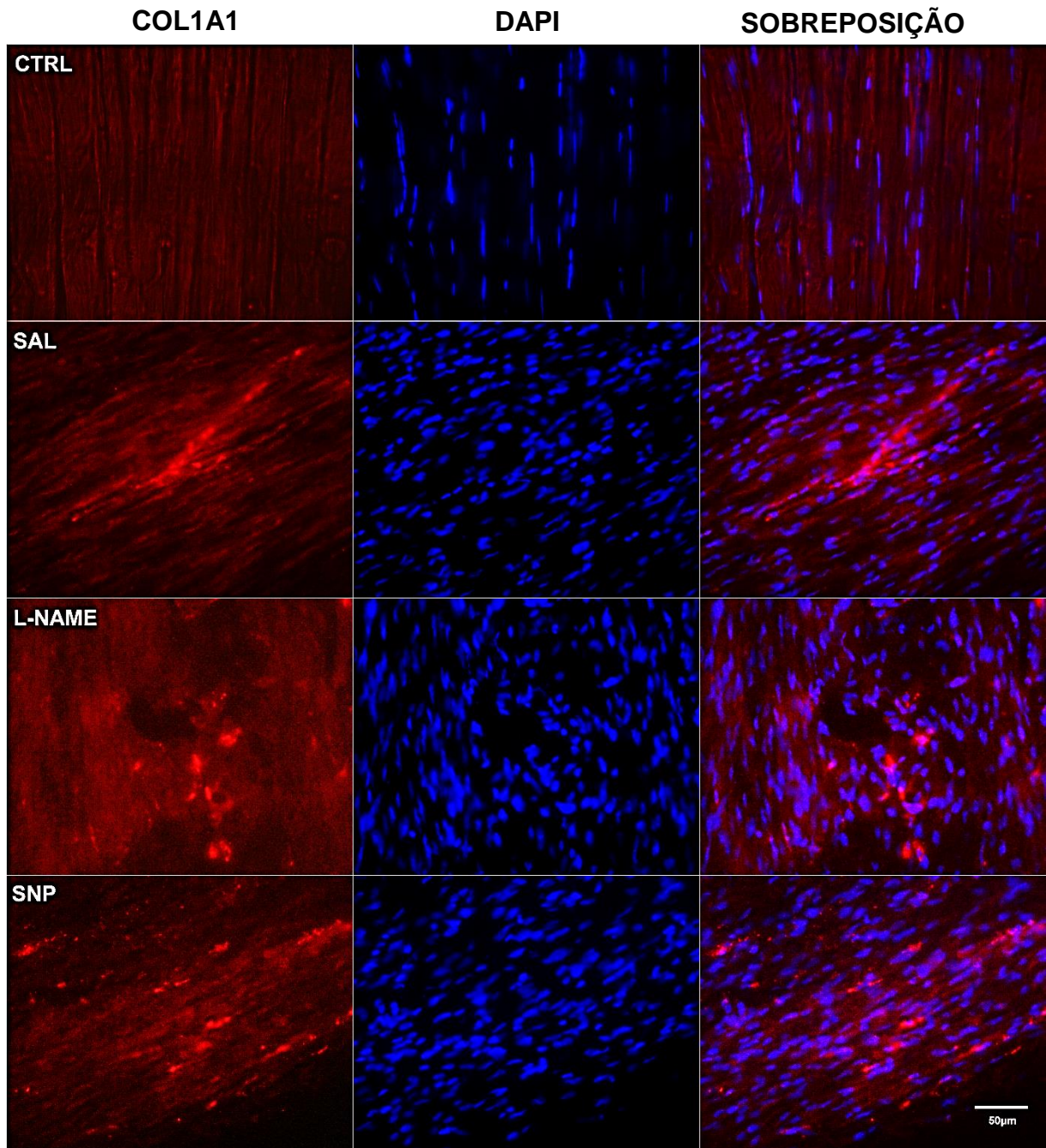
A marcação para colágeno I (COL1A1) é demonstrada na Figura 15. Verificamos que o grupo CTRL apresenta baixa expressão basal de colágeno (tanto na matriz quanto próximo ao núcleo – intracelular) não sendo detectada ativa produção dessa proteína, uma vez que o *turnover* é baixo em animais sadios. Nos grupos SAL, L-NAME e SNP, cujos animais sofreram lesão tendínea, identificamos a presença de células expressando altos níveis de colágeno (marcações intensas localizadas próximo aos núcleos, provavelmente indicando colágeno intracelular para secreção). No entanto, a exposição de colágeno ao aumento de NO, que ocorre nas condições experimentais SAL e SNP pareceu diminuir a deposição na matriz, sendo a inibição nitrérgica (L-NAME) mais eficiente para a deposição de colágeno I na matriz extracelular (marcação mais intensa para COL1A1 no meio extracelular).

#### 4.6. IMPLICAÇÃO DA MODULAÇÃO NITRÉRGICA NA ULTRAESTRUTURA DO TENDÃO DE ANIMAIS TENOTOMIZADOS

Para melhor detalhamento das imagens de MET, estas foram divididas em Figura 16, que mostra a organização da matriz extracelular e características celulares, e Figura 17, que destaca o perfil de secreção no momento de surgimento da fenda na membrana celular.

A análise ultraestrutural no grupo CTRL apresentou células alongadas e com pouco citoplasma (Figura 16, A e B). Em torno dos tenócitos são observadas fibras de colágeno maduras (indicado com \*), constatado pelo grande diâmetro das fibras. Podemos notar também a secreção do colágeno (Figura 17, A, indicado por seta), o que é mais difícil de ser encontrado no animal sadio devido à lenta taxa de reposição dessa proteína, que podem ser facilmente reconhecidas pelo formato arredondado de sua secção transversal.

No grupo SAL observamos células com morfologia muito diferente do CTRL, havendo maior característica de espalhamento e arredondamento das mesmas (Figura 16, D e E). A matriz próxima ao tenócito é representada por fibras de menor diâmetro e áreas sem fibras (indicado por ►). Em relação à secreção de proteínas, notamos que as cisternas do complexo de Golgi estão mais dilatadas, bem como suas vesículas secretórias (Figura 17, B, indicado com seta), porém contêm um material diferente do colágeno fibrilar.



**Figura 15.** Marcação imunofluorescente para COL1A1 em tendão de ratos submetidos a ruptura cirúrgica do tendão de Aquiles direito. A lesão induziu o aumento na expressão de colágeno tipo I, representado pelo aumento na marcação para COL1A1 em animais lesionados e tratados com SAL, L-NAME e SNP após 21 dias de lesão. O tratamento com L-NAME pareceu aumentar a deposição na matriz desse tipo de colágeno. Barra da escala = 50µm.

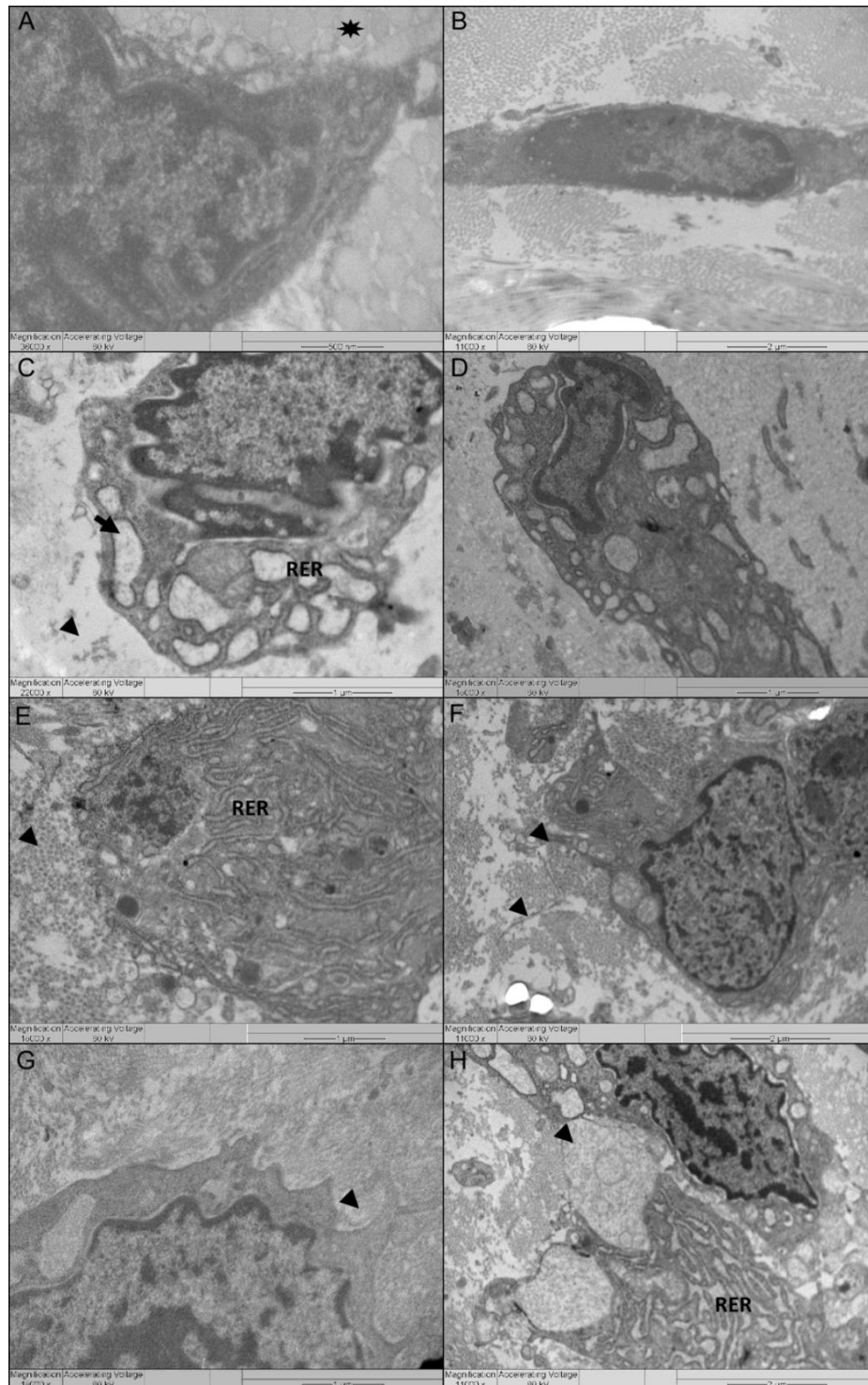
O grupo tratado com L-NAME (Figura 16, F e G) apresentou células arredondadas, porém com menor espriamento. Na matriz extracelular verificamos a presença de colágeno I, bem mais organizados em relação ao eixo longitudinal do tecido. O retículo endoplasmático rugoso desse grupo mostrou-se muito desenvolvido, porém as cisternas do complexo de Golgi mantiveram suas características morfológicas e as vesículas secretórias apresentam-se menores (Figura 17, C, indicado com seta). Contudo, notamos que o material sintetizado, imediatamente próximo à célula, e nas vesículas apresenta características morfológicas de colágeno, sugerindo alta deposição desse material na matriz. As membranas próximas a essas áreas demonstram ter sido recentemente incorporadas ou rearranjadas à membrana celular, o que pode ser evidenciado em ambas as imagens e sugere alta síntese (indicado por ►).

Por fim, no grupo tratado com SNP, as células do tecido tendinoso apresentaram também núcleo celular mais espalhado e arredondado, implicando em alteração fenotípica do tenócito. O retículo endoplasmático mostrou-se bem desenvolvido e mantendo as características normais das suas cisternas. Já as vesículas secretórias apresentam-se bem desenvolvidas e com material cuja eletrodensidade transita entre colágeno I (Figura 16, G e H, indicado por ►) e colágeno mais imaturo ou outra molécula (Figura 17 D, indicado por seta).

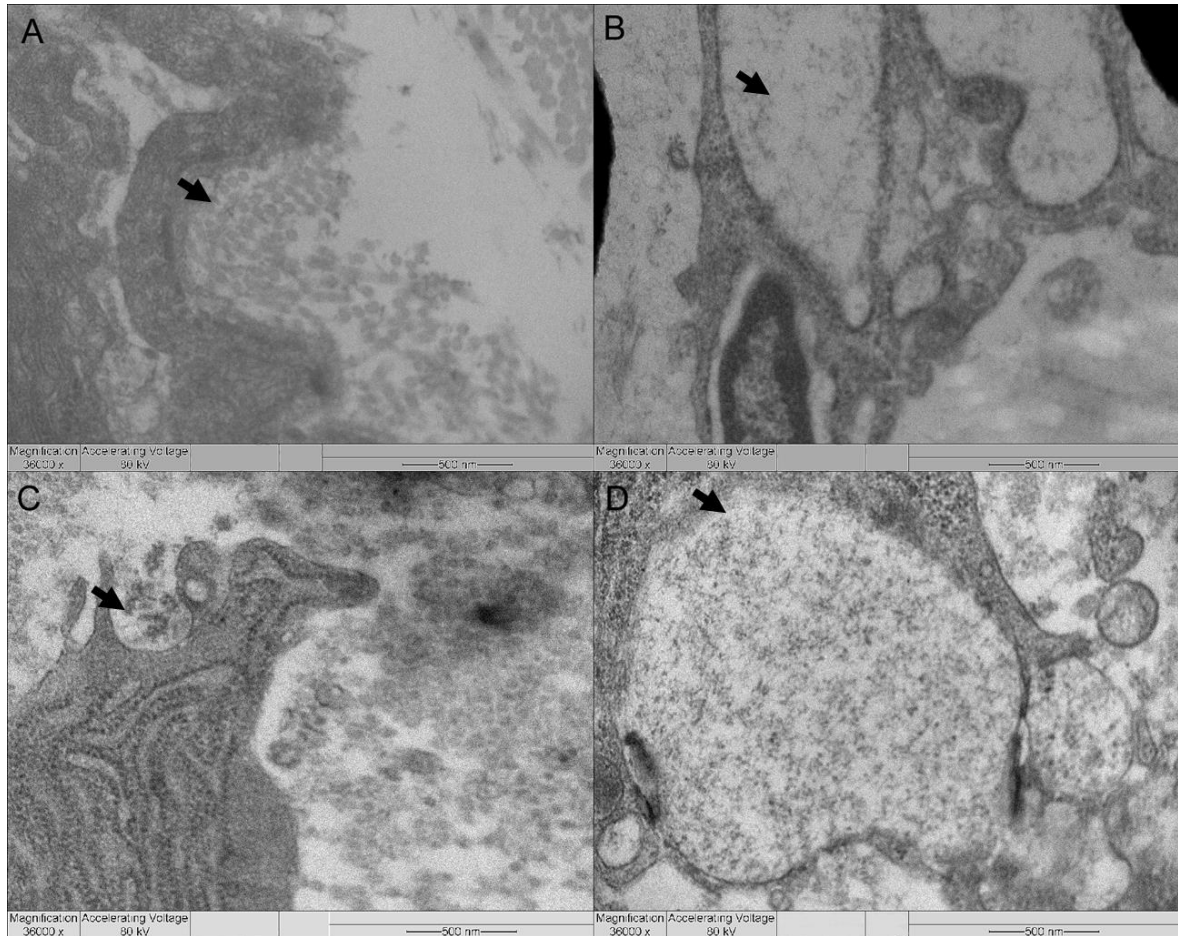
#### 4.7. EFEITO DA MODULAÇÃO NITRÉRGICA NO DIÂMETRO DE SECÇÕES TRANSVERSAS DE FIBRILAS DE COLÁGENO: ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL

Imagens obtidas por MET são apresentadas na Figura 18 (A-D) e a análise do diâmetro das fibrilas de colágeno são mostradas na Figura 19. Os resultados apontam que o grupo CTRL apresentou as características típicas de colágeno maduro, havendo formação de fibras bastante coesas, organizadas em relação ao eixo de longitudinal do tendão e com predomínio de fibras colágenas de grande diâmetro (indicado no tracejado da Figura 18). A maioria das fibras encontra-se com aproximadamente 210 nm. Em todos os grupos onde a lesão tendínea foi causada, houve aumento no número de fibras de menor diâmetro em detrimento das de maior diâmetro se comparado ao grupo CTRL ( $p < 0,0001$ ).

No grupo SAL foi observado menos coesão e áreas vazias entre as fibrilas de colágeno (indicado por ►), presença de áreas desordenadas em relação ao eixo longitudinal do tendão (indicado com \*), apesar do predomínio de áreas orientadas. Notamos também maior quantidade de fibras de menor diâmetro (30 a 40 nm, representando 22 e 25% do total, respectivamente), embora houvesse fibras mais espessas (100 nm representando 3% do total).



**Figura 16.** Imagens de microscopia eletrônica de transmissão mostrando a ultraestrutura do tendão de animais CTRL (A e B), SAL (C e D), L-NAME (E e F) e SNP (G e H). O \* indica uma fibrila colágena madura. Em C, o símbolo ► indica áreas sem matriz e a seta indica vesículas secretórias bem desenvolvidas. Em E, ► indica fibras de colágeno próximas a célula, enquanto que em F mostram membranas com característica de recente secreção de material. Em G e H, cabeças de setas destacam vesículas secretórias bem desenvolvidas. As barras da escala variam entre 500 nm e 2  $\mu$ m.



**Figura 17.** Imagens de microscopia eletrônica de transmissão mostrando a ultraestrutura do tendão de animais CTRL (A), SAL (B), L-NAME (C) E SNP (D). As setas indicam áreas de fenda na membrana para secretar o material sintetizado. Em A e C notamos síntese de material análogo ao colágeno I. Em B e D um material diferente do colágeno fibrilar está sendo sintetizado. Barras da escala: 500 nm.

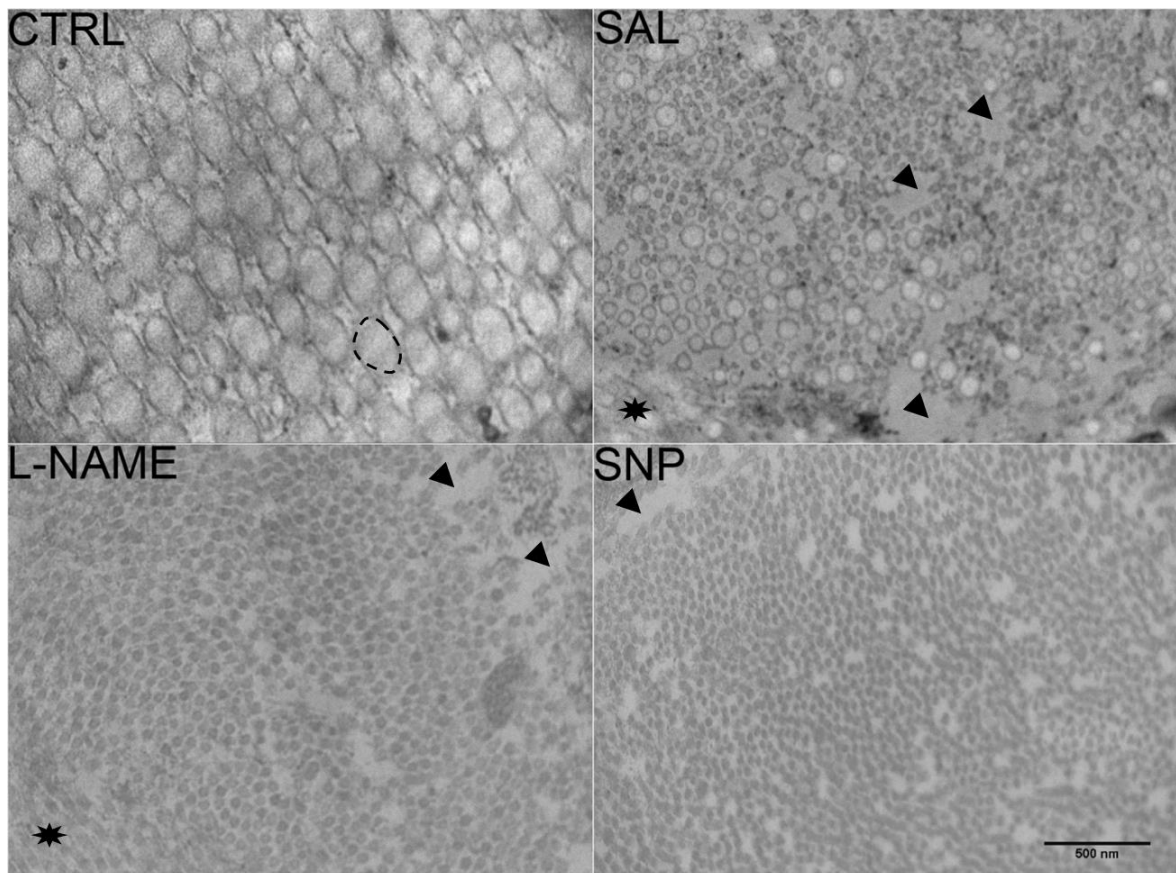
Na avaliação do grupo cujo bloqueio nitrérgico foi realizado (L-NAME), identificamos uma tendência de maior coesão entre as fibras se comparado ao SAL, apesar da existência de algumas áreas onde o material colágeno estava ausente (indicado por ►). Verificamos que o padrão de orientação das fibras tende a ocorrer em relação ao eixo longitudinal do tecido, apesar de haver áreas de desorientação destas fibras (indicado com \*). Notamos também grande quantidade de fibras com diâmetros semelhantes, não havendo variação estatística em sua distribuição para esse grupo, de modo que a maioria das fibras, representando 40% do total, apresentava aproximadamente 40 nm, contra 0,3% de fibras com 100 nm de diâmetro.

Em relação ao grupo tratado com doador de NO, o SNP, analisamos maior coesão entre as fibras se comparados ao SAL, havendo também áreas com ausências desse material (indicado por ►). As fibrilas tendem a se organizar em relação ao eixo longitudinal do tecido, contudo o diâmetro da sua secção transversal apresentou maior frequência dos menores diâmetros (entre 30 a 40 nm, representando 33 e 37%, respectivamente) em relação ao grupo L-NAME e SAL,  $p < 0.0001$ . Por outro lado, seu maior diâmetro, em torno de 70 nm é representado por apenas 0,4% do total quantificado.

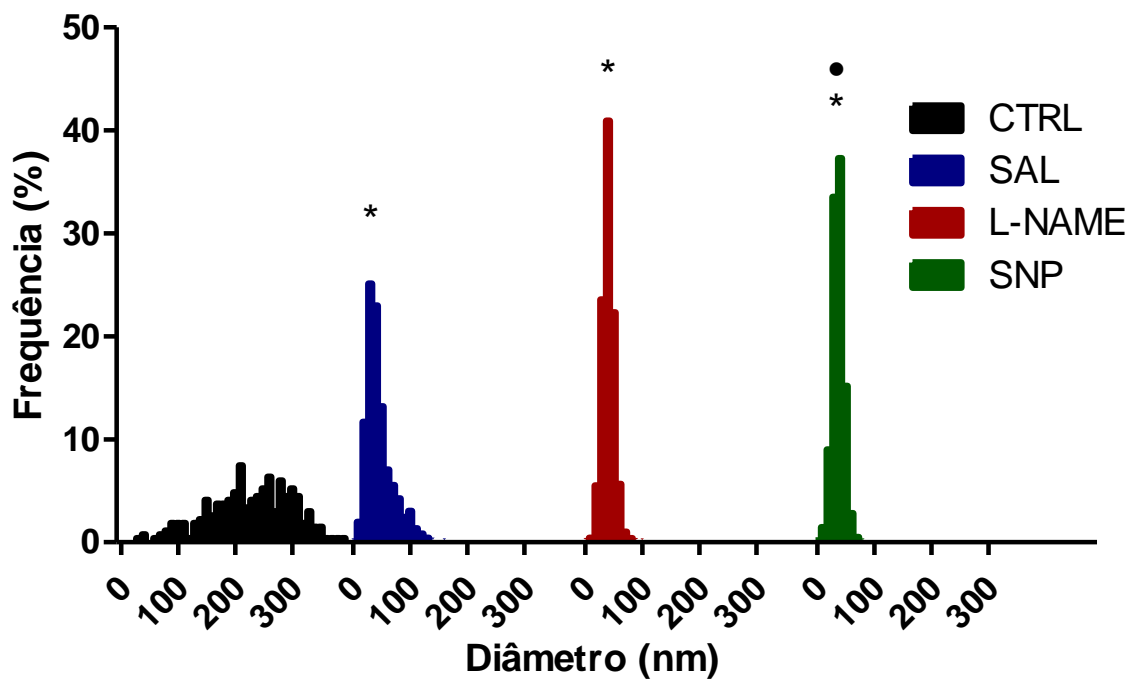
#### 4.8. PAPEL DA MODULAÇÃO NITRÉRGICA NA PLASTICIDADE PERIFÉRICA ATRAVÉS DA EXPRESÃO DE GFAP NO TENDÃO DE AQUILES DE RATOS

Imunomarcações para GFAP foram realizadas com o intuito de inferir a localização do nervo ou dos ramos nervosos presentes no tendão de Aquiles lesionado em nosso modelo, identificar sua orientação e analisar possíveis variações na expressão desse filamento com os tratamentos testados. Nos tendões do grupo CTRL não foi possível detectar a expressão de GFAP, portanto o nervo não estava presente entre a malha colágena (Figura 20).

Já nos grupos que sofreram lesão foi possível localizar a marcação para GFAP. Além disso, é importante destacar que houve diferença na organização entre os nervos encontrados. Nos grupos SAL e L-NAME, ramos nervosos predominantemente mais espessos em relação ao SNP aparecem orientados longitudinalmente em relação ao eixo do tendão e localizado mais periféricamente a este.



**Figura 18.** Imagens de microscopia eletrônica de transmissão mostrando a ultraestrutura do tendão de animais CTRL (A), SAL (B), L-NAME (C) E SNP (D). O tracejado destaca a fibra de colágeno em secção transversal. As cabeças de seta indicam áreas de ausência de matriz extracelular. O \* indica áreas desorganizadas em relação ao eixo longitudinal do tecido. Barra da escala: 500 nm.



**Figura 19. Distribuição de frequência dos diâmetros de fibrilas de colágeno em tendões dos grupos CTRL, SAL, L-NAME e SNP.** A frequência de distribuição de fibrilas de 4 campos analisados provenientes de animais distintos são mostradas. Notar a presença de diâmetros maiores apenas no grupo CTRL. \* vs CTRL. • vs SAL e SNP. Mann–Whitney U,  $p < 0,0001$ .



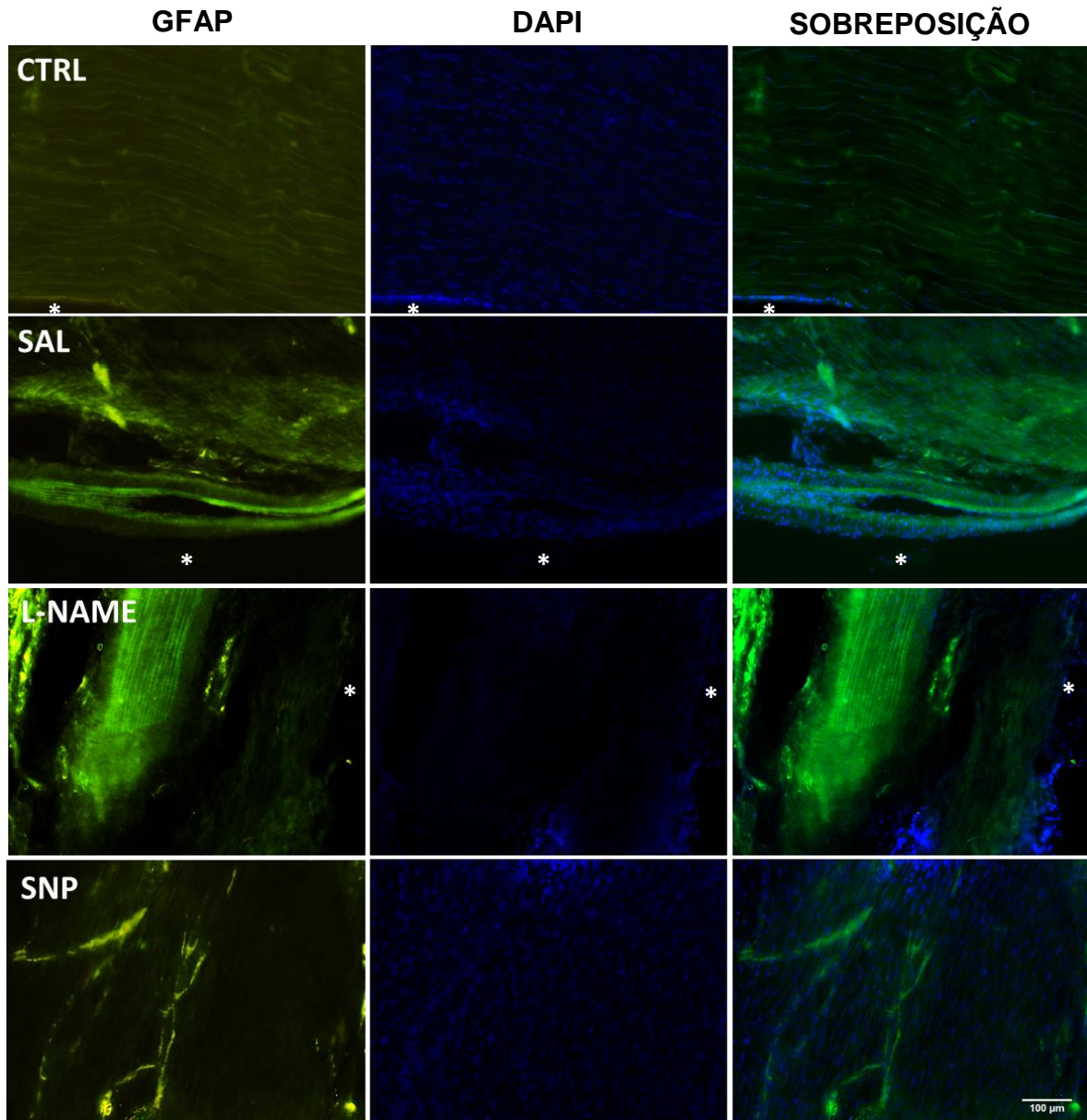
No grupo SNP foi identificado ramos nervosos mais delgados, de orientação dispersa no tecido, porém com tendência de organização longitudinal cuja localização, diferente dos demais, adentrava mais a malha de colágeno.

Quanto a variação da reatividade glial, inferida pela intensidade na expressão de GFAP, foi identificado que os grupos SAL e L-NAME apresentam intensidade de marcação similar, porém como os ramos do SAL são mais delgados se comparado ao L-NAME, sugerimos menos expressão nesse grupo. O mesmo ocorre com o SNP, cuja reatividade foi a mais fraca de todas. Notar também que envolvendo os nervos demonstrados em SAL e L-NAME há uma camada espessa do que parece ser a membrana epineuro do nervo.

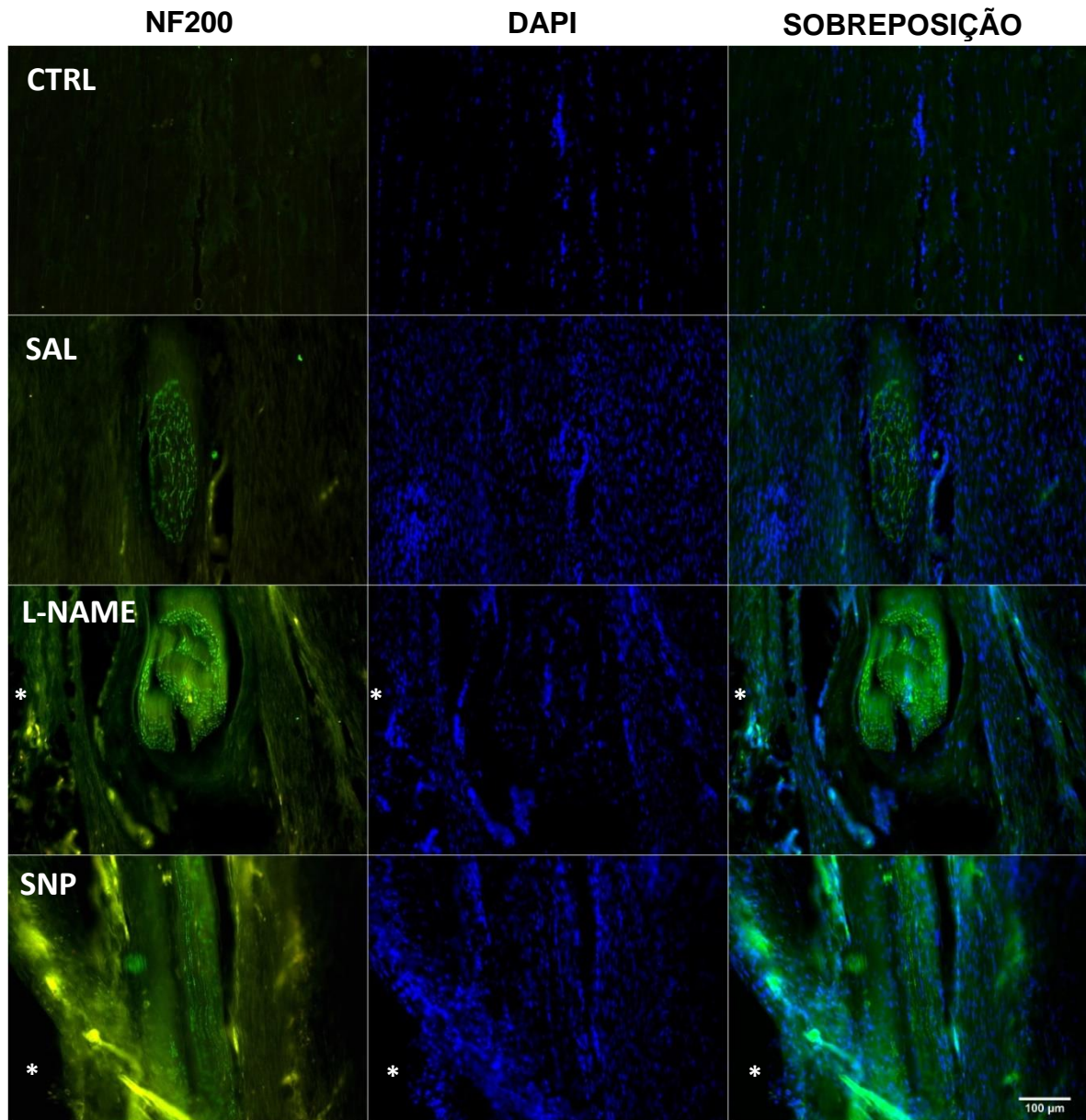
#### 4.9. EFEITO DA MODULAÇÃO NITRÉRGICA NA PLASTICIDADE PERIFÉRICA: EXPRESSÃO DE NF200 NO TENDÃO DE AQUILES DE RATOS

Após análise da marcação para NF200 (Figura 21) no microscópio confocal, verificamos que o grupo CTRL, conforme já descrito pela literatura, não apresenta inervação entre a malha de colágeno do tendão, assim como foi também apresentado para a marcação de GFAP. No grupo SAL foi identificada a presença de nervos entre a malha colágena, embora a marcação seja mais fraca se comparada ao grupo L-NAME. Na imagem representativa é possível notar que sua orientação é predominantemente longitudinal em relação ao tecido, porém devido a sua morfologia cilíndrica e sua analogia a um tubo, o qual é composto por vários axônios de neurônios, a secção em diagonal do “tubo” identificada na figura sugere que esse ramo nervoso segue um trajeto não totalmente paralelo ao tecido.

Nos grupos tratados com L-NAME e SNP, fica evidente a presença dos ramos nervosos, os quais estão localizados bem próximos a borda do tecido, podendo ser visualizado em ambos os grupos. Entretanto, é notável que o grupo L-NAME exibiu marcação mais intensa dentre os outros grupos. Tomando como referência novamente o eixo longitudinal do tendão, e sabendo-se que o tecido foi seccionado inteiramente no sentido longitudinal, é possível deduzir pela morfologia do nervo que, no grupo L-NAME, a orientação do ramo nervoso é mais transversal em relação a malha de colágeno. Diferente do que é observado no L-NAME, o grupo SNP foi o que mais pareceu ter o ramo nervoso orientado em relação ao eixo longitudinal do tecido. Conforme a figura indica, o trajeto do nervo, pela perspectiva do corte, foi totalmente longitudinal, embora a marcação seja mais fraca.



**Figura 20.** Imunofluorescência para GFAP e marcação para DAPI em cortes longitudinais do tendão de Aquiles de ratos após 21 dias de lesão tendínea acompanhada dos tratamentos locais. Barra da escala 100 µm. \* indica borda do tecido.



**Figura 21.** Marcação imunofluorescente para NF200 e DAPI em cortes longitudinais (20 $\mu$ m) de tendão de ratos após 21 dias pós lesão cirúrgica do tendão de Aquiles direito. Barra da escala 100  $\mu$ m. \* indica a borda do tecido.

#### 4.10. ESTUDO DA PLASTICIDADE NA MEDULA ESPINHAL APÓS LESÃO TENDÍNEA: CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA E EXPRESSÃO DE GFAP

A fim de caracterizar o tecido, foi realizado histoquímica para hematoxilina e eosina na medula espinhal de animais lesionados sem nenhum tipo de intervenção após 2 ou 21 dias de recuperação tendínea.

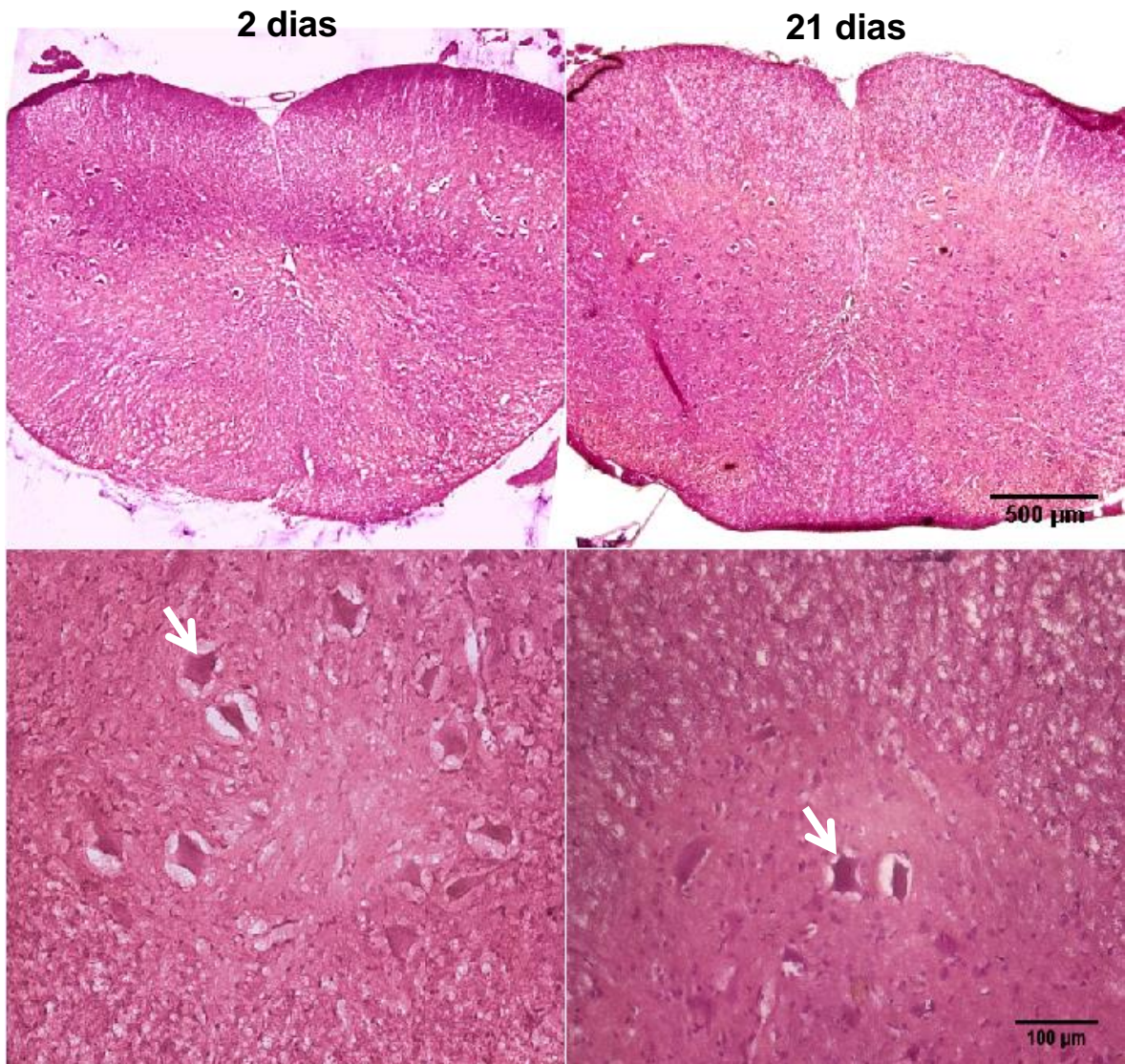
Verificamos na Figura 22 secções transversais da medula espinhal coradas com H&E e visualizadas no aumento de 4x ou 20x sob microscopia de campo claro. As secções foram obtidas de animais após 2 ou 21 dias de lesão tendínea. O tecido coletado em ambos os dias, do mesmo segmento lombar da medula espinhal, segue o mesmo padrão de organização e integridade. Notar a preservação e integridade de grupos de motoneurônios e células menores entremeando-os, bem como as principais estruturas da medula espinhal, a qual também será usada para a técnica de imunofluorescência.

Para esse estudo, conforme descrito previamente, utilizamos o segmento lombar referente à inervação do tendão de Aquiles, o L5. Este segmento foi localizado durante dissecação da medula espinhal inteira e conforme presença da intumescência lombar. Além disso, a morfologia típica deste segmento lombar visualizado em corte transversal é de fácil identificação, conforme demonstra a Figura 23, a qual também identifica as regiões da medula espinhal. Baseado na composição celular, notar a substância branca (2) onde se encontram células gliais e axônios e a substância cinzenta (1), onde são encontrados predominantemente os corpos neuronais. Quanto à função, os cornos ventrais (A e B) correspondem aos neurônios responsáveis por conduzir informação de contração muscular, enquanto os cornos dorsais (C e D) conduzem informações sensoriais aos centros de processamento.

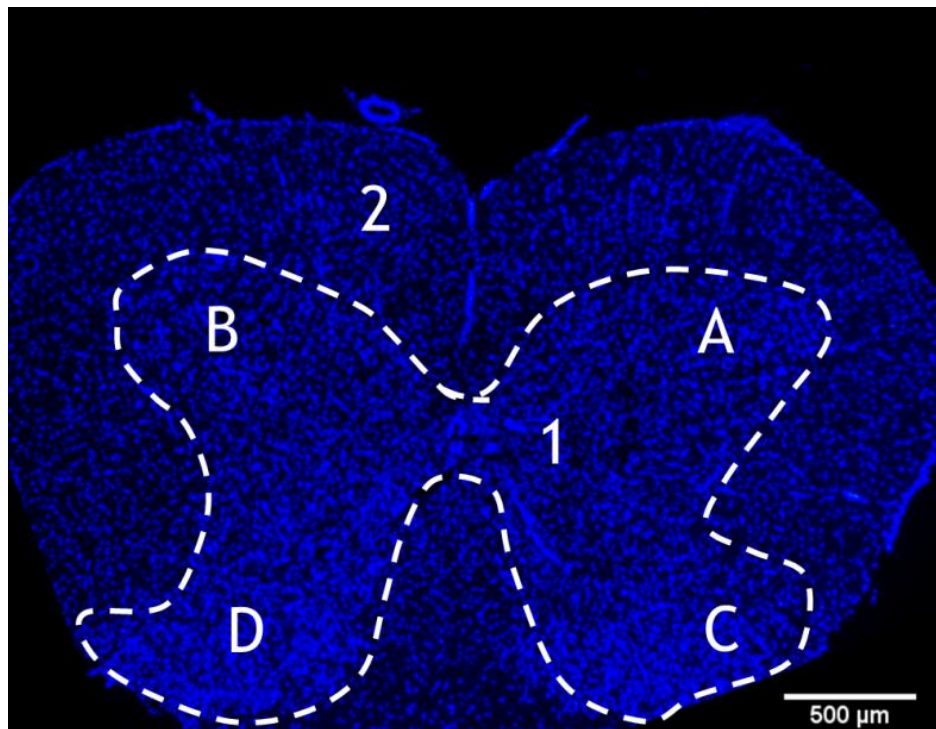
O anticorpo anti-GFAP também foi utilizado para marcar as secções de L5 da medula espinhal dos animais que sofreram lesão e tiveram o tecido analisado em 2 e 21 DPL.

Os resultados mostram que em 2 DPL houve aumento significativo na marcação para GFAP, o que foi identificado em todos os quadrantes da medula. Contudo, em 21 DPL essa reatividade já havia reduzido consideravelmente. A marcação foi mais expressiva nas regiões da substância branca (Figuras 24, 25, 26, 27).

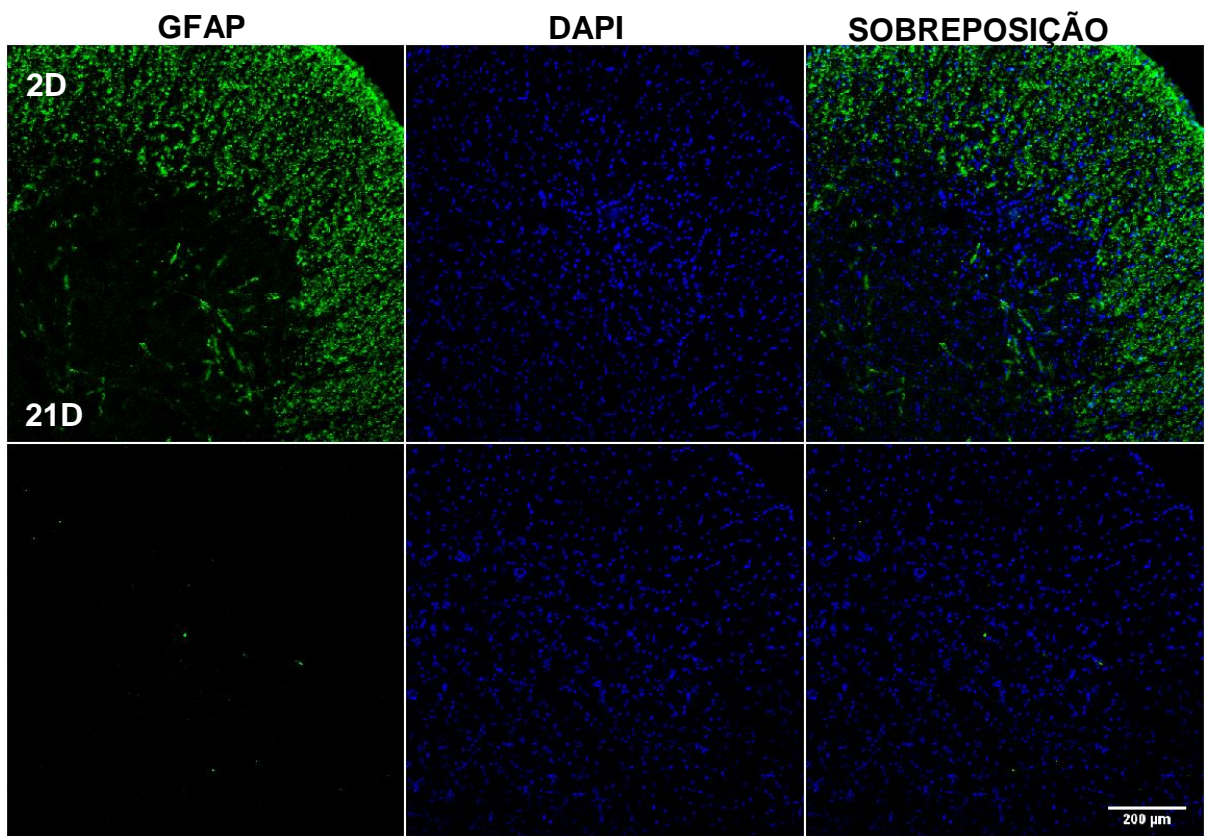
Ao analisar a marcação para GFAP de animais sem nenhum tipo de injúria verificamos uma reatividade glial muito fraca, bastante diferente do que é encontrado no 2º DPL (Figura 28). O controle negativo da marcação (sem o anticorpo primário) é observado também na figura 28.



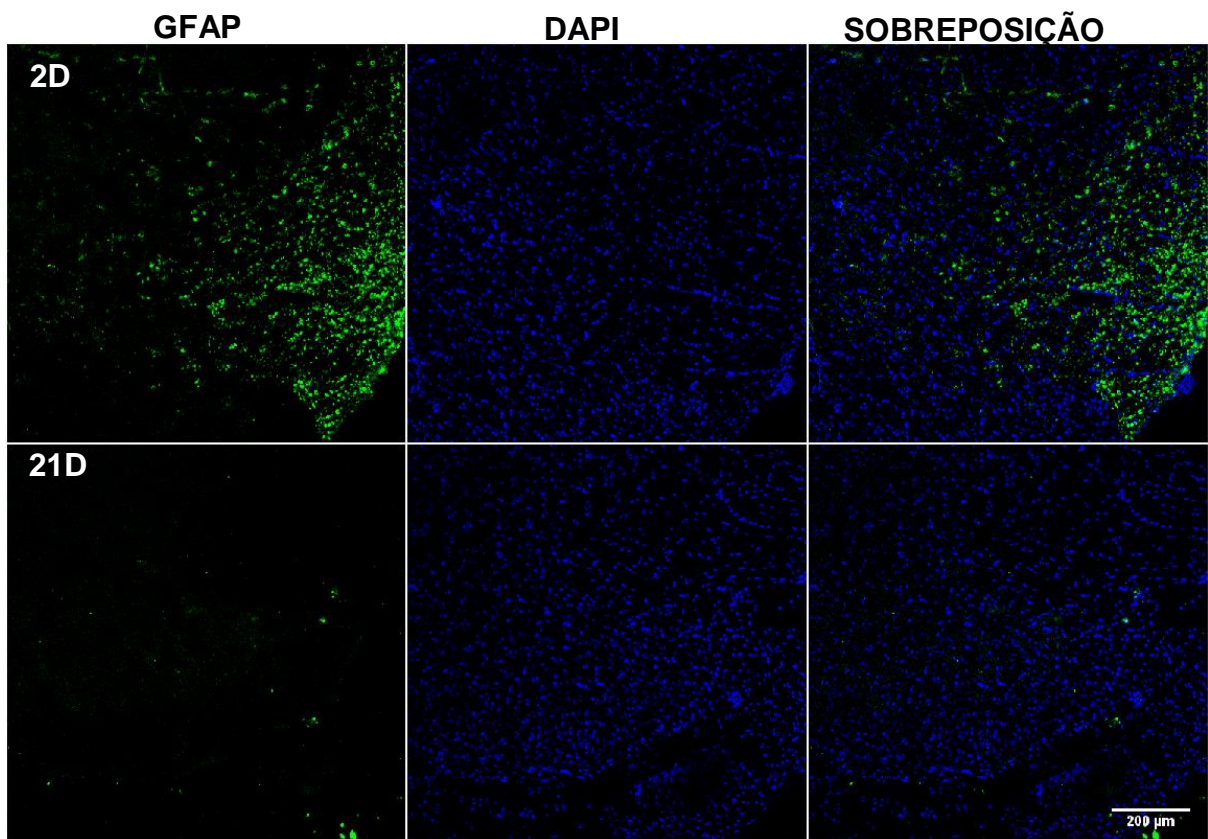
**Figura 22.** Coloração por hematoxilina & eosina em cortes transversais da medula espinhal de ratos no segmento lombar L5 da medula espinhal após 2 (primeira coluna) e 21 dias (segunda coluna) de lesão. Os cortes têm 20 μm de espessura. Barra da escala: 500 μm e 100 μm. → indicam motoneurônios.



**Figura 23.** Representação das amostras de medula espinhal marcadas com DAPI utilizadas no estudo dos efeitos da lesão no tendão de Aquiles sobre a plasticidade no SNC. Foram usados cortes referentes ao segmento L5 da medula espinhal dos animais. 1 - Substância cinzenta; 2 - Substância branca; A - Corno ventral direito; B - Corno ventral esquerdo; C - Corno dorsal direito; D - Corno dorsal esquerdo.

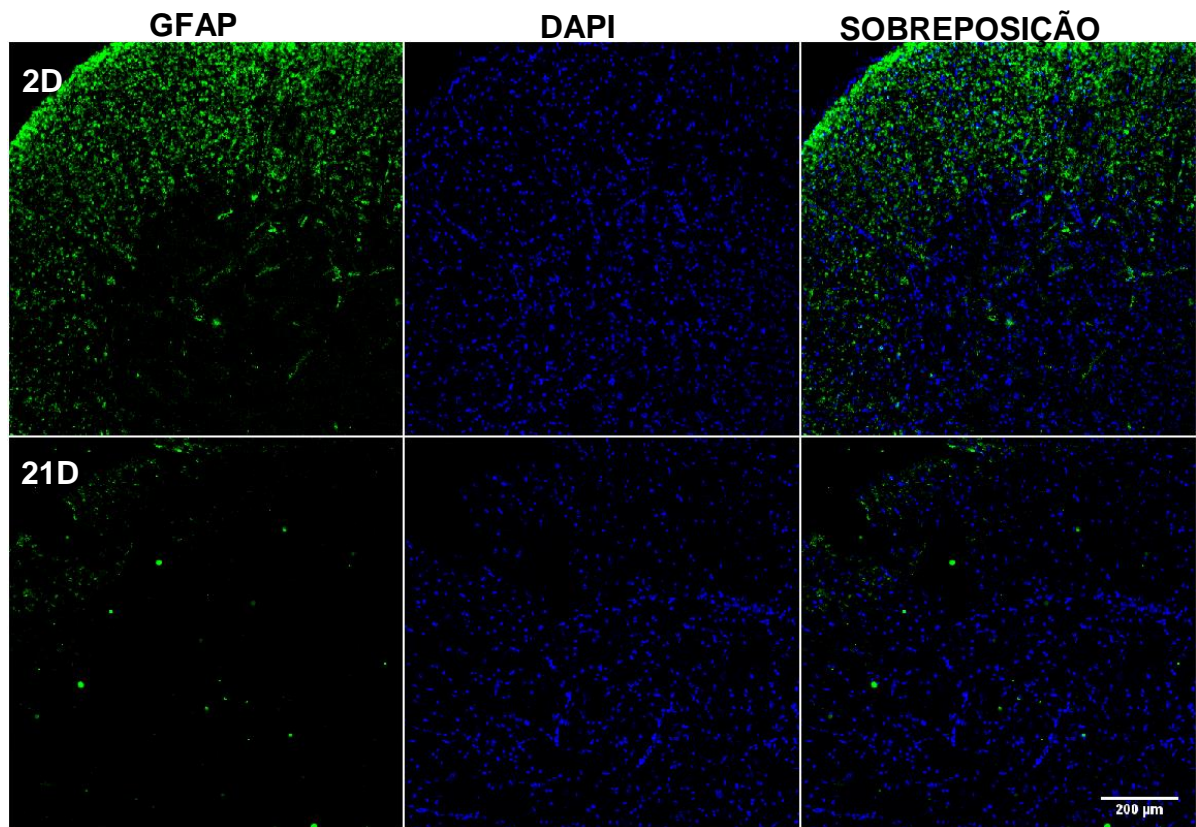


**Figura 24.** Marcação imunofluorescente para GFAP e marcação por DAPI em cortes transversais do segmento L5 da medula espinhal após 2 (2D) e 21 dias (21D) de lesão tendínea. As imagens representam a região ventral direita da medula, onde fica evidente o corno ventral direito. Barra da escala 200  $\mu\text{m}$ .

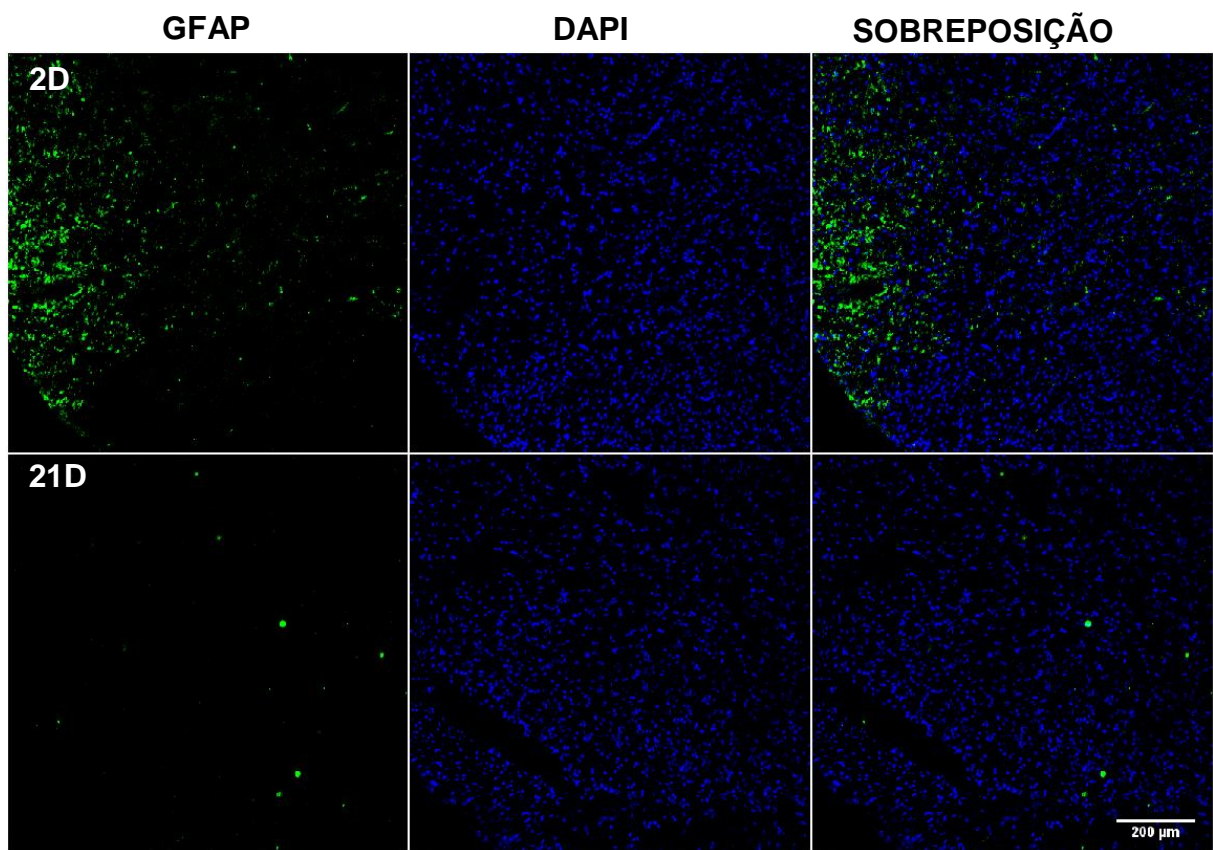


**Figura 25.** Marcação imunofluorescente para GFAP e marcação por DAPI em cortes transversais do segmento L5 da medula espinhal após 2 (2D) e 21 dias (21D) de lesão tendínea. As imagens representam a região dorsal direita da medula, onde fica evidente o corno dorsal direito. Barra da escala 200  $\mu\text{m}$ .

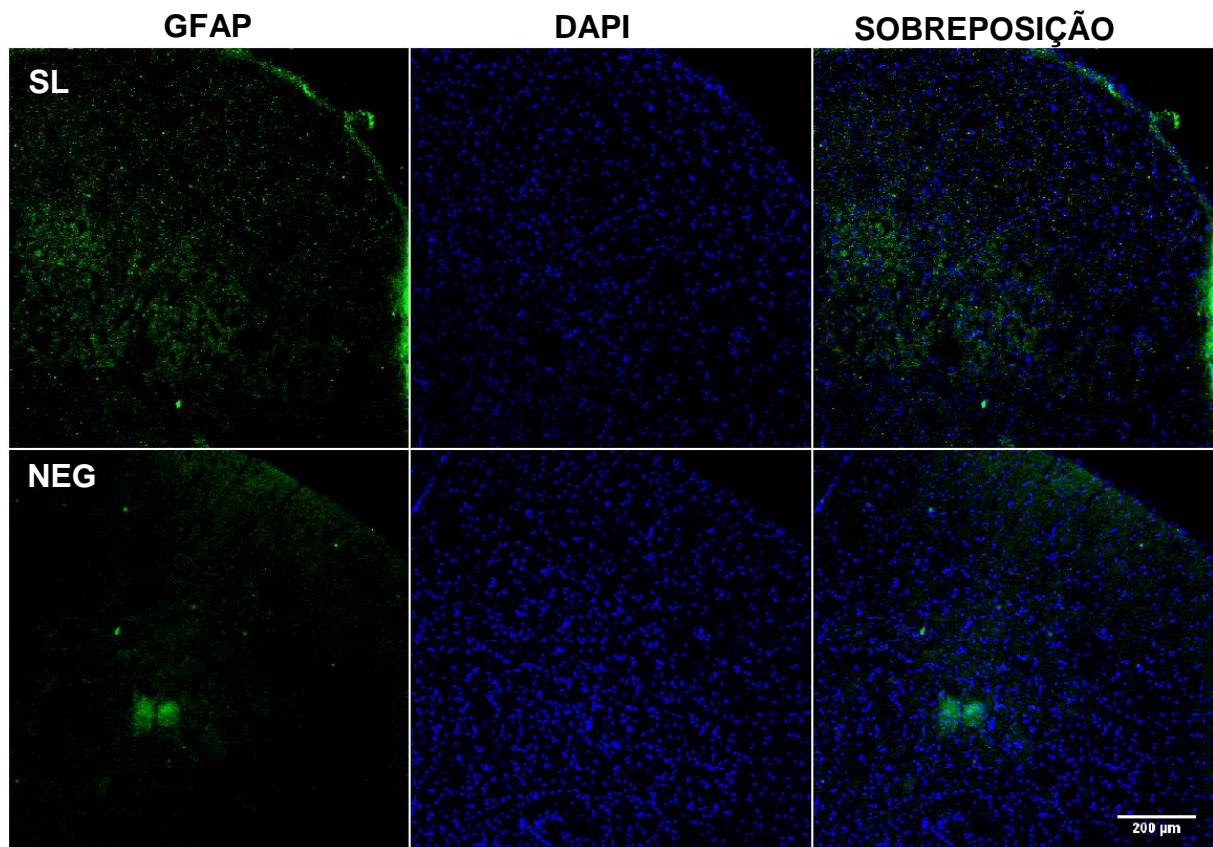




**Figura 26.** Marcação imunofluorescente para GFAP e marcação por DAPI em cortes transversais do segmento L5 da medula espinhal após 2 (2D) e 21 dias (21D) de lesão tendínea. As imagens representam a região ventral esquerda da medula, onde fica evidente o corno ventral esquerdo. Barra da escala 200  $\mu\text{m}$ .



**Figura 27.** Marcação imunofluorescente para GFAP e marcação por DAPI em cortes transversais do segmento L5 da medula espinhal após 2 (2D) e 21 dias (21D) de lesão **tendínea**. As imagens representam a região dorsal esquerda da medula, onde fica evidente o corno dorsal esquerdo. Barra da escala 200  $\mu\text{m}$ .



**Figura 28.** Marcação imunofluorescente para GFAP e marcação por DAPI em cortes transversais do segmento L5 da medula espinhal. Usamos ratos sem lesão (SL) e no controle negativo (NEG) da marcação, que corresponde a animais no 2º dia de lesão na omissão do anticorpo primário. As imagens representam a região ventral direita da medula. Barra da escala 200 µm.

#### 4.11. EFEITO DA MODULAÇÃO NITRÉRGICA NA PLASTICIDADE DO SNC: EXPRESSÃO DE GFAP E CO-LOCALIZAÇÃO COM c-Fos NO SEGMENTO L5 DA MEDULA ESPINHAL.

Toda condução aferente ou eferente de informação referente ao tendão de Aquiles direto se dá no lado direito da medula, portanto é ipsilateral à lesão. Nesse sentido, buscamos analisar as co-localizações entre glia e o indicador de célula ativa, c-Fos, comparando as marcações com o lado contralateral da medula.

Na figura 29 observa-se imagens obtidas por microscopia confocal com fatia ótica mais fina (<15 µm) para auxiliar na confirmação de co-localização entre os dois marcadores utilizados. O padrão de marcação para GFAP na região dorsal ipsilateral à lesão não altera em relação ao que foi mostrado previamente, havendo mais imunomarcação no 2º DPL, contudo o menor sinal é referente a redução da fatia ótica selecionada. A marcação para c-Fos demonstrou estar mais presente também no início da lesão, de modo que 2 DPL há mais marcação que em 21 DPL. Quanto a co-localização c-Fos-astrócito, notamos haver maior ocorrência desta após 2 DPL. Ressaltamos que a região dorsal contralateral à lesão apresentou pouca marcação para c-Fos em ambos os períodos de tempo estudados, sugerindo, baixa atividade celular.

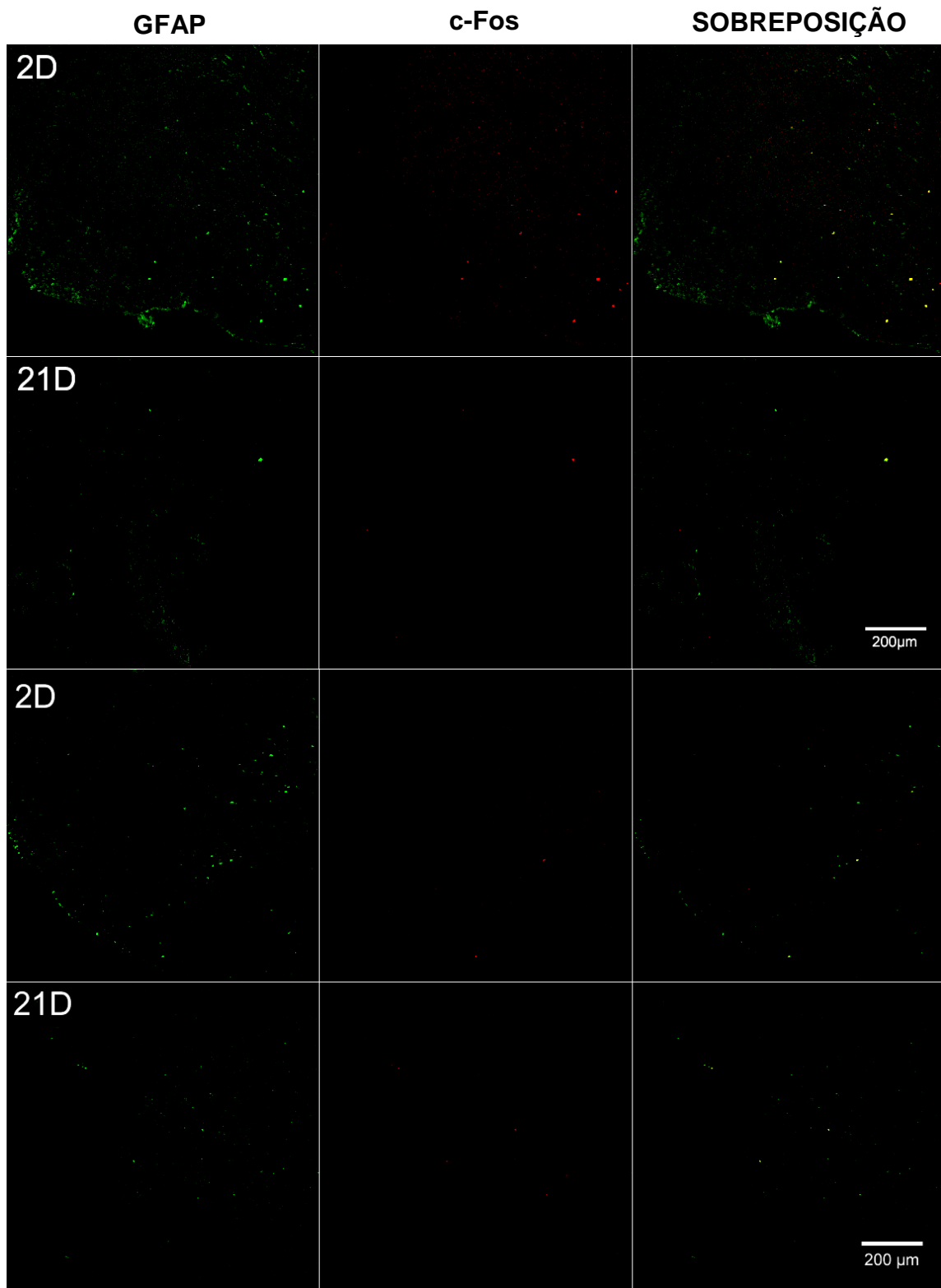
Na região ventral ipsilateral da medula espinhal (Figura 30), encontramos novamente mais reatividade glial no 2º DPL. A marcação para c-Fos nessa região manteve padrões parecidos em 2 e 21 DPL, e foi menos evidentes se comparados a região dorsal no 2º DPL. Poucas co-localizações c-Fos-glia podem ser evidenciadas em 2 e 21 DPL no lado ipsilateral ventral. Por outro lado, praticamente não houve marcação para c-Fos na área ventral contralateral a injúria.

#### 4.12. IMPLICAÇÃO DA MODULAÇÃO NITRÉRGICA NA PLASTICIDADE DO SNC: EXPRESSÃO DE NF200 E CO-LOCALIZAÇÃO COM c-Fos NO SEGMENTO L5 DA MEDULA ESPINHAL.

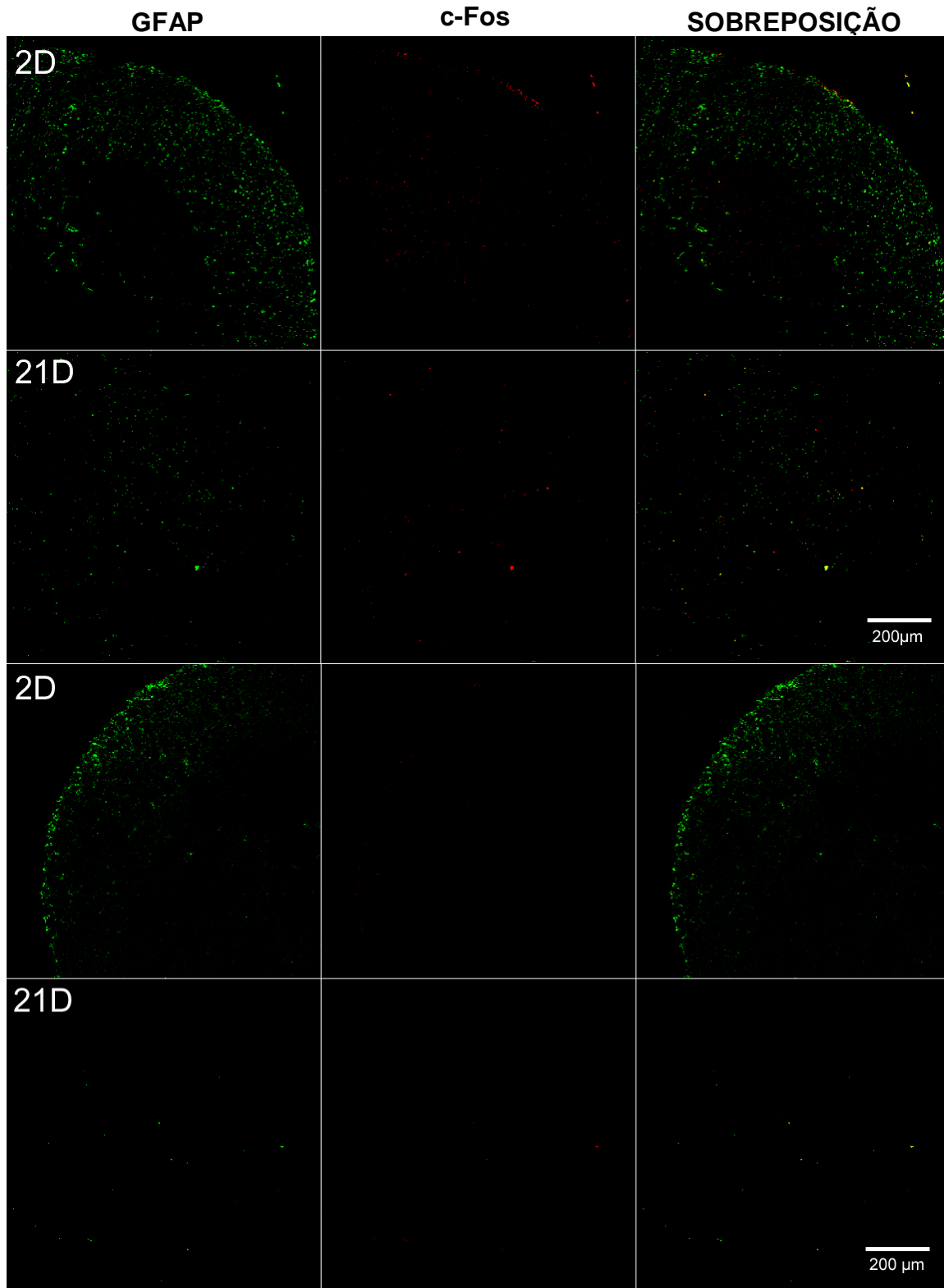
A imunomarcação para NF200 e c-Fos é apresentada na Figura 31. A marcação para NF200 não apresentou diferença entre os dias e entre as regiões da medula espinhal analisadas. Contudo, identificamos predomínio de marcação para c-Fos e co-localização c-

Fos-neurônio após 2 DPL na área dorsal ipsilateral a injúria, sendo constatado pouca marcação no lado contralateral, na mesma área e no mesmo período analisado. Em 21 DPL houve marcação e co-marcação bem evidente, porém mais discreta que em 2 DPL para c-Fos e c-Fos-neurônio na região dorsal ipsilateral da medula. Praticamente não houve marcação no lado contralateral no 21º DPL.

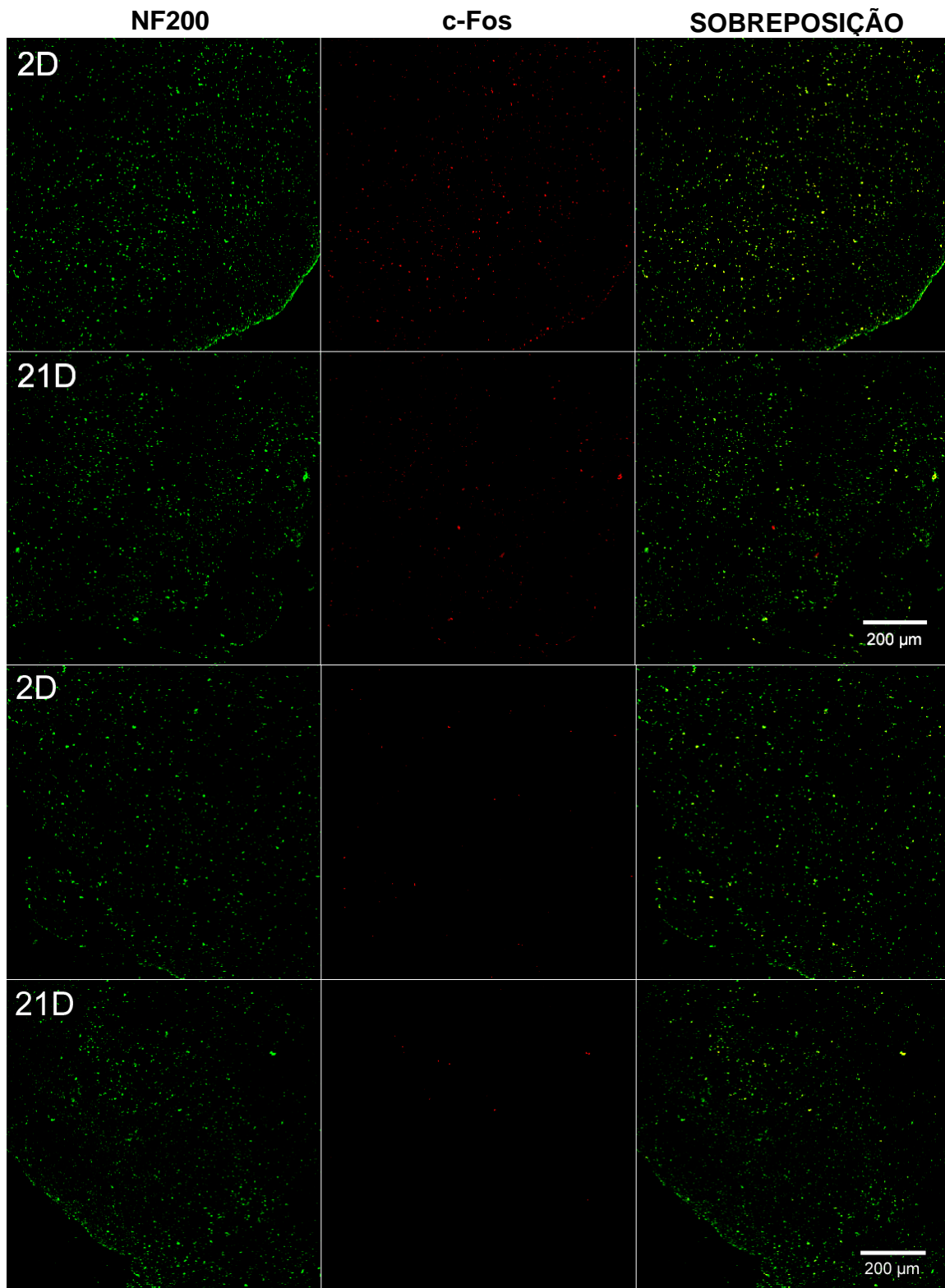
Na região ipsilateral ventral da medula espinhal identificamos aumento na marcação de c-Fos e co-localização c-Fos-neurônio majoritariamente no 2º DPL se comparado ao 21 DPL, embora em ambos os dias a marcação seja evidente. No lado contralateral a lesão notamos praticamente ausência da marcação para c-Fos nos mesmos dias analisados (Figura 32). Deste modo, o lado da medula equivalente ao lado do tendão lesionado foi o que apresentou maior aumento da atividade celular neuronal tanto em regiões ventrais quanto dorsais. Esse dado sugere ativação neuronal ipsilateral a medula na fase inicial e, de modo menos intenso, na fase tardia da lesão.



**Figura 29.** Dupla marcação imunofluorescente para GFAP e c-Fos em cortes transversais do segmento L5 da medula espinhal após 2 (2D) e 21 dias (21D) de lesão **tendínea**. As imagens representam a região dorsal direita, ipsilateral a lesão, e abaixo, a região dorsal esquerda da medula espinhal, contralateral a lesão. Fatia ótica < 15 µm. Barra da escala 200 µm.

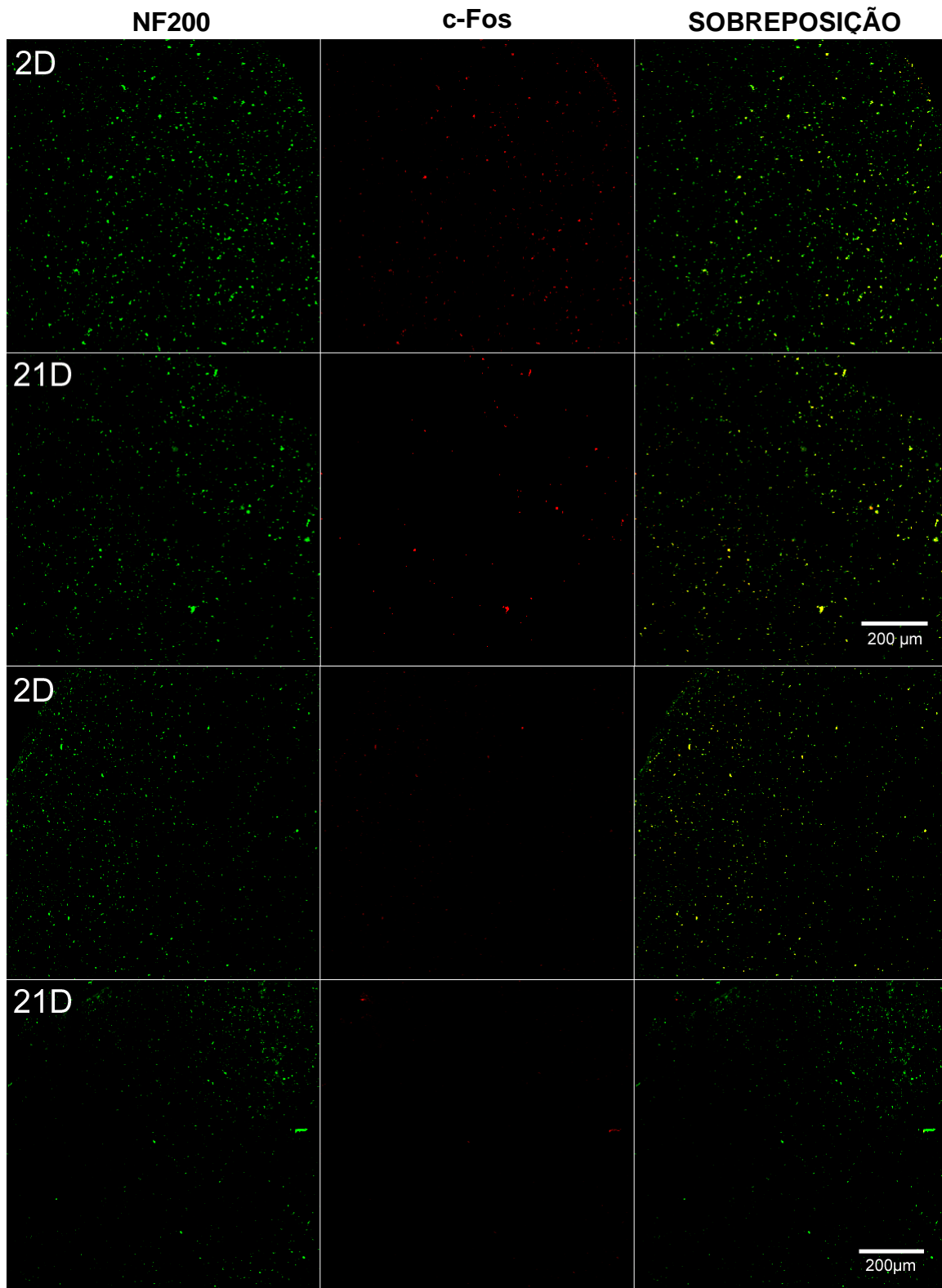


**Figura 30.** Dupla marcação imunofluorescente para GFAP e c-Fos em cortes transversais do segmento L5 da medula espinhal após 2 (2D) e 21 dias (21D) de lesão tendínea. As imagens representam a região ventral direita, ipsilateral a lesão, e abaixo, a região ventral esquerda da medula espinhal, contralateral a lesão. Fatia ótica < 15  $\mu\text{m}$ . Barra da escala 200  $\mu\text{m}$ .



**Figura 31.** Dupla marcação imunofluorescente para NF200 e c-Fos em cortes transversais do segmento L5 da medula espinhal após 2 (2D) e 21 dias (21D) de lesão **tendínea**. As imagens representam a região dorsal direita, ipsilateral a lesão, e abaixo, a região dorsal esquerda da medula espinhal, contralateral a lesão. Fatia ótica < 15  $\mu\text{m}$ . Barra da escala 200  $\mu\text{m}$ .





**Figura 32.** Dupla marcação imunofluorescente para NF200 e c-Fos em cortes transversais do segmento L5 da medula espinhal após 2 (2D) e 21 dias (21D) de lesão **tendínea**. As imagens representam a região ventral direita, ipsilateral a lesão, e abaixo, a região ventral esquerda da medula espinhal, contralateral a lesão. Fatia ótica < 15 μm. Barra da escala 200 μm.

## 5 DISCUSSÃO

Nessa pesquisa, buscamos inicialmente investigar os efeitos da modulação nitrérgica em parâmetros associados à regeneração do tendão calcâneo de ratos. Essa lesão é bem frequente, especialmente em atletas, e o seu reparo apresenta dificuldades e demora associado a fatores ainda pouco conhecidos (PUFE *et al*, 2005; RILEY, 2008; MAFFULLI *et al*, 2008). Uma das consequências mais comuns na lesão, independente da hipótese etiológica, é justamente o aumento na concentração de NO no local da lesão (MURRELL *et al*, 1997; LIN *et al*, 2001a; LIN *et al*, 2001b; LONGO; RONGA; MAFFULLI, 2009, SHARMA; MAFFULLI, 2006).

Nossos resultados, baseados na modulação nitrérgica, perpassam por análise do ganho de massa corpórea do animal, um fator que infere sobre o estado metabólico em condições nutricionais normais. Já foi reportado na literatura que a inibição sistêmica da NOS em animais cujo tendão foi lesionado mecanicamente resultou em prejuízo da regeneração tecidual (MURRELL *et al*, 1997; TOMIOSSO *et al*, 2010; XIA *et al*, 2005; DARMANI; CROSSAN; CURTIS, 2004). Contudo, em nossos experimentos, a inibição nitrérgica restrita apenas ao local da injúria apresentou importante melhora histológica e funcional e não interferiu significativamente em níveis sistêmicos no animal.

Sabe-se que da mesma forma que altas quantidades de NO geram citotoxicidade, baixas concentrações são de extrema importância para eventos fisiológicos (VALKO *et al*, 2007; MONCADA; HIGGS, 1995; MONCADA, 1999; VALLANCE, 2003; ABRAMSON, 2008; KAWANO *et al.*, 2009), portanto, um modelo de inibição da NOS que não altere parâmetros sistêmicos é importante para minimizar influências externas na avaliação desse fenômeno focal.

Verificamos que a atividade locomotora dos animais lesionados foi reduzida após a lesão (Figura 8, dia 7), porém reestabelecida na fase proliferativa da lesão (dia 14), voltando a ser prejudicada na fase de remodelagem (dia 21). Primeiramente é válido lembrar que a alteração na exploração do ambiente no teste do campo aberto sugere comprometimento do sistema locomotor (LARSEN; ARNT, 1985; BRING *et al.*, 2005). Por sua vez, a redução na atividade locomotora em animais com lesão aguda ou crônica sugere a ocorrência de dor, o que foi observado em nosso estudo após 7 e 21 DPL tendínea (LARSEN; ARNT, 1985; MATSON *et al.*, 2006; NEUGEBAUER *et al.*, 2007).

Em modelos de indução de artrite, a investigação da atividade locomotora dos animais é um parâmetro frequentemente utilizado, contudo é referido que diferenças nessa atividade são primariamente mais sensíveis nos primeiros dias após a lesão (NEUGEBAUER *et al.*, 2007). Apesar disso, o comportamento naturalmente esperado em nosso estudo para 14 DPL seria uma melhora sutil nesse parâmetro, culminando com a expectativa de melhora em 21 DPL, e não o retorno aos níveis de normalidade e depois piora. Esse comportamento poderia ser justificado pelos eventos que ocorrem na fase proliferativa de reparo.

Já foi reportado na literatura que a fase proliferativa envolve a redução na expressão de substâncias inflamatórias e irritantes para o tecido, o aumento do contingente celular através da proliferação de células tronco progenitoras do tendão e aumento na síntese de colágeno (ABATE *et al.*, 2009; XU; MURRELL, 2008; CHEN *et al.*, 2004).

Concomitante a isso, é descrito que a proliferação de nervos entre a malha de colágeno começa a ser expressiva na segunda semana após a lesão e atinge seu ápice pela sexta semana. Portanto a presença de ramos nervosos poderia influenciar na percepção dolorosa do animal. Somado a isso, diversos neuropeptídeos tanto pró quanto anti-nociceptivos e uma modulação no sistema opioide também entram em ação nessas fases, o que poderia contribuir na modulação de dor e permitir as variações no padrão de mobilidade identificadas em nosso estudo (ACKERMANN, 2013; ACKERMANN *et al.*, 2001; ACKERMANN *et al.*, 2002; BRING *et al.*, 2005). Dessa forma, a redução de mobilidade em 7 dias seria justificada pelos eventos da fase aguda, independente da modulação nitrérgica, enquanto a redução em 21 DPL poderia ser decorrente dos eventos de plasticidade. Já em 14 haveria uma transição entre essas fases.

Os dados do IFA em nosso trabalho mostraram que o bloqueio nitrérgico local com L-NAME promoveu significativa melhora funcional, sobretudo no 21º DPL e que, por outro lado, o fornecimento de NO através de SNP piorou o parâmetro analisado no mesmo período apesar de ter resultado em melhora do IFA em 14 DPL.

A melhora funcional no IFA após 21 DPL em função da intervenção sobre o sistema nitrérgico foi condizente com estudos onde a lesão tendínea era o foco para diferentes tipos de intervenção (NG *et al.*, 2003; SEE *et al.*, 2004; KRIVIC *et al.*, 2005). Entretanto, o aumento nos níveis de NO através do SNP apresentou efeito dual ao apresentar melhora tecidual em 14 DPL com piora em 21 DPL, sendo possivelmente um efeito associado à resposta do tecido ao NO nas diferentes fases do reparo da lesão (ABRAMSON, 2008; DARMANI *et al.*, 2004).

Best e colaboradores (1992) mostraram que existe uma forte correlação entre a propriedade biomecânica de carga de falha e o desempenho funcional dos animais no IFA, levando a crer que possivelmente a melhora funcional encontrada em nossas amostras também poderia refletir em uma melhora biomecânica.

A análise da marcha, em nosso estudo, mostrou um padrão de recuperação muito parecido com o do IFA, principalmente na fase de pré-balanço. Na primeira e segunda semana de lesão, todos os grupos apresentam redução na angulação articular, sugerindo fraqueza e/ou dor no local, uma vez que ângulos mais abertos indicam a biomecânica apropriada. Uma exceção foi o grupo SNP, que em 7 DPL ainda apresentava ângulos articulares análogos ao CTRL. Os motivos para isso podem envolver o efeito dual do NO, embora seja reportado que altas concentrações de NO aumentam processos de dor, o que acarretaria a redução do ângulo articular (ABRAMSON, 2008; HSIEH, 2006).

Assim como no IFA, em 21 DPL o bloqueio nitrérgico promoveu melhora funcional, enquanto o aumento de NO ocasionou piora. Liang *et al* (2012), asseguram que esta metodologia pode ser ainda mais sensível para detectar mudanças do que o IFA. Portanto, em nosso trabalho, o bloqueio nitrérgico restabelece precocemente a função, enquanto que o aumento de NO parece ter múltiplos alvos e ocasionar efeitos diversos, dependendo da fase de reparo, mas com predomínio de prejuízo a função.

Quanto a análise morfológica, em nosso modelo experimental, notamos que o grupo que recebeu L-NAME apresentou um padrão histológico consideravelmente melhor, conforme os parâmetros de melhora reportados na literatura (COOK *et al.*, 2004; LIAN *et al.*, 2006; XU; MURRELL, 2008). Diferente dos achados para o grupo L-NAME, os animais que receberam SNP ou SAL contrapõem-se com maior desorganização celular e da matriz.

A regeneração do tendão de Aquiles é bastante lenta e não retorna totalmente ao mesmo aspecto do tecido sadio por motivos ainda pouco esclarecidos. Um trabalho buscou investigar o curso de cicatrização espontânea do tendão de Aquiles e, após 12 meses de lesão, notaram que ainda havia alterações anatômicas e histológicas perceptíveis (MURRELL *et al.*, 1997; BRUNS *et al.*, 2000). Portanto, sugerimos que a inibição da NOS no local da injúria parece acelerar o processo de regeneração e organização do tecido em relação aos demais grupos.

Em nosso resultado de quantificação celular, notamos que o tratamento com L-NAME reduziu o número de células se comparado aos outros grupos lesionados. As células também

se apresentavam mais organizadas em relação ao eixo longitudinal do tecido e com morfologia mais alongada, típica de tenócitos.

Os tenócitos imaturos em proliferação são capazes de se diferenciar, dependendo do estímulo recebido, em tecido adiposo, cartilaginoso e ósseo, os quais apresentam células com morfologia diferente do tenócito cujos núcleos mais arredondados denotam a principal diferença, não sendo raros os casos onde a tentativa de reparo tecidual leva a formação de fibrocartilagem e ossificação no tendão (BI *et al.*, 2007; YIN *et al.*, 2010). A transformação morfológica das células após a lesão está relacionada com uma redução no componente de tensão e aumento no componente de achatamento do tecido, refletindo no fenótipo celular sua redução funcional (COOK *et al.*, 2004; GIGANTE *et al.*, 2009; DAHLGREN *et al.*, 2005). Yin *et al.* (2010), mostraram também que a organização da matriz através da melhora na orientação das fibras influencia muito na diferenciação em tipos celulares semelhantes a tenócitos.

O processo de remodelagem do tendão é resultado de um equilíbrio entre síntese e degradação de colágeno, e o principal colágeno do tecido sadio é o tipo I, que é fibrilar e resistente. A síntese dessa proteína em tecidos saudios é lenta e tem baixo *turnover*, o que foi representado em nosso grupo CTRL pelo baixo nível basal de marcação para COL1A1 (RYLEY, 2008). Nos grupos que sofreram lesão, a expressão de COL1A1 resultou em maior síntese de colágeno, havendo diversas áreas de forte marcação intracelular. Contudo, a exposição de colágeno ao aumento de NO (SAL e SNP) pode levar a nitrosilação de proteínas e degradação do colágeno secretado (KAWANO *et al.*, 2009; HSU *et al.* 2006; URTASUN *et al.*, 2009). Por esse motivo é possível que o tratamento com L-NAME tenha sido mais eficiente para a deposição de fibras na matriz, o que foi demonstrado pela maior intensidade de marcação na região extracelular neste grupo frente aos demais (Figura 15).

Dahlgren e cols (2005) afirmam que o ensaio de detecção de colágeno por imunomarcação pode não representar 100% do colágeno presente na matriz extracelular da amostra de tendão devido ao alto grau de insolubilidade dessa proteína, principalmente no tecido intacto, que é bastante insolúvel.

Hou e colaboradores (2009), mostraram que a expressão de colágeno tipo I e III no tecido é intensificada quando um fator pró-fibrótico é fornecido. Porém, isso ocorre mais lentamente no tendão lesionado sem tratamento. Dahlgren *et al.* (2005), mostraram que a expressão gênica para colágeno tipo I e III é aumentada após a lesão, ficando mais evidente a

partir da segunda semana. O grupo demonstrou também que a marcação dessas proteínas é aumentada, porém há um predomínio do tipo III em relação ao I.

Dooley *et al* (2007), revelaram que o SNP e o DETA-NONOato, ambos doadores de NO, são capazes de reduzir os níveis de colágeno tipo I. Por outro lado, o ácido ascórbico, que atua como antioxidante aumenta esses níveis. Sendo assim, nosso tratamento com L-NAME (que diminui uma espécie reativa) foi efetivo no aumento da expressão dessa proteína.

Em nível ultraestrutural, mostramos que a organização celular dos grupos L-NAME e SNP apresentaram menor espraçamento celular, maior coesão entre fibras e o RER apresentava morfologia clássica, assim como o grupo SNP (Figuras 16 e 17). Já no grupo SAL, vacuolização e um RER disforme foram encontrados. Destacamos que essa vacuolização é indicativa de degeneração celular (PALUMBO *et al.*, 2012). Além disso, a síntese de material análogo ao colágeno I (material dentro das vesículas) era mais evidente no grupo L-NAME do que nos demais.

Aro *et al* (2014), mostraram que o tratamento com uma antocianina (atua como antioxidante) promoveu aumento na síntese e organização de colágeno. O grupo ainda registrou a fenda na membrana decorrente de secreção dessa proteína, momento que também conseguimos registrar nesse trabalho (Figura 17). Sendo assim, a inibição nitrérgica, que reduz a produção de um potente agente oxidante, tem um papel efetivo no aumento da síntese e secreção dessa proteína.

Verificamos que após a lesão há redução generalizada no diâmetro de fibrilas de colágeno foi notada em relação ao CTRL. Contudo, uma alta frequência de fibrilas de menor diâmetro foi registrado no grupo SNP. Essa redução no diâmetro foi encontrada por Pingel e cols (2014), que mostraram haver redução significativa entre o diâmetro de fibrilas em humanos com tendinopatia se comparado aos saudáveis. Portanto, um parâmetro de melhora importante consiste no aumento da frequência de diâmetros maiores, o que notamos ter piorado no grupo SNP, enquanto diâmetros mais espessos foram visualizados nos grupos SAL e L-NAME (Figuras 18 e 19).

Em nosso estudo da modulação nitrérgica sobre a plasticidade neural periférica, notamos que não houve expressão por entre a malha de colágeno nem de GFAP nem de NF200 (Figuras 20 e 21). O que já era esperado, uma vez que a expressão de nervos nos tendões sadios ocorre apenas no paratendão (ACKERMANN *et al.*, 2001; ACKERMANN *et al.*, 2002; ACKERMANN *et al.*, 2003).

Por outro lado, após a tenotomia encontramos a expressão desses marcadores entre a malha de colágeno em todos os grupos. A ocorrência dessa plasticidade já é descrita e está associada a efeitos algícos exacerbados após uma lesão (ACKERMANN *et al.*, 2003; ACKERMANN *et al.*, 2013).

Sabe-se também que no processo de plasticidade periférica, o reparo dos ramos axonais é norteado pela glia para que o cone de implantação axonal possa seguir seu trajeto (KLIMASCHEWSKI *et al.*, 2013). Notamos que tanto a glia (GFAP) quanto o axônio (NF200) apresentavam as mesmas características de organização em feixes agrupados, sugerindo que está sendo mantido um reparo envolvendo esses dois elementos e que ambos indicam o trajeto de um ramo nervoso.

Em nosso trabalho verificamos diferenças no padrão de organização dos ramos nervosos entre os grupos experimentais. Nos grupos SAL e principalmente no L-NAME os ramos nervosos (em ambas as marcações) eram mais grossos, organizados com maior tendência ao eixo longitudinal, localizavam-se próximo à borda do tecido e apresentavam aumento na expressão para GFAP. No grupo SNP esses ramos eram mais delgados, expressavam menos GFAP se comparado ao L-NAME e apresentavam orientação dispersa (na marcação para GFAP) ou com tendência de organização longitudinal (mostrado na marcação para NF200) (Figuras 20 e 21).

A redução da expressão de ramos nervosos aliados a melhora na organização da matriz já foi previamente demonstrado através da intervenção com a prática de atividade física, o que foi mais notável após quatro semanas do protocolo estabelecido (BRING *et al.*, 2007). Em nossos resultados, mostramos que o tratamento com L-NAME melhorou a síntese e organização do colágeno. Após três semanas de lesão os ramos nervosos estavam mais organizados, com mais imunorreatividade para GFAP e tendiam a aproximar-se da borda do tecido, favorecendo o seu desaparecimento da malha de colágeno mais precocemente (Figuras 20 e 21).

Essa possibilidade é reforçada uma vez que essas fibras nervosas atingem o ápice de expressão por volta da 4<sup>a</sup> a 6<sup>a</sup> semana pós-lesão e começam a apresentar redução da imunorreatividade no tecido por volta da 8<sup>o</sup> semana do processo de remodelagem, e isso está associado com a redução na expressão de diversos fatores pró-nociceptivos (ACKERMANN *et al.*, 2002; ACKERMANN *et al.*, 2003; BRING *et al.*, 2005). Sendo assim, o aumento na expressão de GFAP na 3<sup>a</sup> semana pode sugerir antecipação desse reparo na plasticidade

periférica. Ressaltamos que é a primeira vez que o GFAP é usado para localizar o envoltório de fibras nervosas no tendão. Essa marcação é um ótimo recurso para o estudo da nocicepção, uma vez que, no sistema nervoso periférico, o GFAP é marcador de células de schwann não mielinizadas, que conduzem informação nociceptiva (fibras tipo C) (TOEWS *et al.*, 1992; MARINELLI *et al.*, 2012).

Em nossos dados sobre plasticidade central, verificamos que as amostras do segmento L5 da medula espinhal seguiam o mesmo padrão de organização histológica e mantinham integridade tecidual tanto em 2 quanto em 21 DPL, contudo, ao realizar a marcação no 2º dia notamos aumento significativo na expressão de GFAP em todos os quadrantes, o que no 21º DPL não era mais evidenciado, sugerindo que os fatores periféricos que induzem essa reatividade já cessaram e estão mais envolvidos com a fase aguda da lesão (GOFF *et al.*, 1998).

Dentre as primeiras descrições de imunofluorescência para esta proteína já se destacava a fraca marcação para tecidos de animais saudáveis e forte imunofluorescência em tecidos com gliose (esclerose múltipla, astrocitoma), sugerindo maior quantidade nessas condições (BIGNAMI *et al.*, 1972). A reatividade ou ativação glial consiste na hipertrofia decorrente do aumento na expressão de GFAP e não necessariamente na proliferação de astrócitos. Esse fenômeno vem sendo bastante pesquisado, principalmente na medula espinhal e nervos em busca de associação com eventos que envolvem estresse químico ou físico (GARRISON *et al.*, 1994; WANG *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2012; CAO *et al.*, 2008).

Assim como em nosso trabalho, Zhang e cols (2012) observaram aumento na reatividade glial no segmento L5 da medula espinhal bilateralmente a sua intervenção, um quimioterápico que tem efeito adverso conhecido de dor neuropática. Entretanto o estudo também mostrou tal reatividade ainda no 28º dia após o tratamento, enquanto nosso trabalho mostrou que após 21 dias de lesão essa resposta havia sido abolida (ZHANG *et al.*, 2012).

O papel dessa reatividade ainda não é clara. Triolo e cols (2006) mostraram que animais nocaute para essa proteína apresentam atraso na regeneração axonal. Por outro lado, já foi demonstrado também que esse aumento na imunoreatividade do GFAP está associado ao desenvolvimento de dor neuropática (COYLE *et al.*, 1998; WANG *et al.*, 2009). Sendo assim, como está sendo apresentado pela primeira vez a presença de reatividade glial na medula após lesão tendínea, um processo que ocasiona dor intensa, o mais provável é que essa resposta tenha relação com a nocicepção.



Neste trabalho também mostramos o aumento de marcação para c-Fos do lado ipsilateral a injúria no 2º DPL, principalmente na região dorsal. A co-localização c-Fos-glia apresentou maior ocorrência após 2 DPL e de forma ipsilateral, enquanto uma discreta co-marcação é notada após 21 DPL. Muita co-marcação foi observada entre c-Fos-neurônio majoritariamente após 2 DPL, embora ocorra também em 21 DPL de modo ipsilateral.

A expressão basal de c-Fos é muito baixa. Seu aumento, predominantemente induzido na região dorsal e ipsilateral a uma lesão, o que foi constatado em nosso trabalho, é indicativo de maior ativação gênica imediata (ativação do proto-oncogene *c-fos*). Como produto de *c-fos*, o c-Fos pode formar um complexo com c-Jun e induzir transcrição gênica. Além disso, está envolvida na transdução de sinais que ligam eventos extracelulares a adaptações dentro da célula (GAO *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2009).

O aumento na expressão de c-Fos está muito associada a estímulos nocivos (aumento na atividade celular), e por isso é amplamente usado em investigações que envolvem o estudo da dor, embora sua expressão seja descrita também por estímulos que causem coceira, na marcha, na locomoção forçada e na locomoção fictícia (induzida por estímulo elétrico no cérebro) (GAO *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2009; DAI *et al.*, 2005).

Wang *et al.*, (2009) mostraram, após injúria nervosa periférica, aumento na co-expressão de c-Fos-neuronal em relação a c-Fos-glia. Em nosso trabalho, mostramos um predomínio de neurônios c-Fos positivos nos dois dias analisados, porém glia c-Fos reativa foi notada no início da injúria (área de substância branca). Diferenças no período de ativação celular podem indicar um predomínio, no início da lesão, de modulações gliais e neuronais seguido de uma fase tardia modulada por neurônios.

Os achados desse estudo podem auxiliar no desenvolvimento de estratégias de intervenção em lesões tendíneas voltadas para inibição nitrérgica e para o controle da plasticidade neural com intuito de melhorar o reparo tecidual, a dor e a recuperação funcional.

## 6 CONCLUSÃO

Este trabalho sustenta a tese de que:

- ✓ A inibição nitrérgica local é benéfica para o reparo do tecido, uma vez que revelamos melhora em vários parâmetros na histoquímica e por vários testes funcionais que indicam sucesso nesse processo, sobretudo no 21 DPL.
- ✓ A inibição nitrérgica local diminuiu a quantidade de células no tecido, melhorou o padrão morfológico celular aumentou a síntese e deposição de colágeno I além de apresentar bons indícios de reparo sob o ponto de vista ultraestrutural.
- ✓ A plasticidade periférica ocorre no modelo de lesão tendínea utilizado nessa pesquisa e pode ser influenciada pelo sistema nitrérgico.
- ✓ O aumento nos níveis de NO local resultou, de forma dominante, em prejuízo do reparo e do retorno a função.
- ✓ A lesão tendínea é capaz de desencadear plasticidade central com reatividade glial e aumento na ativação de neurônios na região dorsal ipsilateral da medula.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

ABRAMSON, S.B. Nitric oxide in inflammation and pain associated with osteoarthritis. **Arthritis Res Ther.** 10 (Suppl 2): S2, 2008.

ACKERMANN, P. **Peptidergic innervations of periarticular tissue** – A study in the rat. TESE DE DOUTORADO. Estocolmo: Karolinska University, 2001.

ACKERMANN, P.W.; LI, J.; LUNDEBERG, T.; KREICBERGS, A. Early nerve regeneration after Achilles tendon rupture – a prerequisite for healing? A study in the rat. **J Orthop Res.** 20: 849-856, 2002.

ACKERMANN, P.W.; LI, J.; LUNDEBERG, T.; KREICBERGS, A. Neuronal plasticity in relation to nociception and healing of rat achilles tendon. **J Orthop Res.** 21: 432-441, 2003.

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

ACKERMANN, PW; FRANKLIN, SL; DEAN, BJ; CARR, AJ; SALO, PT; HART, DA. Neuronal pathways in tendon healing and tendinopathy-update. **Front Biosci.** 19: 1251-78, 2014.

ALFREDSON H; FORSGREN S; THORSEN K, *et al.* Glutamate NMDAR1 receptors localized to nerves in human Achilles tendons. Implications for treatment? **Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.** 9: 123–6, 2001.

ALFREDSON, H. The chronic painful Achilles and patellar tendon: research on basic biology and treatment. **Scand J Med Sci Sports:** 15:252–259, 2005.

ALFREDSON, H.; THORSEN, K.; LORENTZON, R. In situ microdialysis in tendon tissue: high levels of glutamate, but not prostaglandin E2 in chronic Achilles tendon pain. **Knee Surg, Sports Traumatol, Arthrosc.** 7:378–381, 1999.

ANDERSSON, G; FORSGREN, S; SCOTT, A; GAIDA, JE; STJERNFELDT, JE; 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.** 45(5): 3994-06, 2011.

ARO, AA; FREITAS, KM; FOGLIO, MA; CARVALHO, JE; DOLDER, H; GOMES, L; VIDAL, BC; PIMENTEL, ER. Effect of the Arrabidaea chica extract on collagen fiber organization during healing of partially transected tendo. **Life Sciences.** 92: 799–807, 2013.

- BASTIANETTO, S; DUMONT, Y; DURANTON, A; VERCAUTEREN, F; BRETON, L *et al.* Protective Action of Resveratrol in Human Skin: Possible Involvement of Specific Receptor Binding Sites. **PLoS ONE**. 5(9): e12935, 2010.
- BEST, TM; COLLINS, A; LILLY, EG; SEABER, AV; GOLDNER, R; MURRELL, GAC. Achilles tendon healing: A correlation between functional and mechanical performance in the rat. **J Orthop Res**. 11(6): 897-906, 1993.
- BI, Y; EHIRCHIOU, D; KILTS, TM; INKSON, CA; EMBREE1, MC; SONOYAMA1,W *et al.* Identification of tendon stem/progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche. **Nature Medicine**. 13(10): 1219-1227, 2007.
- BIGNAMI, A; ENG, LF; DAHL, D; UYEDA, CT. Localization of the glial fibrillary acid protein in astrocytes by immunofluorescence. **Brain Res**. 43: 429-435, 1972.
- BRING, D. K-I.; KREICBERGS, A.; RENSTROM, P.; ACKERMANN, P.W. Physical Activity Modulates Nerve Plasticity and Stimulates Repair after Achilles Tendon Rupture. **J Orthop Res**. 25: 164-72, 2007.
- CHELYSHEV, Y.A.; MUHAMEDSHINA, Y.O.; POVYSHEVA, T.V. *et al.* Characterization of spinal cord glial cells in a model of hindlimb unloading in mice. **Neuroscience** 280:328-39, 2014.
- CLAYTON, RAE; COURT-BROWN, CM. The epidemiology of musculoskeletal tendinous and ligamentous injuries. **Injury** 39(12): 1338-1344, 2008.
- CLEGG, PD; STRASSBURG, S; SMITH, RK. Cell phenotypic variation in normal and damaged tendons. **Int J Exp Path**. 88: 227-235, 2007.
- CORSETTI, G.; D'ANTONAB. G.; DIOGUARDI, F. S.; REZZANI, R. Topical application of dressing with amino acids improves cutaneous wound healing in aged rats. **Acta histochem**. 112(5): 497-507, 2010.
- COYLE, D.E. Partial peripheral nerve injury leads to activation of astroglia and microglia which parallels the development of allodynic behavior. **Glia** 23(1):75-83, 1998.
- CRIBB, AM; SCOTT, JE. Tendon response to tensile stress: an ultrastructural investigation of collagen: proteoglycan interactions in stressed tendon. **J Anat**. 187: 423-428, 1995.
- DAHLGREN, L.A.; MOHAMMED, H.O.; NIXON, A.J. Temporal expression of growth factors and matrix molecules in healing tendon lesions. **J Orthop Res**. 23: 84-92, 2005.
- DAI, X; NOGA, BR; DOUGLAS, JR; JORDAN, M. Localization of Spinal Neurons Activated During Locomotion Using the c-fos Immunohistochemical Method. **J Neurophysiol**. 93: 3442-3452, 2005.
- DANIEL K.-I. BRING \*, MARIE-LOUISE HEIDGREN, ANDRIS KREICBERGS, PAUL W. Ackermann. Increase in sensory neuropeptides surrounding the Achilles tendon in rats with adjuvant arthritis. **J Orthop Res**. 23: 294-301, 2005.

DANIELSON P, ALFREDSON H, FORSGREN S. Immunohistochemical and histochemical findings favoring the occurrence of autocrine/paracrine as well as nerve-related cholinergic effects in chronic painful patellar tendon tendinosis. **Microsc Res Tech.** 69: 808–19, 2006.

DANIELSON P, ALFREDSON H, FORSGREN S. Studies on the importance of sympathetic innervation, adrenergic receptors, and a possible local catecholamine production in the development of patellar tendinopathy (tendinosis) in man. **Microsc Res Tec.** 70: 310–24, 2007.

DANIELSON, P. Reviving the “biochemical” hypothesis for tendinopathy: new findings suggest the involvement of locally produced signal substances. **Br J Sports Med.** 43: 265–268, 2009.

DARMANI, H; CROSSAN, J.C.; CURTIS, A. Single dose of inducible nitric oxide synthase inhibitor induces prolonged inflammatory cell accumulation and fibrosis around injured tendon and synovium. **Mediators of Inflammation.** 13(3): 157-164, 2004.

DOOLEY, A; GAO, B; SHI-WEN, X; ABRAHAM, DJ; BLACK, CM; JACOBS, M; BRUCKDORFER, KR. Effect of nitric oxide and peroxynitrite on type I collagen synthesis in normal and scleroderma dermal fibroblasts. **Free Rad Biol Med.** 43: 253–264, 2007.

ELLIOTT, M.B.; BARR, A.E.; KIETRYS, D.M.; AL-SHATTI, T.; AMIN, M.; BARBE, M.F. Peripheral neuritis and increased spinal cord neurochemicals are induced in a model of repetitive motion injury with low force and repetition exposure. **Brain Res.** 1218: 103–113, 2008.

FORSGREN, S; DANIELSON, P; ALFREDSON, H. Vascular NK-1 receptor occurrence in normal and chronic painful Achilles and patellar tendons: studies on chemically unfixed as well as fixed specimens. **Regul Pept.** 126: 173–81, 2005.

FREDBERG, U; STENGAARD-PEDERSEN, K. Chronic tendinopathy tissue pathology, pain mechanisms, and etiology with a special focus on inflammation. **Scand J Med Sci Sports.** 18(1): 3–15, 2008.

GAO, Y; JI, R. c-Fos and pERK, which is a better marker for neuronal activation and central sensitization after noxious stimulation and tissue injury? **Open Pain J.** 1(2): 11–17, 2009.

GARRISON, C.J.; DOUGHERTY, P.M.; KAJANDER, K.C.; CARLTON, S.M. Staining of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in lumbar spinal cord increases following a sciatic nerve constriction injury. **Brain Res.** 565(1):1-7, 1991.

GARRISON, CJ; DOUGHERTY, PM; CARLTON, SM. GFAP expression in lumbar spinal cord of naïve and neuropathic rats treated with MK-801. **Exp Neurol.** 129: 237-243, 1994.

GIGANTE, A.; CESARI, E.; BUSILACCHI, A.; MANZOTTI, S.; KYRIAKIDOU, K.; GRECO, F.; DI PRIMIO, R.; MATTIOLI-BELMONTE, M. Collagen I Membranes for Tendon Repair: Effect of Collagen Fiber Orientation on Cell Behavior. **J Orthop Res.** 27: 826–832, 2009.

GREEN, LC; WAGNER, DA; GLOGOWSKI, J; SKIPPER, PL; WISHNOK, JS; TANNENBAUM, SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N] nitrate in biological fluids. **Analytical Biochem.** 126(1) 131-138, 1982.

HOU, Y.; MAO, Z.; WEI, X.; LIN, L.; CHEN, L.; WANG, H.; FU, X.; ZHANG, J.; YU, C. The roles of TGF- $\beta$ 1 gene transfer on collagen formation during Achilles tendon healing. **Biochem Biophys Res Commun.** 383: 235–239, 2009.

HSIEH, YL. Effects of ultrasound and diclofenac phonophoresis on inflammatory pain relief: suppression of inducible nitric oxide synthase in arthritic rats. **Phys Ther.** 86: 39–49, 2006.

HSU, Y.; HSIAO, M; WANG, L; CHIEN, YW; LEE, W. Nitric oxide produced by iNOS is associated with collagen synthesis in keloid scar formation. **Nitric Oxide.** 14: 327–334, 2006.

INSS/COORDENAÇÃO DE PREVENÇÃO DE ACIDENTES DO TRABALHO. **Ministério da Previdência social.** Acompanhamento Mensal dos Benefícios Auxílios-Doença Acidentários Concedidos segundo os Códigos da CID-10 de Janeiro a Dezembro de 2014. Brasília, 2015.

IZUMI, Y; BENZ, AM; CLIFFORD, DB; ZORUMSKI, CF. Neurotoxic effects of sodium nitroprusside in rat hippocampal slices. **Exp Neurol.** 121(1): 14-23, 1993.

JAFFREY, S.R.; SNYDER, S.H. NITRIC OXIDE: A Neural Messenger. **Annu Rev Cell Dev Biol.** 1: 417-40, 1995.

JÄRVINEN, TAH; KANNUS, P; MAFFULLI, N; KHAN, KM. Achilles Tendon Disorders: Etiology and Epidemiology. **Foot Ankle Clin N Am.** 10: 255 – 266, 2005.

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

KAWANO, T; ZOGA, V; KIMURA, M; LIANG, M; WU, H; GEMES, G; MCCALLUM, JB; KWOK, W; HOGAN, QH; SARANTOPOULOS, C. Nitric oxide activates ATPsensitive potassium channels in mammalian sensory neurons: action by direct Snitrosylation. **Mol Pain.** 5(12), 2009.

KLIMASCHEWSKI, L; HAUSOTT, B; ANGELOV, DN. The Pros and Cons of Growth Factors and Cytokines in Peripheral Axon Regeneration. **Int Rev Neurobiol.** 108: 137–171, 2013.

KNOWLES, R; MONCADA, S. Nitric oxide synthases in mammals. **Biochem. J.** 298: 249-258, 1994. MONCADA, S; HIGGS, E. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. **FASEB J.** 9: 1319-1330, 1995.

KVIST, M. Achilles Tendon Injuries in Athletes. **Sports Med.** 18(3): 173-201, 1994.

LARSEN, JJ; ARNT, J. Reduction in locomotor activity of arthritic rats as parameter for chronic pain: effect of morphine, acetylsalicylic acid and citalopram. **Acta Pharmacol Toxicol (Copenh).** 57(5): 345-51, 1985.

LARSSON, M.; BROMAN, J. Synaptic Plasticity and Pain: Role of Ionotropic Glutamate Receptors. **Neuroscientist.** 17(3): 256-73, 2011.

- LENT, Roberto. **Cem bilhões de neurônios?** Conceitos fundamentais de neurociências. 2ª edição. São Paulo. Atheneu, 2010.
- LEPPILAHTI, J; PURANEN, J; ORAVA, S. Incidence of Achilles tendon rupture. **Acta Orthop Scand.** 67(3): 277-279, 1996.
- LIAN, Ø.; DAHL, J.; ACKERMANN, P.W.; FRIHAGEN, F.; ENGBRETSSEN, L.; BAHR, R. Pronociceptive and Antinociceptive Neuromediators in Patellar Tendinopathy. **Am J Sports Med.** 34: 1801-8, 2006.
- LIANG, J-I; CHEN, M-Y; HSIEH, T-H; LIU, C-Y; LAM, C-F; CHEN, J; YEH, M-L. Video-based Gait Analysis for Functional Evaluation of Healing Achilles Tendon in Rats. **Ann Biomed Eng.** 40(12): 2532 – 2540, 2012.
- 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.
- LIN, J; WANG, M; WEI, A; ZHU, W; MURRELL, GA. The cell specific temporal expression of nitric oxide synthase isoforms during achilles tendon healing. **Inflamm Res.** 50(10): 515-522, 2001.
- LONGO, UG; RONGA, M; MAFFULLI, N. Achilles Tendinopathy. **Sports Med Arthrosc Rer.** 17: 112–126, 2009.
- LUO, Z.D.; CHAPLAN, S.R.; SCOTT, B.P.; CIZKOVA, D.; CALCUTT, N.A.; YAKSH, T.L. Neuronal Nitric Oxide Synthase mRNA Upregulation in Rat Sensory Neurons after Spinal Nerve Ligation: Lack of a Role in Allodynia Development. **J Neurosci.** 19(21): 9201–9208, 1999.
- MACHADO, A; HAERTEL, LM. **Neuroanatomia Funcional**, 3ª Ed. São Paulo: Atheneu. 2013.
- MARINELLI, S.; VACCA, V.; RICORDY, R.; UGGENTI, C.; TATA A.M.; LUVISETTO, S.; PAVONE, F. The analgesic effect on neuropathic pain of retrogradely transported botulinum neurotoxin A involves Schwann cells and astrocytes. **PLoS One.** 7(10):e47977, 2012.
- MATSON, DJ; BROOM, DC; CARSON, SR; BALDASSARI, J; KEHNE, J; CORTRIGHT, DN. Inflammation-Induced Reduction of Spontaneous Activity by Adjuvant: A Novel Model to Study the Effect of Analgesics in Rats. **JPET.** 320: 194–201, 2007.
- MATTHIESEN, S; LINDEMANN, D; WARNKEN, M; JUERGENS, UR; RACKÉ, K. Inhibition of NADPH oxidase by apocynin inhibits lipopolysaccharide (LPS) induced up-regulation of arginase in rat alveolar macrophages. **Eur J Pharm.** 579: 403–410, 2008.
- MCCOY, E.S.; TAYLOR-BLAKE, B.; ZYLKA, M.J. CGRP $\alpha$ -expressing sensory neurons respond to stimuli that evoke sensations of pain and itch. **PLoS One.** 7(5):e36355, 2012.
- MENDONÇA JR, HP; ASSUNÇÃO, AV. Associação entre distúrbios do ombro e trabalho: breve revisão da literatura. **Rev Bras Epidemiol.** 8(2): 167-176, 2005.

- MOLLOY, T.J.; KEMP, M.W.; WANG, Y; MURRELL. G.A.C. Microarray analysis of the tendinopathic rat supraspinatus tendon: glutamate signaling and its potential role in tendon degeneration. **J Appl Physiol.** 101:1702–1709, 2006.
- MONCADA, S. Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine. **J R Soc Med.** 92: 164-169, 1999.
- MONCADA, S; HIGGS, E. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. **FASEB J.** 9: 1319-1330, 1995.
- MONCADA, S; PALMER, R; HIGGS, E. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Rev.** 43(2): 109-142, 1991.
- MORAES, SAS; OLIVEIRA, KRM; CRESPO-LÓPEZ, ME; PIKANÇO-DINIZ, DLW; HERCULANO, AM. 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; VAN EL, B; DEGROOT, J *et al.* Achilles Tendinosis. **Am J Sports Med.** 35: 1549-1556, 2007.
- MURRELL, GA; SZABO, C; HANNAFIN, JA; JANG, D; DOLAN, MM; DENG, X; MURRELL, DF; WARREN, RF. Modulation of tendon healing by nitric oxide. **Inflamm. res.** 46: 19–27, 1997.
- MURRELL, GA; TANG, DG; APPELYARD, RC; 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.
- MURRELL, GAC. Oxygen free radicals and tendon healing. **J Shoulder Elbow Surg.** 16(5 Suppl): 208S-14S, 2007.
- MURRELL, GAC; LILLY, EG; DAVIES, H; BEST, TM; GOLDNER, RD; SEABER, AV. The Achilles Functional Index. **J Orthop Res.** 10(3): 398-404, 1992.
- 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. **Europ J Pharmacol.** 530: 59–69, 2006.
- NEUGEBAUER, V; HAN, JS; ADWANIKAR, H; FU, Y; JI,G. Techniques for assessing knee joint pain in arthritis. **Molecular Pain.** 3(8): 1-13, 2007.
- NG, C.O.Y.; NG, G.Y.F.; SEE, E.K.N.; LEUNG, M.C.P. Therapeutic ultrasound improves strength of achilles tendon repair in rats. **Ultrasound in Med & Biol.** 29: 1501–1506, 2003.
- PADANILAM, T.G. Chronic Achilles Tendon Ruptures. **Foot Ankle Clin N Am.** 14: 711–728, 2009.
- PALUMBO, C; ROVESTA, C; FERRETTI, M. Striated muscle fiber apoptosis after experimental tendon lesion in a rat model. **J Anat.** 221: 358-363, 2012.
- PHILLIPS, L.H. II; PARK, T.S. Electrophysiologic mapping of the segmental anatomy of the muscles of the lower extremity. **Muscle Nerve** 14(12):1213-8, 1991.



PINGEL, J; LU, Y; STARBORG, T; FREDBERG, U; LANGBERG, H; NEDERGAARD, A; WEIS, M; EYRE, D; KJAER, M; KADLER, KE. 3-D ultrastructure and collagen composition of healthy and overloaded human tendon: evidence of tenocyte and matrix buckling. **J. Anat.** 224: 548-555, 2014.

POITEVIN S.; GARNOTEL, R.; ANTONICELLI, F.; GILLERY, P.; NGUYEN, P. Type I collagen induces tissue factor expression and matrix metalloproteinase 9 production in human primary monocytes through a redox-sensitive pathway. **J Thromb Haemost.** 6: 1586–94, 2008.

PUFE, T; PETERSEN, WJ; MENTLEIN, R; TILLMANN, BN. The role of vasculature and angiogenesis for the pathogenesis of degenerative tendons disease. **Scand J Med Sci Sports.** 15: 211–222, 2005.

PURVES D, AUGUSTINE GJ, FITZPATRICK D, *et al.*, editors. **Neuroscience.** 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates, 2001.

REDDY, GK; STEHNO-BITTEL, L; ENWEMEKA, CS. Matrix remodeling in healing rabbit Achilles tendon. **Wound Rep Reg.** 7: 518–527, 1999.

RILEY, G. Chronic tendon pathology: molecular basis and therapeutic implications. **Expert Rev Mol Med.** 7(5): 1-25, 2005.

RILEY, G. Tendinopathy – from basic science to treatment. **Nat Clin Pract Rheumatol.** 4(2): 82-89, 2008.

RILEY, G. The pathogenesis of tendinopathy. A molecular perspective. **Rheumatology.** 43: 131–142, 2004.

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

SCHULTZ, GS; WYSOCKI, A. Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. **Wound Rep Reg.** 17: 153–162, 2009.

SEE, E.; NG, G.; NG, C.; FUNG, D. Running exercises improve the strength of a partially ruptured Achilles tendon. **Br J Sports Med.** 38: 597–600, 2004.

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

SIU, AW; ORTIZ, GG; BENITEZ-KING, G; TO, CH; REITER, RJ. Effects of melatonin on the nitric oxide treated retina. **Br J Ophthalmol.** 88: 1078–1081, 2004.

STEYAERT, AE; BURSSSENS, PJ; VERCRUYSSSE, CW; VANDERSTRAETEN, GG; VERBEECK, RM. The effects of substance P on the biomechanic properties of the ruptured rat Achilles' tendon. **Arch Phys Med Rehabil.** 87: 254-8, 2006.

STROM, A; CASILLAS, M. Achilles Tendon Rehabilitation. **Foot Ankle Clin N Am.** 14: 773–782, 2009.

TOEWS, AD; GRIFFITHS, IR; KYRIAKIDES, E; GOODRUM, JF; ECKERMANN, CE; MORELL, P; THOMSON, CE. Primary Demyelination Induced by Exposure to Tellurium Alters Schwann Cell Gene Expression: A Model for Intracellular Targeting of NGF Receptor. **J Neurosci.** 12(9): 3676-3667, 1992.

TOMIOSSO, TC; NAKAGAKI, WR; GOMES, L; HYSLOP, S; PIMENTEL, ER. Organization of collagen bundles during tendon healing in rats treated with L-NAME. **Cell Tissue Res.** 337(2): 235-42, 2009.

TRIOLO, D; DINA, G; LORENZETTI, I; MALAGUTI, M; MORANA, P; DEL CARRO, U; COMI, G; MESSING, A; QUATTRINI, A; PREVITALI, SC. Loss of glial fibrillary acidic protein (GFAP) impairs Schwann cell proliferation and delays nerve regeneration after damage. **J Cell Sci.** 119: 3981-3993, 2006.

URTASUN, R; CUBERO, FJ; VERA, M; NIETO, N. Reactive Nitrogen Species Switch on Early Extracellular Matrix Remodeling via Induction of MMP1 and TNF. **Gastroenterology.** 136: 1410-1422, 2009.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol.** 39: 44–84, 2007.

VALLANCE, P. Nitric oxide: therapeutic opportunities. **Fund Clin Pharmacol.** 17: 1-10, 2003.

VERCELINO, R; CRESPO, I; DE SOUZA, GFP; CUEVAS, MJ; DE OLIVEIRA, MG; MARRONI, NP; GONZÁLEZ-GALLEGO, J; TUÑÓN, MJ. S-nitroso-N-acetylcysteine attenuates liver fibrosis in cirrhotic rats. **J Mol Med.** 88(4): 401-11, 2010.

WANG, W.; WANG, W.; MEI, X.; HUANG, J.; WEI, Y.; WANG, Y.; WU, S.; LI, Y. Crosstalk between Spinal Astrocytes and Neurons in Nerve Injury-Induced Neuropathic Pain. **PLoS ONE.** 4(9): e6973, 2009.

WREN, TA; YERBY, SA; BEAUPRÉ, GS; CARTER, DR. Mechanical properties of the human Achilles tendon. **Clin Biomech.** 16: 245 - 251, 2001.

XIA, W; WANG, Y; APPLEYARD, RC; SMYTHE, GA; MURRELL, GA. Spontaneous recovery of injured Achilles tendon in inducible nitric oxide synthase gene knockout mice. **Inflamm Res.** 55: 40–45, 2006.

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

YANG, W.; FAN, X.L.; ZHANG, H.; DI WU, S.; SONG, X.A. Effects of hindlimb unloading and reloading on c-fos expression of spinal cord evoked by vibration of rat Achille tendon. **Neurosci Lett.** 439(1):1-6, 2008.

YIN, Z; CHEN, X; CHEN, JL; SHEN, WL; NGUYEN, TM; GAO, L; OUYANG, HW. The regulation of tendon stem cell differentiation by the alignment of nanofibers. **Biomaterials.** 31: 2163–2175, 2010.

YOUNG, A.; GETTY, J.; JACKSON, A.; KIRWAN, E.; SULLIVAN, M.; PARRY, C.W. Variations in the pattern of muscle innervation by the L5 and S1 nerve roots. **Spine**. 8(6):616-24, 1983.

YU, P; MATLOUB, HS; SANGER, JR; NARINI, P. **Muscle Nerve**. 24: 231 – 239, 2001.

YUAN, J; MURRELL, GAC; WEI, A-Q; APPLEYARD, RC; DEL SOLDATO, P; WANG, M-X. Addition of nitric oxide via nitroflurbiprofen enhances the material properties of early healing of young rat Achilles tendons. **Inflamm Res**. 52(6): 230-237, 2003.

ZHANG, H.; YOON, S-H.; ZHANG, H.; DOUGHERTY, P.M. Evidence that spinal astrocytes but not microglia contribute to the pathogenesis of paclitaxel-induced painful neuropathy. **J Pain**. 13(3): 293–303, 2012.