

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

SUELLEN ALESSANDRA SOARES DE MORAES

**INIBIÇÃO NITRÉRGICA LOCAL FAVORECE O PROCESSO DE REGENERAÇÃO  
DO TENDÃO DE AQUILES EM RATOS SUBMETIDOS À TENOTOMIA.**

BELÉM

2011

SUELLEN ALESSANDRA SOARES DE MORAES

**INIBIÇÃO NITRÉRGICA LOCAL FAVORECE O PROCESSO DE REGENERAÇÃO  
DO TENDÃO DE AQUILES EM RATOS SUBMETIDOS A TENOTOMIA.**

Dissertação de mestrado submetida ao programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular. Área de concentração: Neurociências.

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

BELÉM

2011

Dados Internacionais da Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Biblioteca de Pós-Graduação do ICB-UFPA – Belém (PA)

---

Moraes, Suellen Alessandra Soares de

Inibição nitrérgica local favorece o processo de regeneração do tendão de aquiles em ratos submetidos a tenotomia / Suellen Alessandra Soares de Moraes; orientador, Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva. – 2011.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2011.

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

---

CDD – 22. ed. 617.474

SUELLEN ALESSANDRA SOARES DE MORAES

**INIBIÇÃO NITRÉRGICA LOCAL FAVORECE O PROCESSO DE REGENERAÇÃO  
DO TENDÃO DE AQUILES EM RATOS SUBMETIDOS A TENOTOMIA.**

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

Orientador: Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva.

Banca examinadora:

---

**Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva – Orientador**  
ICB - Universidade Federal do Pará

---

**Prof. Dr. Givago da Silva Souza – 1º Avaliador**  
ICB - Universidade Federal do Pará

---

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Elena Crespo-Lopez – 2º Avaliador**  
ICB - Universidade Federal do Pará

---

**Prof. Dr. Evander Batista de Jesus – Suplente**  
NMT/ICB – Universidade Federal do Pará

BELÉM

2011

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Neuroendocrinologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará sob orientação do Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva. A realização da pesquisa contou com o apoio das seguintes instituições de fomento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES).

Aos meus pais Ibraim e Líbia de Moraes pelo inestimável incentivo, compreensão e constituição moral e ética, ao Bruno Romão pela inefável paciência e amparo, e a todos aqueles que me protegem e compartilham as vitórias e dificuldades enfrentadas.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** por toda a proteção que me é concedida. Graças a Ti pude carregar junto a mim muitas vitórias, momentos gratificantes e pessoas amigas, todas desempenhando ao seu modo um papel fundamental na minha vida. Apesar dos obstáculos e provações, sempre soube que o mais nebuloso dos caminhos sempre contribui sabiamente para nosso crescimento. Por todos esses motivos, tenho cada vez mais a certeza dessa proteção. Muito obrigada por tudo!

Uma pessoa se tornou indelével para mim nesta importante fase da vida. Considero-o um amigo e alvo de admiração constante. Ele é o meu orientador, **Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva**. Posso dizer-te de coração que és meu querido orientador. Muito obrigado pelos conselhos, atenção, cuidado, proteção, amizade, conversas sobre cinema e música, idéias e, sobretudo pelo desenvolvimento mais intenso da paixão pela ciência e metodologia científica.

Ao longo dessa trajetória conheci pouco a pouco pessoas que se tornaram muito queridas. Passei a desenvolver com elas uma relação de amizade e colaboração. A vocês (pessoal do LNE) agradeço todos os favores, apoio e cuidados, em especial da panelinha **Adriene, Andréa, Danielle, Keury, Luana, Máira, Susane e Tarcyane**. Até parece que nesse laboratório só tem mulher, mas também posso dar meu muito obrigado aos meus queridos **Alan, Daniel, Edinaldo, Elierson, Tiago e Waldiney**.

Não poderia deixar de agradecer também ao Prof. Dr. **Domingos Picanço-Diniz** (UFOPA), **Karen Renata de Oliveira** (LNB), **Luiz Antônio** (LNB) e **Moysés Ramoy** (LNB).

Depois de tudo isso se torna inexprimível o valor que dou a minha família, descrever o quanto eu dependo dela e o quanto ela me sustém. Agradeço infinitamente a todos os meus queridos irmãos, **Fernando, Ibraim, Gilmar e Alexandre in memoriam**. 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**. A todos vocês, muito obrigada por nem sequer

medirem esforços para me ajudar, apoiar, incentivar e amar. Obrigada pela família que tenho.

Ao meu namorado **Bruno Soares Romão**, muito obrigada pelos conselhos e empurrões. Sei que assim como minha família, você não mede esforços para me ajudar. Sem você eu ainda não estaria trilhando esse caminho.

Por fim, a contribuição essencial para o desenvolvimento dessa pesquisa contou também com o apoio financeiro, estrutural e organizacional da **CAPES**, **UFPA** e **PPNBC**. A cada um também devo enorme gratidão.

## RESUMO

A prevalência de lesões tendíneas tem aumentando pela constante exigência de movimentos repetitivos em atividades ocupacionais e recreacionais da sociedade. As principais características dessa injúria envolvem disfunção cicatricial e perda de matriz extracelular (ME). Nesse tecido, a ME é constituída basicamente por colágeno tipo I, e a perda dessa proteína aliada a problemas na remodelagem é considerado um dos principais responsáveis pelo quadro sintomatológico e funcional da injúria. Somando-se a isso, a literatura reporta que a expressão das óxido nítrico sintase estão reguladas positivamente ao longo do processo de reparo. Nesse contexto, a proposta do trabalho é averiguar a influência do sistema nitrérgico local na recuperação histológica e funcional do tendão. Para isso, o trabalho conta com o modelo experimental de ruptura do tendão de Aquiles, possibilitando instaurar um quadro de tendinopatia crônica nos animais. O acompanhamento dos grupos controle, ruptura+veículo (Salina 0,9%), ruptura+L-nitro-arginina-metil-éster (L-NAME, 5mM) e ruptura+nitroprussiato de sódio (SNP, 3mM) prosseguiram até o 21º dia, estipulado para a coleta de amostras. A fim de avaliar a produção de óxido nítrico, o método de dosagem de Griess foi usado. Os parâmetros funcionais foram caracterizados pelo índice funcional de Aquiles (IFA), obtidos em 0, 7, 14 e 21 dias. Amostras também foram reservadas para processamento histomorfológico e autofluorescência. O ganho de massa corporal também foi avaliado. Conseguimos caracterizar o efeito das drogas no tecido sem fortes influências sistêmicas pela manutenção do peso corporal e níveis de nitrito plasmático. O L-NAME gerou uma significativa redução na densidade celular, inibiu a formação de vasos entre a malha colágena, melhorou a organização tecidual e restabeleceu precocemente o padrão funcional em 21 dias após a injúria. Por outro lado, os tratamentos com SNP e veículo mantiveram a desorganização do tecido e desempenho funcional insatisfatório. Juntos, nossos resultados sugerem um efeito benéfico da inibição local da NOS após a ruptura para a remodelagem tecidual, contribuindo para a regeneração do tendão.

*Palavras-chave:* óxido nítrico; regeneração; tendão de Aquiles.

## ABSTRACT

The tendon injuries prevalence has been increased usually by repetitive movements in the occupational and recreational activities of society. The main features this injury involve healing dysfunction and loss of extracellular matrix. At this tissue, the extracellular matrix is basically made of type I collagen and the loss of this protein associated with problems in the remodeling have been considered the major responsible for the symptomatic and functional effects of injury. Additionally the literature reports the nitric oxide synthase expression was up-regulated throughout the repair process. At this context the propose of this work is investigated the nitregeric local inhibition in tissue and functional recovery after tendon injury. We used a experimental model of Achilles tendon rupture for establish pathophysiological changes similar to chronic tendinopathy. The animals were divided into experimental groups control, injury+vehicle (saline, 0,9%), injury+L- N $\omega$ -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 5mM) and injury+sodium nitroprusside (SNP, 3mM), which were followed until the 21<sup>o</sup> day, when were killed to collect samples. In order to access nitric oxide production Griess nitrite assay was used. Functional recovery was calculated by Achilles Functional Index (AFI) in 0, 7, 14 and 21 days. Tendons were also processed for histomorphological and autofluorescence analysis. The body weight gain was also evaluated. We characterized the effect of drugs about tissue without stronger systemic influences by maintenance of body weight and plasmatic levels of nitrite. The L-NAME led to significant decrease in the cellular density, vessel formation between collagen network, accelerated the tissue organization and restored early the functional pattern at 21 days after injury. On the other hand, the treatment with SNP and vehicle remained the tissue disorganization and low functional performance. Taken together our results suggest a positive effect of local suppression of NOS after rupture for tissue remodeling, contributing to tendon regeneration.

*Key works:* nitric oxide; regeneration; Achilles tendon.

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURA 1– LOCALIZAÇÃO E CONSTITUIÇÃO CELULAR DO TENDÃO DE AQUILES HUMANO .....	19
FIGURA 2 – ESTRUTURA DO COLÁGENO. ....	23
FIGURA 3 – SÍNTESE DE COLÁGENO .....	24
FIGURA 4 – FORMAÇÃO DE LIGAÇÕES CRUZADAS .....	26
FIGURA 5 – EVENTOS MOLECULARES NA FASE AGUDA DA LESÃO .....	32
FIGURA 6 – AÇÃO DO TGF-B NA SÍNTESE DE COLÁGENO. ....	34
FIGURA 7 – DIFERENÇA NA PEGADA .....	37
FIGURA 8 – SÍNTESE DE ÓXIDO NÍTRICO .....	39
FIGURA 9 – RELAÇÃO ENTRE NOS E ARGINASE .....	43
FIGURA 10 - ESTRUTURA QUÍMICA DA L-ARGININA E DO L-NAME .....	45
FIGURA 11 – DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DO DESENHO EXPERIMENTAL DA PESQUISA.....	50
FIGURA 12 - OBTENÇÃO DAS MEDIAS PARA O CÁLCULO DO IFA .....	55
FIGURA 13 – GANHO DE MASSA CORPORAL .....	58
FIGURA 14 – NÍVEIS DE NITRITO PLASMÁTICO .....	59
FIGURA 15 – NÍVEIS TECIDUAIS DE NITRITO .....	62
FIGURA 16 - CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA DO MODELO DE INJÚRIA TENDÍNEA .....	63
FIGURA 17 - ORGANIZAÇÃO TECIDUAL APÓS 21 DIAS DE LESÃO E TRATAMENTO.....	64
FIGURA 18 - AVALIAÇÃO DO DIÂMETRO MÉDIO DE FIBRAS COLÁGENAS ORGANIZADAS .....	65
FIGURA 19 - AVALIAÇÃO DA FLUORESCÊNCIA DO COLÁGENO TENDÍNEO .....	68
FIGURA 20 - PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO LOCAL NA RECUPERAÇÃO FUNCIONAL DA MARCHA ...	69

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CGRP: PEPTÍDEO RELACIONADO AO GENE DA CALCITONINA

COL I: COLÁGENO TIPO I

COL III: COLÁGENO TIPO III

C-TERMINAL: PROPEPTÍDEO CARBOTERMINAL

GLY: GLICINA

GMPc: MONOFOSFATO DE GUANOSINA CÍCLICA

DORT: DISTÚRBIOS OSTEO-MUSCULARES RELACIONADOS AO TRABALHO

IFA: ÍNDICE FUNCIONAL DE AQUILES

IGF-I: FATOR DE CRESCIMENTO LIGADO À INSULINA I

IL1 $\alpha$ : INTERLEUCINA 1 ALFA

INSS: INSTITUTO NACIONAL DE SEGURIDADE SOCIAL

ITF: FATOR TESTE INTERMEDIÁRIO

KM: CONSTANTE DE MICHAELIS-MENTEN

L-NAME: L-NITRO-ARGININA-METIL-ÉSTER

ME: MATRIZ EXTRACELULAR

MMPs: METALOPROTEASES DE MATRIZ

MPa: MEGAPASCAL

NMDAR: RECEPTOR N-METIL-D-ASPARTATO

NO: ÓXIDO NÍTRICO

NOS: ÓXIDO NÍTRICO SINTASE

N-TERMINAL: PROPEPTÍDEO AMINOTERMINAL

PLF: FATOR DE COMPRIMENTO DA PEGADA

EROS: ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

ERNS: ESPÉCIES REATIVAS DE NITROGÊNIO

SN: SISTEMA NERVOSO

SNC: SISTEMA NERVOSO CENTRAL

SNP: NITROPRUSSIATO DE SÓDIO

SP: SUBSTÂNCIA P

TGF- $\beta$ : FATOR DE CRESCIMENTO TRANSFORMADOR BETA

TIMPs: INIBIDORES TECIDUAIS DE METALOPROTEASES

TNF $\alpha$ : FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA

TNG: TRINITRATO DE GLICERIL

TSF: FATOR DE ESPALHAMENTO DOS DEDOS DO PÉ

VEGF: FATOR DE CRESCIMENTO VASCULAR ENDOTELIAL

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	18
2.1 CARACTERIZAÇÃO DO TENDÃO SADIO .....	18
2.1.1 DIVISÕES .....	20
2.1.2 VASCULARIZAÇÃO, METABOLISMO E INERVAÇÃO .....	20
2.2 FUNÇÃO, SÍNTESE E DEPOSIÇÃO DE COLÁGENO NO TENDÃO .....	21
2.3 ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS DA TENDINOPATIA. ....	25
2.3.1 ETIOLOGIA .....	27
2.3.2 ASPECTOS ANATÔMICOS E HISTOLÓGICOS .....	29
2.3.3 VASCULARIZAÇÃO E INERVAÇÃO NA LESÃO .....	30
2.4 BASES MOLECULARES DA REGENERAÇÃO TENDÍNEA .....	31
2.5 REMODELAGEM E PROPRIEDADES BIOMECÂNICAS E FUNCIONAIS. ....	35
2.6 O ÓXIDO NÍTRICO .....	38
2.7 ÓXIDO NÍTRICO E REGENERAÇÃO DO COLÁGENO NO TENDÃO .....	40
3 OBJETIVOS .....	46
3.1 OBJETIVO GERAL .....	46
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS: .....	46
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	47
4.1 ANIMAIS .....	47
4.2 PESAGEM DOS ANIMAIS .....	47
4.3 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO .....	48
4.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS .....	48
4.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA .....	49
4.6 AUTOFLUORESCÊNCIA DO COLÁGENO .....	51

4. 7 DOSAGEM DE NITRITO .....	52
4. 8 DOSAGEM DE PROTEÍNAS.....	52
4. 9 AVALIAÇÃO FUNCIONAL .....	53
4. 10 ANÁLISE DE DADOS POR SOFTWARE .....	54
4. 11 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	56
5 RESULTADOS.....	57
5.1 O TRATAMENTO COM DROGAS NO LOCAL DA INJÚRIA NÃO ALTEROU O GANHO DE PESO CORPORAL NEM OS NÍVEIS DE NITRITO NO PLASMA.....	57
5.2 O MODELO DE INJÚRIA TEDÍNEA POR RUPTURA TOTAL DO TENDÃO DE AQUILES MANTEVE OS NÍVEIS DE NITRITO NO TECIDO AUMENTADOS EM 21 DIAS. ....	60
5.3 A REDUÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO PELA INIBIÇÃO COM L-NAME MELHOROU O PADRÃO DE ORGANIZAÇÃO DAS FIBRAS COLÁGENAS NO TECIDO.....	60
5.4 A INIBIÇÃO DA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE PROMOVEU MELHORA NO DESEMPENHO FUNCIONAL DE ANIMAIS EM 21 DIAS APÓS A INJÚRIA....	66
6 DISCUSSÃO .....	70
7 CONCLUSÃO .....	773
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	77

## 1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a prevalência de lesões tendíneas tem aumentando entre a população de meia idade, atletas de alto desempenho e atletas recreacionais, embora a literatura reporte que tal fenômeno não é restrito a esses grupos (CLEGG; STRASSBURG; SMITH, 2007; PADANILAM, 2009). A tendinopatia ocupacional causada por movimentos repetitivos - *overuse* - oriundos principalmente da manipulação de equipamentos industriais e eletrônicos, afeta cada vez mais a população (RILEY, 2004; XU; MURRELL, 2008; MOS *et al.*, 2007).

Por conseguinte, essa disfunção vem gerando um impacto financeiro na sociedade devido ao grande número de afastamentos do cargo (ELLIOTT *et al.*, 2008; LONGO; RONGA; MAFFULLI, 2009). Desordens osteomiotendíneas, as quais incluem as tendinopatias, ocupam o posto de terceira condição reumatológica mais comum no Reino Unido, com prevalência de 18 casos por 1000 pessoas (RILEY, 2008).

Acredita-se ainda que esses dados estejam subestimados, haja vista que nem sequer metade da população que sofre com essa afecção busca tratamento, dificultando estipular a escala real do problema, pois essa estimativa baseia-se em dados epidemiológicos levantados nos pontos de atendimento e tratamento da rede de saúde (RILEY, 2008).

No Brasil, a exemplo de outros países, dados oficiais sobre prevalência de disfunções músculo-esqueléticas não são classificados por região acometida ou diagnóstico, contudo sabe-se que as estatísticas do Instituto Nacional de Seguridade Social (INSS) demonstram maior número de concessão de benefícios por Distúrbios Osteo-musculares Relacionados ao Trabalho (DORT), dentre os quais encontram-se as tendinites, já consideradas um problema de saúde pública (MENDONÇA JR; ASSUNÇÃO, 2005).

Devido a essa problemática foi também criado pelo Ministério da Saúde (MS) manuais que tentam esclarecer e orientar a população na tentativa de minimizar a incidência da doença (BRASIL, 2007; BRASIL, 2001).

Apesar da existência de muitos trabalhos clínicos e experimentais sobre esse tipo de acometimento, poucos possuem real significância em função da inconsistência nos dados e problemas metodológicos, o que denota a efetividade insuficiente nos tratamentos disponíveis (RILEY, 2008; MOLLOY; WOOD, 2009).

Recentes estudos demonstraram que a injúria não é um problema restritamente ortopédico, mas sim uma alteração que envolve de forma mais complexa uma interação com o sistema nervoso central e periférico (ELLIOTT *et al*, 2008; SCHIZAS *et al*, 2010).

Mesmo com esforços para combater a injúria, a disfunção cicatricial continua um grande problema no reparo das lesões tendíneas. Muitas vezes é o responsável pela dor, rigidez e incapacidade (RILEY, 2004; PADANILAM, 2009; XU; MURRELL, 2008). Por esse motivo, o manejo na reabilitação das tendinopatias carece de pesquisas. Enquanto isso, a população afetada sofre com o risco de morbidade em longo prazo e evolução clínica indeterminada. Nesse sentido, como a perda funcional é decorrente da disfunção tecidual, as principais características do tecido sadio e das alterações decorrentes da injúria serão descritas.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CARACTERIZAÇÃO DO TENDÃO SADIO

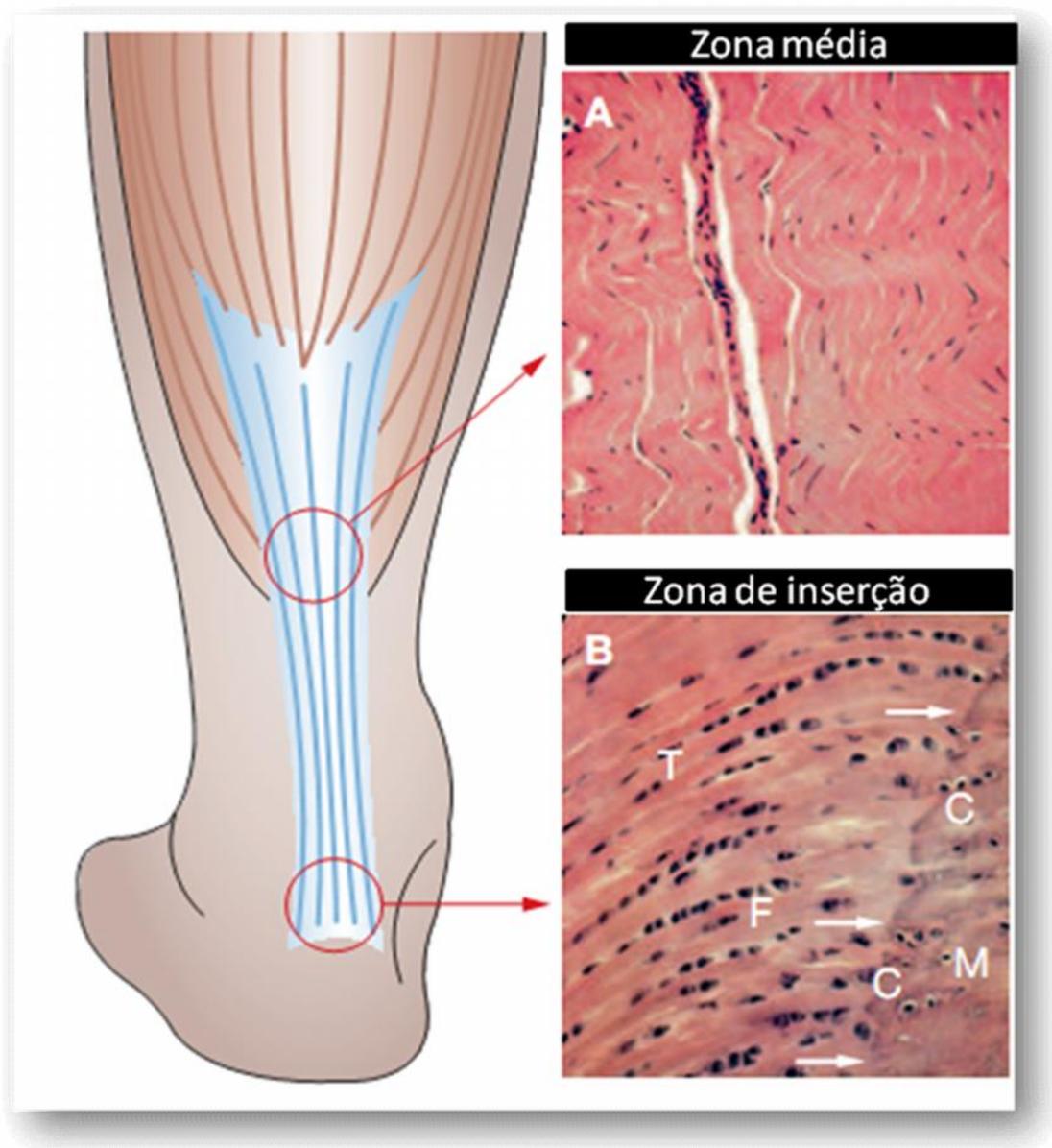
O tendão de Aquiles é formado pelos tendões dos músculos gastrocnêmio medial, lateral e sóleo. Esses três músculos se inserem por meio deste tendão comum no calcâneo, garantindo durante sua contração o movimento de flexão plantar, fundamental para a fase de propulsão na marcha (STROM; CASILAS, 2009).

A constituição tendínea é fundamentada em tecido conectivo denso, cuja resistência garante firme conexão entre músculo e osso para transmissão de força, geração de movimento, estabilização articular e absorção de choques (XU; MURRELL, 2008; RILEY, 2005; CLEGG; STRASSBURG; SMITH, 2007; CRIBB; SCOTT, 1995).

No aspecto microscópico (Figura 1), consistem de feixes de fibras densas e paralelas que se alinham ao longo do eixo do tendão (CRIBB; SCOTT, 1995; KANNUS, 2000). Além de colágeno, estão presentes na ME glicoproteínas, proteoglicanas e água (SHARMA; MAFFULLI, 2006).

Em contraponto, poucas células constituem o tendão. O tipo celular característico do tecido são os tenócitos. Esses fibroblastos especializados são denominados tenoblastos quando células imaturas com alta atividade metabólica, e tenócitos quando denotam menor atividade. Morfologicamente apresentam formato alongado, núcleo proeminente e igualmente alongado e arranjo longitudinal em relação ao eixo de tração (Figura 1A) (RILEY, 2004; KANNUS, 2000; CLEGG; STRASSBURG; SMITH, 2007).

Juntos, tenoblastos e tenócitos formam 90% das células tendíneas. Os 10% restantes correspondem aos fibrocondrócitos, células sinoviais e vasculares, as quais são encontradas nos diferentes compartimentos do tendão (SHARMA; MAFFULLI, 2006).



**Figura 1**– Localização e constituição celular do tendão de Aquiles humano. O tendão é formado pela junção dos tendões de músculos que se inserem no calcâneo (à esquerda). (A) A zona tendínea média é histologicamente constituída por tenoblastos, de morfologia alongada característica e organizados em fileira (B) Na porção mais distal, o tecido apresenta células diferenciadas também em fileiras, essas células garantem a mudança gradual de tensão do tendão (T) para fibrocartilagem (F) e da fibrocartilagem calcificada (C) para o osso mineralizado (M), todas pelos fibrocondrócitos. Em ambas as porções, as células estão inseridas em um denso tecido conectivo formado principalmente por colágeno tipo I. As setas indicam a direção dessa transição no tecido.

Fonte: Adaptado de Riley, 2008.

As principais funções inerentes a essas diferentes populações celulares abarcam síntese de matriz, mediação da interação matriz-citoesqueleto, lubrificação do tecido e mudanças graduais no microambiente mecânico (LONGO; RONGA; MAFFULLI, 2009; CLEGG; STRASSBURG; SMITH, 2007; RILEY, 2008).

### **2.1.1 Divisões**

O início do tendão dá-se na junção miotendínea, onde os miócitos terminam em recessos profundos nos quais as fibras colágenas se inserem. A tensão gerada pelo músculo é conduzida às fibras colágenas, transferindo força ao osso sem risco de ruptura. Para que isso ocorra, a junção osteotendínea se subdivide em quatro zonas: zona densa ou média, fibrocartiláginea, fibrocartilagem mineralizada e osso. Essas zonas diferenciadas (Figura 1B) permitem a ligação gradativa do colágeno ao perióstio prevenindo atrito e desgaste (SHARMA; MAFFULLI, 2006; RILEY, 2008).

De indispensável função, o tendão possui envoltórios delicados cujas funções asseguram o suprimento vascular, linfático e nervoso, além de prover lubrificação visando facilitar o deslizamento dos feixes de fibras (RILEY, 2004; SHARMA; MAFFULLI, 2006; KANNUS, 2000).

### **2.1.2 Vascularização, Metabolismo e Inervação**

Devido à projeção tendínea de uma zona mais vascularizada para uma menos vascularizada, é possível notar zonas de vascularização diferenciadas ao longo do tendão, principalmente no terço médio, onde o potente suprimento muscular não o alcança, e o aporte osteotendíneo é incapaz de nutri-lo. Dessa

forma, o suprimento é extrínseco, proveniente do líquido sinovial (SHARMA; MAFFULLI, 2006; PUFÉ *et al.*, 2005; KJAER, 2004).

Dentre as vias metabólicas, o ciclo aeróbico de Krebs, a glicólise anaeróbia e a via das pentoses fosfato estão presentes nos tenócitos. No tendão de Aquiles, apesar da zona de hipovascularização, sabe-se que o consumo de oxigênio também é menor, tornando-os capazes de exercer sua função por longos períodos sem riscos de isquemia e necrose, entretanto, essa característica favorável para o tecido sadio prejudica os mecanismos de regeneração após a injúria (PUFÉ *et al.*, 2005; SHARMA; MAFFULLI, 2006).

A inervação é dada por ramos nervosos de origem cutânea, muscular e peritendínea. Essas fibras emitem ramos que penetram no epitendão, sem cruzar o corpo principal tendíneo, havendo apenas terminais nervosos em sua superfície. Nesse tecido destacam-se também as fibras mielinizadas do órgão tendinoso de Golgi, um importante mecanorreceptor (SHARMA; MAFFULLI, 2006; ABATE *et al.*, 2009).

O tendão apresenta um mecanismo natural de reposição lenta e progressiva da matriz, constituída essencialmente por colágeno. Na injúria, os mecanismos de reparo também promovem essa reposição, tornando-se indispensável conhecer melhor os passos desse processo (STROM; CASILAS, 2009; GAO *et al.*, 2008).

## 2. 2 FUNÇÃO, SÍNTESE E DEPOSIÇÃO DE COLÁGENO NO TENDÃO

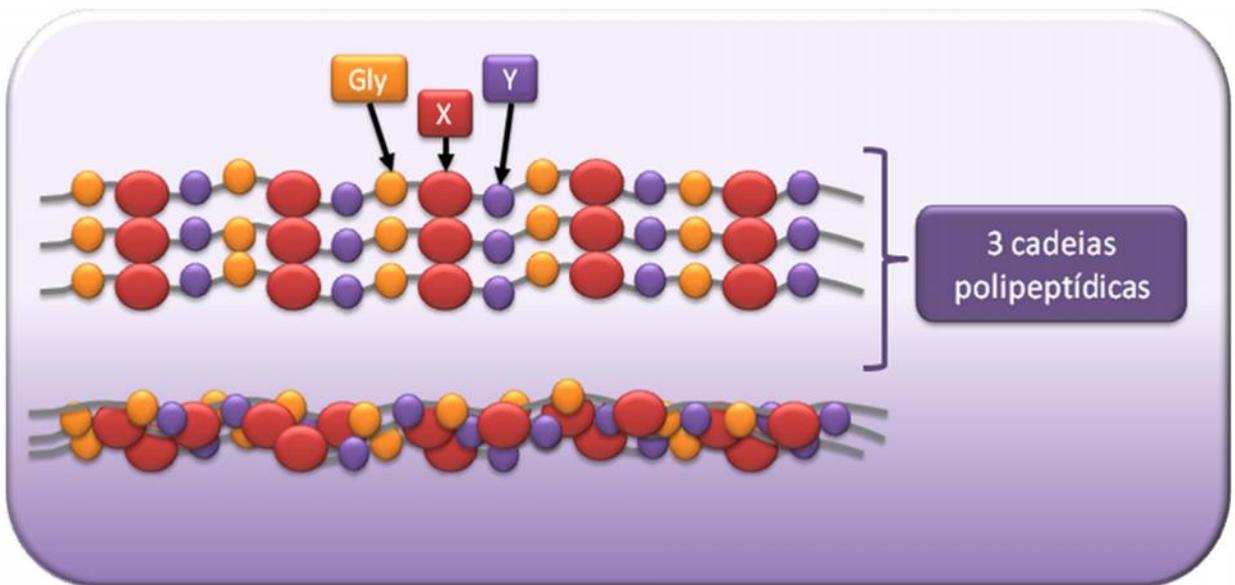
Um dos atributos da matriz extracelular (ME) é garantir suporte às células, de modo que a interação matriz-célula é fundamental em vários aspectos do funcionamento celular (CLEGG; STRASSBURG; SMITH, 2007). São os principais constituintes da ME o colágeno, proteoglicanas, glicoproteínas, glicosaminoglicanas, elastina e água (BALDOCK *et al.*, 2002; SCHULTZ; WYSOCKI, 2009; KAROUSOU *et al.*, 2008).

Apesar da especificidade de cada molécula, o colágeno é quantitativamente a mais freqüente. De particular importância, o colágeno tipo I é o mais abundante no tendão, local onde compõe aproximadamente 95% do colágeno total (CANTY; KADLER, 2002; SHARMA; MAFFULLI, 2006). A estrutura primária dessa proteína envolve três cadeias polipeptídicas, das quais duas são alfa-1 e uma é denominada alfa-2. Estas cadeias apresentam cerca de 300 unidades repetitivas da sequência Gly-X-Y (Figura 2), de modo que a glicina (Gly) pode arranjar-se com qualquer aminoácido, todavia os resíduos designados X e Y são geralmente ocupados por prolina ou lisina e hidroxiprolina ou hidroxilisina, respectivamente (OTTANI *et al.*, 2002; CANTY; KADLER, 2002).

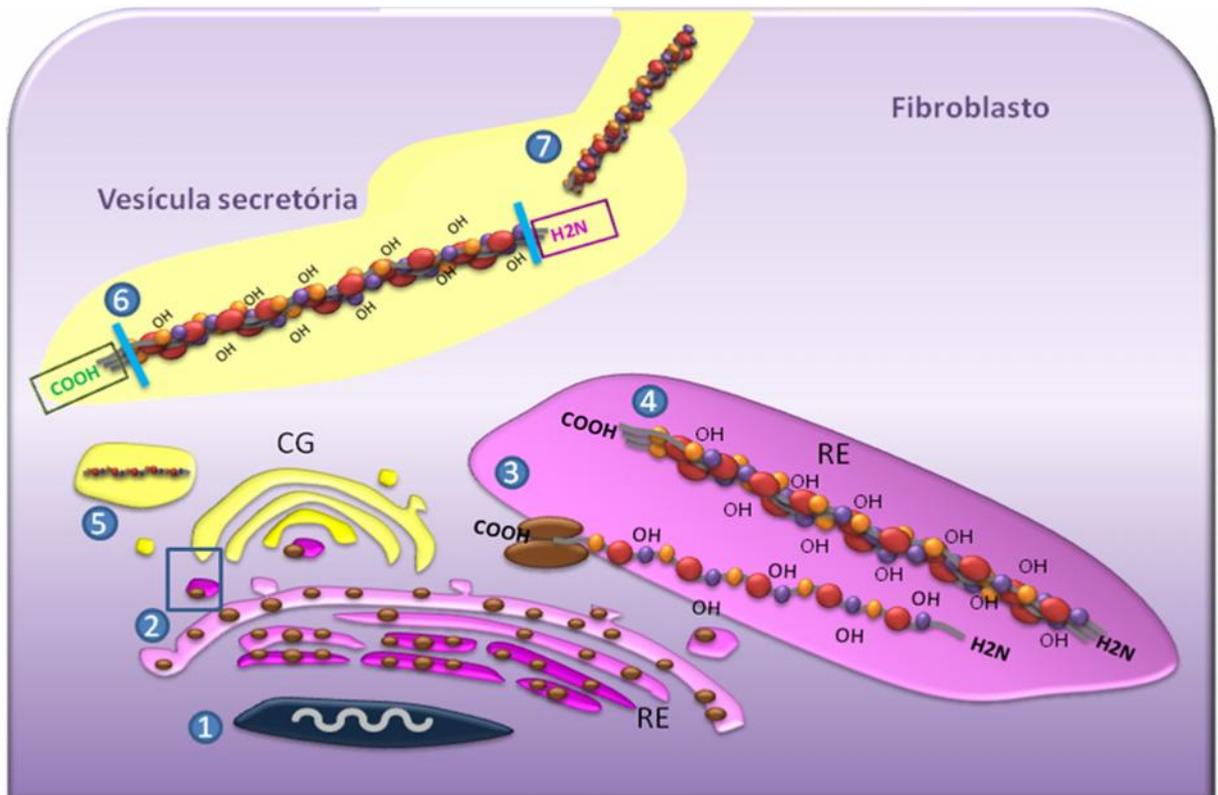
Estas cadeias são traduzidas e translocadas para o retículo endoplasmático do peptídeo N-terminal (N-) para o C-terminal (C-) da molécula, os quais orientam a direção da tripla hélice. O cruzamento do C- pela membrana do RE induz a formação de ligações dissulfeto entre cadeias e propagação da tripla hélice até o N- (CANTY; KADLER, 2002; ALBERTS *et al.*, 2002). Mas para o sucesso na formação da tripla hélice, é imprescindível a conversão em proporções suficientes de prolina a hidroxiprolina pela enzima prolil hidroxilase. Essa etapa é considerada crítica para a função do colágeno (CANTY; KADLER, 2002; MYLLYHARJU, 2003).

Depois de formado, o procolágeno é incorporado ao aparelho de Golgi para seguir uma via secretória (Figura 3). No entanto, como a molécula é muito grande para ser conduzida por vesículas, seu transporte envolve uma série de compartimentos extracelulares definidos pelos fibroblastos (CANTY; KADLER, 2002; OTTANI *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2005). O primeiro nível de compartimentalização envolve canais estreitos fundidos com a membrana celular, originados dentro do citoplasma (ZHANG *et al.*, 2005). Esses canais adicionam seu conteúdo a um segundo compartimento mais superficial (BANOS; THOMAS; KUO, 2008).

No decorrer do transporte da proteína, cada vez mais associado à superfície celular, um terceiro compartimento surge pela justaposição de fibroblastos adjacentes. A hierarquização desses compartimentos garante ao fibroblasto total controle sobre o amadurecimento do colágeno, contudo moléculas capazes de atravessar a membrana, como o NO, são capazes de desestruturar a proteína (BANOS; THOMAS; KUO, 2008; MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991).



**Figura 2** – Estrutura do colágeno. O colágeno é formado por três longas cadeias polipeptídicas com uma seqüência repetitiva dos aminoácidos glicina (Gly) e geralmente prolina ou lisina na posição X e hidroxiprolina ou hidroxilisina na posição Y. Essas cadeias, após uma série de complexos eventos pós-translacionais, resultam em uma molécula organizada em tripla hélice, formando então o procolágeno.



**Figura 3** – Síntese de colágeno. (1) As cadeias polipeptídicas são expressas iniciando o processo da síntese de colágeno (2) Em seguida são transduzidas e translocadas para o retículo endoplasmático do N- para o C-terminal. (3) A passagem do C- dá início a hidroxilação de prolinas e lisinas (4) com subsequente propagação da tripla hélice. (5) O procolágeno é então transportado ao complexo de golgi onde inicia a via secretória. (6) Nesse trajeto ocorre a clivagem dos peptídeos de registro. (7) Finalmente as vesículas secretórias se fundem dando origem a canais que conduzem a proteína ao meio extracelular. RE = Retículo endoplasmático. CG = Complexo de Golgi.

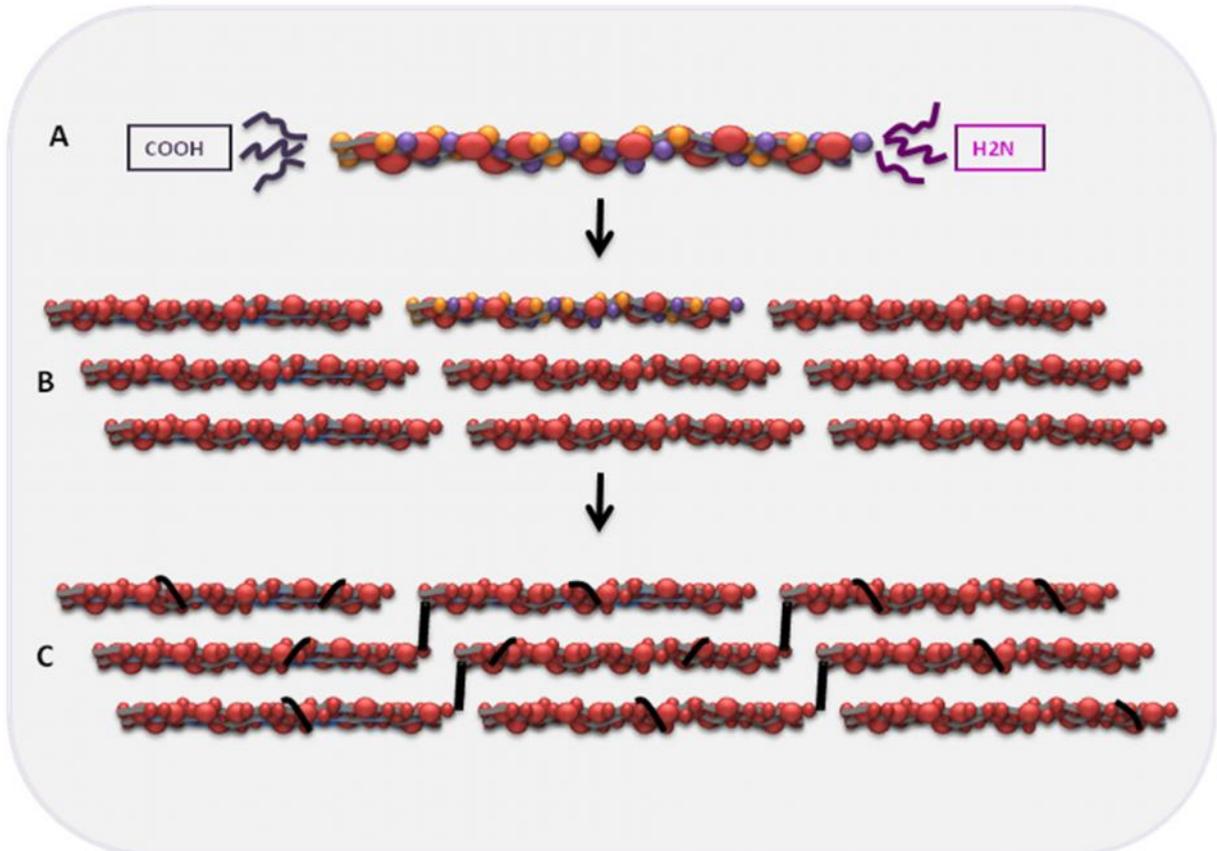
A maturação do procolágeno inicia com a clivagem dos propeptídeos N- e C-terminais pelas procolágeno peptidases, esse passo torna-o hábil para formar estruturas fibrilares (ZHANG *et al.*, 2005; OTTANI *et al.*, 2002).

Para que as fibrilas mantenham-se estáveis é indispensável à ocorrência de ligações cruzadas inter e intramoleculares pela atividade da lisil oxidase (Figura 4) (CANTY; KADLER, 2002). Após a estabilização, acredita-se que ocorram fusões lineares e laterais de fibrilas intermediárias, formando então as fibrilas maduras (ZHANG *et al.*, 2005; BANOS; THOMAS; KUO, 2008). Entretanto, antes do estabelecimento da ligação, a energia iônica, a variação de temperatura e interações com outras moléculas, incluindo espécies reativas de nitrogênio, poderiam desestruturá-la (OTTANI *et al.*, 2002; RICHARDOT *et al.*, 2009). Nesse sentido, este estudo sugere que a inibição do NO na tendinopatia possa contribuir para a regeneração.

### 2.3 ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS DA TENDINOPATIA.

Apesar do termo “tendinite” ser o mais usado para descrever uma gama de condições patológicas no tendão, a nomenclatura mais adequada é “tendinopatia”, haja vista que um diagnóstico preciso requer um detalhamento histopatológico (SHARMA; MAFFULLI, 2006; MOS *et al.*, 2007). Para o caso específico da ruptura mecânica, um quadro inflamatório se instala logo após a lesão, e desaparece concomitantemente ao fim da fase aguda (MOLLOY *et al.*, 2006; FREDBERG; STENGAARD-PEDERSEN, 2008).

Essa disfunção envolve dor, sensibilidade focal, edema, redução da força, limitação funcional e alteração do padrão circulatório local (RILEY, 2008; RILEY, 2005; LONGO; RONGA; MAFFULLI, 2009; XU; MURRELL, 2008). Mesmo com esses dados, a compreensão da patologia não é bem elucidada, dificultando estratégias de tratamento (MOS *et al.*, 2007; LONGO; RONGA; MAFFULLI, 2009).



**Figura 4** – Formação de ligações cruzadas. Após a clivagem dos peptídeos de registro N- e C-terminal ilustrado em (A), a molécula de colágeno torna-se hábil para juntar-se a outras dando origem as fibrilas colágenas, representada pela junção instável de fibras em (B). Um passo imprescindível para a estabilização dessas fibrilas é a geração de ligações cruzadas covalentes inter e intramoleculares, representadas pela adição de linhas pretas em (C), as quais são geradas pela atividade da lisil oxidase.

Os exemplos mais comuns de tendinopatia envolvem disfunções clinicamente chamadas de fascite plantar, tendinite de Aquiles, tendinite patelar, cotovelo de tenista, cotovelo de golfista e tendinite do supra-espinhoso, bastante conhecidas pelo alto índice de incapacidade associado à dor crônica, ainda que realizado os tratamentos indicados (XU; MURRELL, 2008). O tempo de recuperação é incerto, e em alguns casos o insucesso leva a convivência com a dor e limitações funcionais. Bruns *et al.* (2000) mostraram, em um modelo animal da lesão sem intervenções, recuperação histológica análoga ao grupo controle 12 meses após a ruptura experimental do tendão, ilustrando o longo período de recuperação.

### **2.3.1 Etiologia**

A tendinopatia pode estar associada a diversos fatores intrínsecos ou extrínsecos (Tabela 1) como peso, estilo de vida, ocupação, variações individuais e fatores genéticos (RILEY, 2004; RILEY, 2005; XU; MURRELL, 2008; SHARMA; MAFFULLI, 2006; WREN *et al.*, 2001).

Acredita-se também que o dano ocorra por um estresse que ultrapasse o limite fisiológico, e quando repetido várias vezes, promova microtrauma cumulativo, mudando a constituição da matriz de fibras organizadas de colágeno tipo I (COLI) para fibras menos resistentes de colágeno tipo III (COLIII).

Dentre os fatores envolvidos na injúria, destaca-se a participação da molécula óxido nítrico (NO), cuja função na fisiopatologia tendínea continua pouco conhecida, gerando o interesse em investigá-lo neste trabalho (FREDBERG; STENGAARD-PEDERSEN, 2008; SHARMA; MAFFULLI, 2006).

**Tabela 1 – FATORES IMPLICADOS NA TENDINOPATIA CRÔNICA**

<b>FATORES INTRÍNSECOS</b>	<b>FATORES EXTRÍNSECOS</b>
Idade	Ocupação
Perfusão vascular	Esporte
Nutrição	Carga física
Variações anatômicas	Força excessiva
Discrepância no comprimento da perna	Carga repetitiva
Mal alinhamento	Movimentos não usuais
Alteração óssea	Erros de treino
Frouxidão Ligamentar	Técnica inadequada
Fraqueza muscular	Rápida progressão
Gênero (?)	Alta intensidade
Massa corporal	Fadiga
Disfunções sistêmicas	Sapatos e equipamentos
	Condições ambientais
	Temperatura
	Superfície de corrida

Fonte: Adaptado de Riley, 2004.

### 2.3.2 Aspectos Anatômicos e Histológicos

Anatomicamente, o tendão acometido por ruptura apresenta-se opaco, acinzentado e bastante frágil. Microscopicamente é possível delinear três fases histológicas distintas. Na fase aguda, em microscopia de luz, é possível observar um processo inflamatório com numerosas células infiltradas, desorganização e perda de tecido conectivo, refletindo principalmente no dano as fibras colágenas. Na microscopia eletrônica pode-se também detectar a variação na orientação e no diâmetro dessas fibras (MURRELL *et al*, 1997; OTTANI *et al.*, 2002).

Na fase de remodelagem, células mesenquimais migram para o tendão e assumem morfologia análoga ao tenoblasto, iniciando a síntese e realinhamento do colágeno. No entanto, apesar da atividade celular no sentido de repor o tecido perdido, a resposta cicatricial permanece lenta, principalmente devido à degradação de fibras íntegras, o que pode ser influenciado por espécies reativas de nitrogênio (XU; MURRELL, 2008; RILEY, 2008; LONGO; RONGA; MAFFULLI, 2009; PACHER *et al*, 2005).

A rara presença de células inflamatórias e mediadores químicos na fase crônica da lesão sugerem que a inflamação não desempenha o papel chave no transcorrer da tendinopatia. Por outro lado, é importante frisar que apesar da redução progressiva da inflamação, o aumento na produção de NO é verificado ao longo da injúria, desde a fase aguda até a remodelagem (XU; MURRELL, 2008; RILEY, 2004; RILEY, 2008; SHARMA; MAFFULLI, 2006; LIN *et al*, 2001).

Por esse motivo, autores relacionam o NO a processos benéficos para a regeneração, por outro lado, sabe-se que essa molécula tem efeitos difusos, não promovendo apenas efeitos benéficos (SHARMA; MAFFULLI, 2006; TOMIOSSO *et al*, 2010; YUAN *et al*, 2003; GELLER; BILLIAR, 1998).

### 2.3.3 Vascularização e Inervação na Lesão

Na ruptura mecânica do tendão as alterações encontradas são similares às anomalias degenerativas, principalmente na fase crônica, pois o desenvolvimento de uma degeneração análoga à ruptura espontânea é constatado (RILEY, 2008).

A vascularização local sofre mudanças pela expressão do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), cuja presença fisiológica ocorre somente no tendão embrionário. No adulto, o agente vascular predominante é a endostatina, que ao contrário do VEGF, inibe a proliferação e migração de células endoteliais (XU; MURRELL, 2008; PUFÉ *et al.*, 2005).

Após a injúria, o VEGF é expresso na tentativa de promover angiogênese com a finalidade de reparo, tornando o tecido hipervascularizado (PUFÉ *et al.*, 2005). Paralelamente a neovascularização e desorganização do tecido surgem pequenos ramos nervosos que penetram entre a malha de colágeno. Liberados por esses ramos, considerável quantidade de substância P (SP), glutamato, acetilcolina e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) são encontrados, estando todos relacionados à dor crônica presente na injúria. Adicionalmente a esse efeito acredita-se que a SP e CGRP promovam regulação do tecido e proliferação de fibroblastos (BRING *et al.*, 2007; STEYAERT *et al.*, 2006; FORSGREN *et al.*, 2009; SCHIZAS *et al.*, 2010; ACKERMANN *et al.*, 2003; RILEY, 2008).

Apesar dos mesmos eventos presentes na síntese fisiológica de colágeno serem observados na síntese patológica, mudanças no padrão de resposta e atividade dos tenócitos ocorrem devido à presença de diversos agentes modulatórios e alterações no microambiente celular (RILEY, 2005). Por esse motivo melhores explicações sobre as alterações moleculares nessa disfunção serão abordadas.

## 2. 4 BASES MOLECULARES DA REGENERAÇÃO TENDÍNEA

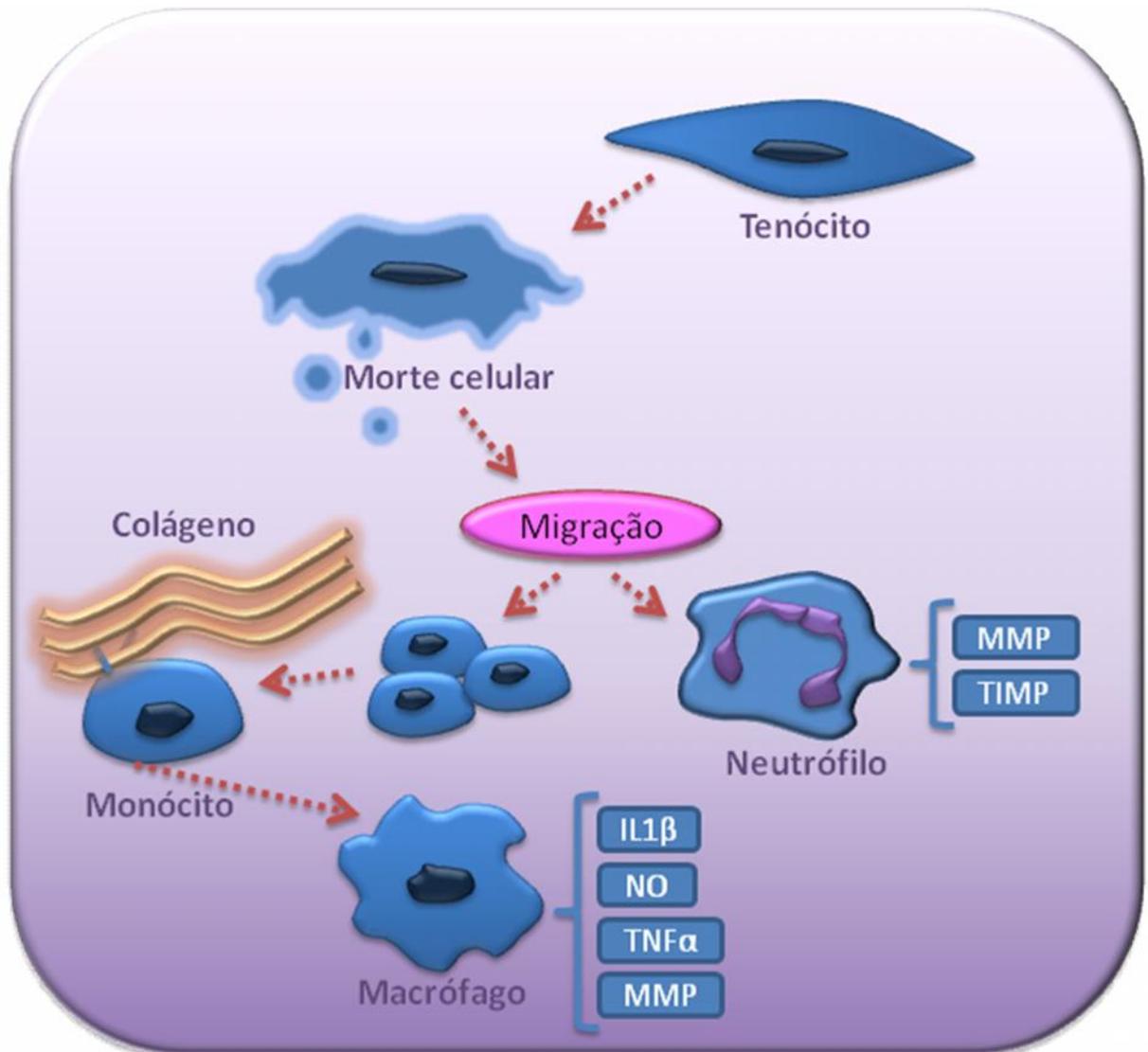
O reparo tecidual envolve uma série de eventos sobrepostos, os quais são didaticamente divididos em fase inflamatória, proliferativa e de remodelamento. Todos os passos dessas fases requerem inúmeros fatores de crescimento e citocinas que atuam temporalmente ordenadas para restabelecer a homeostase pela síntese, deposição e degradação da ME (STROM; CASILAS, 2009; SHARMA; MAFFULLI, 2006; REDDY *et al.*, 1999).

Perante uma lesão, a morte celular por necrose é evidente, já a apoptose, pode ser oriunda da ação de radicais livres gerados na reperfusão após isquemia, hipóxia e hipertermia (XU; MURRELL, 2008; RILEY, 2004; LONGO; RONGA; MAFFULLI, 2009).

A morte por necrose dá início a fase inflamatória, que dura em média cinco dias. Essa fase tem início logo após a lesão, e envolve vasodilatação reativa e infiltração de eritrócitos, neutrófilos, monócitos e macrófagos (SHARMA; MAFFULLI, 2006; PUFÉ *et al.*, 2005).

Ao chegarem ao tecido, os monócitos primeiramente necessitam aderir ao colágeno da matriz (Figura 5) para em seguida se diferenciar em macrófagos. Esses macrófagos iniciam atividade fagocítica, expressão de agentes pró-inflamatórios como interleucina 1 $\beta$  (IL1 $\beta$ ) e fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), expressão da isoforma tipo II da NOS (NOSII) e, juntamente com os neutrófilos, destroem a ME pela liberação de MMPs (RILEY, 2005; POITEVIN *et al.*, 2008; SCHULTZ; WYSOCKI, 2009; ABATE *et al.*, 2009).

O aumento nos níveis de citocinas inflamatórias regulam positivamente a produção de espécies reativas de nitrogênio (ERN), e concomitantemente, inibem a síntese de colágeno, desse modo, atribui-se a ambas ação anti-fibrilogênica (URTASUN; CONDE DE LA ROSA; NIETO; 2008; HEINEMEIER *et al.*, 2003)



**Figura 5** – Eventos moleculares na fase aguda da lesão. Após a morte celular dos tenócitos, o colágeno atua como agente quimiotático para monócitos, os quais se aderem a este e se diferenciam em macrófagos, dando início a liberação de citocinas, óxido nítrico, fatores teciduais e metaloproteases de matriz. Paralelamente a isso os neutrófilos migrantes contribuem liberando mais metaloproteases e inibidores teciduais de metaloproteases.

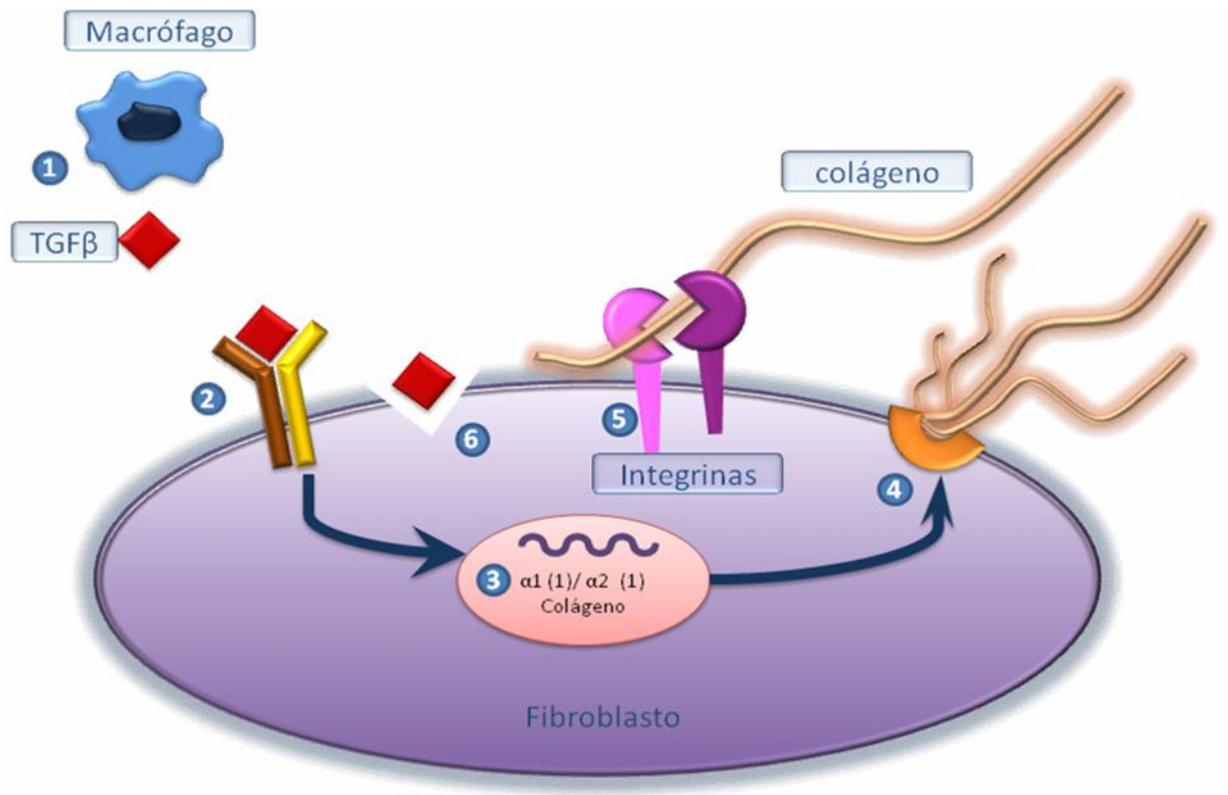
A atividade proteolítica das MMPs é de vital importância para o debridamento da lesão e progressão cicatricial, sendo requisitada em diversas fases do processo. A regulação destas proteases ocorre em nível de transcrição gênica, translação protéica, fatores teciduais e principalmente por inibidores teciduais de metaloproteases (TIMPs) (POITEVIN *et al*, 2008; RILEY, 2004). Somando-se a isso, o NO e o peroxinitrito, um produto da reação com o superóxido, é capaz de modular a ativação de MMPs diretamente (WANG; SAWICKI; SCHULZ, 2002).

Toda essa dinâmica na matriz é mediada por fatores pro-inflamatórios, fatores de crescimento e agentes vasoativos, os quais são liberados pelos fibroblastos, macrófagos, neutrófilos e plaquetas. Esses fatores desencadeiam mecanismos celulares a fim de proteger o tecido de agentes externos, proliferar novas células, diferenciá-las em tipos fenotipicamente análogas as do tecido original e finalmente estimular a síntese protéica (ANITUA *et al*, 2009; HOU *et al*, 2009; VIRCHENKO; GRENEGÅRD; ASPENBERG, 2006b).

Nessa fase, o fator de crescimento ligado à insulina I (IGF-I) e fator de crescimento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), ambos constitutivamente expressos no tendão e reportados como potencializadores da cicatrização intensificam progressivamente suas ações (RILEY, 2008; DAHLGREN *et al*, 2005; CHEN *et al*, 2004).

Concomitante aos eventos moleculares da fase inflamatória se sobrepõe a fase proliferativa, cujo início ocorre entre o 3º e 16º dia após a injúria. Nesse período, fibroblastos imaturos identificados como células-tronco mesenquimais progenitoras do tendão migram para a área, e influenciados pelo TGF- $\beta$  iniciam a síntese de colágeno (Figura 6) (ABATE *et al*, 2009; XU; MURRELL, 2008; CHEN *et al*, 2004).

Oliver e colaboradores (1999) demonstraram que as isoformas tipo I e III do TGF- $\beta$  são bastante eficazes no aumento da síntese e deposição de colágeno na matriz. Os mecanismos pelos quais esse fator estimula a síntese protéica compreendem o aumento da transcrição e estabilização de mRNA para o procolágeno tipo I, estimulação da prolil hidroxilase e lisil oxidase, resultando em maior estabilidade da molécula, melhora na remodelagem do colágeno e redução da degradação pelo controle de MMPs e TIMPs (HOU *et al*, 2009; SIWIK; COLUCCI, 2004; URTASUN; CONDE DE LA ROSA; NIETO, 2008; HEINEMEIER *et al.*, 2003).



**Figura 6** – Representação esquemática da ação do TGF- $\beta$  na síntese de colágeno. O macrófago produz TGF $\beta$  (1), o qual se liga ao receptor do fibroblasto (2) formando um complexo que regula positivamente a transcrição das cadeias que constituem o colágeno (3). O colágeno depois de secretado (4) pode se ligar a integrinas (5) estabelecendo uma ação intensificadora de sua síntese pela indução do aumento na produção de TGF $\beta$  da própria célula (6), retomando o ciclo.

Nesse contexto de intensa atividade sintética, surge a última e mais longa etapa cicatricial, a diferenciação ou remodelagem, cujo objetivo é regular a reposição dos constituintes da matriz (REDDY *et al.*, 1999; ABATE *et al.*, 2009; CURRAN; WINTER; BOUCHIER-HAYES, 2006).

Apesar de hipóteses existentes, os fatores que realmente induzem a remodelagem na tendinopatia não são bem conhecidos. No tendão sadio um processo contínuo de remodelagem ocorre de forma lenta e equilibrada, contrapondo a injúria, onde um desequilíbrio entre TIMPs e MMPs pode degradar progressivamente a matriz, desencadeando variações na quantidade e maturação de colágeno (RILEY, 2004; RILEY, 2008; KAROUSOU *et al.*, 2008; MOS *et al.*, 2007). Acredita-se também que na injúria as MMPs sofram modificações estruturais decorrentes de nitrosilação ao longo das fases de reparo, comprometendo a remodelagem do tecido (URTASUN; CONDE DE LA ROSA; NIETO; 2008; HEINEMEIER *et al.*, 2003).

As alterações do colágeno no tendão em função da injúria geram transtornos que podem ser avaliados pelo declínio das propriedades biomecânicas e funcionais, observadas tanto em humanos quanto em animais experimentais, dessa forma é indispensável conhecer um pouco a cerca dessas propriedades.

## 2.5 REMODELAGEM E PROPRIEDADES BIOMECÂNICAS E FUNCIONAIS.

Como fora visto anteriormente, a remodelagem do colágeno é fundamental para a regeneração tendínea, isso se deve a relação direta do tamanho, número e orientação das fibras com o componente mecânico de suporte a tensão, de modo que uma aceleração regenerativa atrelada à manutenção de propriedades biomecânicas é indispensável do ponto de vista funcional para o indivíduo (COOK *et al.*, 2004; ABATE *et al.*, 2009; REDDY *et al.*, 1999).

A orientação em paralelo aliado a formação de ligações cruzadas do colágeno remete-nos a uma qualidade geral dos materiais, cuja orientação aleatória facilita um

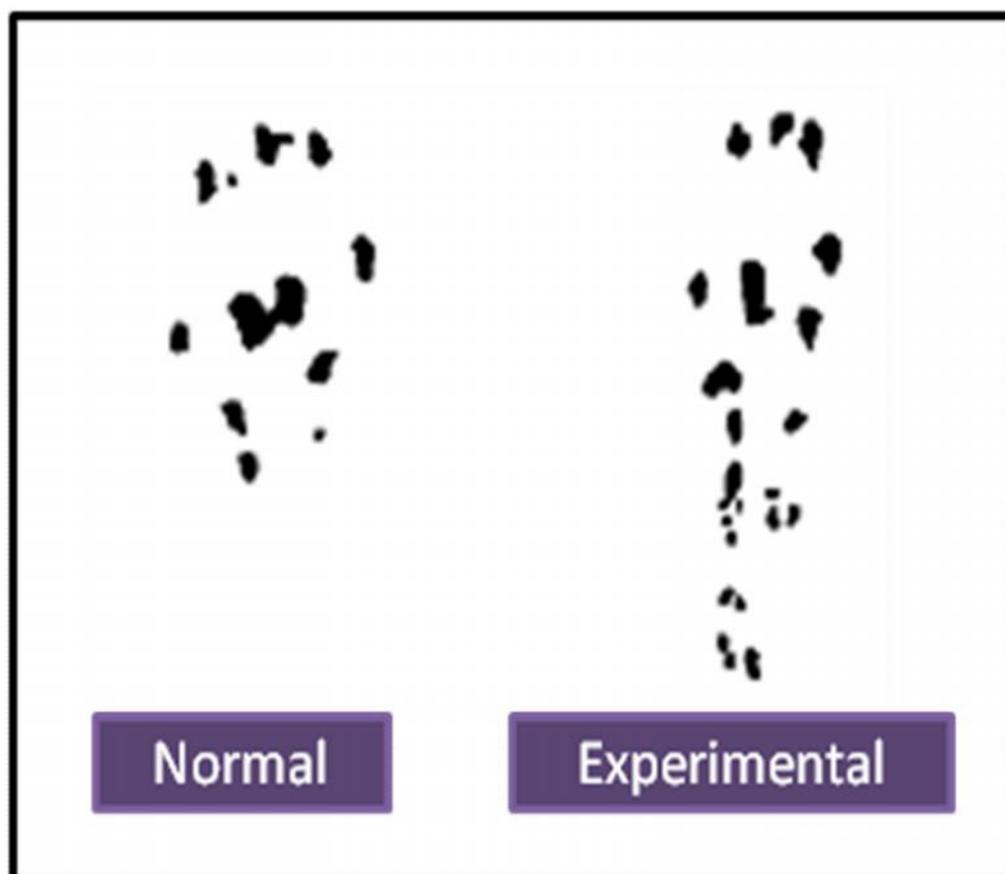
maior estiramento com menor força de tração, por outro lado, quando o material é predominantemente paralelo e coeso, suporta uma tração mais intensa antes de se estirar e romper. Esse atributo é muito bem caracterizado em diversos experimentos biomecânicos, sugerindo que a presença de colágeno alinhado é essencial para a função do tendão, o qual se estima suportar tensões de até 111 MPa (WREN *et al*, 2001; REDDY *et al*, 1999; MOLLOY; WOOD, 2009; GIGANTE *et al*, 2009).

Experimentos demonstram que a injúria tendínea prejudica as propriedades biomecânicas comparado a tendões intactos. Esses estudos também evidenciam a existência da correlação entre propriedades bioquímicas, estruturais e biomecânicas do tecido (REDDY *et al*, 1999; WREN *et al*, 2001; HOU *et al*, 2009).

Fundamentado nessa relação, Tomiosso e colaboradores (2009) demonstraram que algumas propriedades biomecânicas eram prejudicadas após a inibição sistêmica da NOS, no entanto, as análises bioquímicas da mesma pesquisa foram incompatíveis com o agravo sugerido pela avaliação biomecânica, indicando possíveis problemas no modelo de inibição sistêmica da síntese de NO.

O suporte e distribuição de tensões transmitidas do músculo ao osso pelo tendão são de tal importância, que portadores de patologias que comprometem a síntese ou estabilidade do colágeno apresentam sérios danos na função locomotora. Dentre as patologias destacam-se a *osteogenesis imperfecta* e a síndrome de *Ehlers-Danlos*, ambas de caráter genético. Nessas síndromes a anomalia no tecido conectivo de todo o corpo prejudicam e fragilizam o indivíduo, os quais são freqüentemente acometidos por ruptura tendínea (GAJKO-GALICKA, 2002; RILEY, 2004; BAILEY; PAUL; KNOTT, 1998; TAKALUOMA *et al*, 2007; ITO *et al*, 2010).

Após a transecção tendínea em modelo animal, a marcha apresenta um nítido distúrbio indicado pela diferença na pegada, tornando-se consideravelmente mais longa e estreita no membro afetado (Figura 7). Nesse sentido, pesquisas visando caracterizar alterações funcionais em animais com a injúria, propuseram um modelo de índice funcional de Aquiles (IFA) baseado em outros largamente utilizados, tal como o índice funcional do ciático (MURRELL *et al*, 1992).



**Figura 7** – Diferença na pegada durante a marcha livre de animais saudáveis e com lesão tendínea em fase inicial.

Fonte: Adaptado de Murrell et al, 1994.

O IFA consiste em uma avaliação da função do tendão de Aquiles. Baseia-se na diferença da marcha e conseqüentemente da pegada entre animais sem e com a lesão. A pegada dos animais é obtida após deixarem-na impressa sob um papel branco, sendo posteriormente analisados os parâmetros específicos para esse índice, os quais são calculados utilizando-se uma equação padrão para gerar o valor do IFA (MURRELL *et al*, 1992; SEE *et al*, 2004).

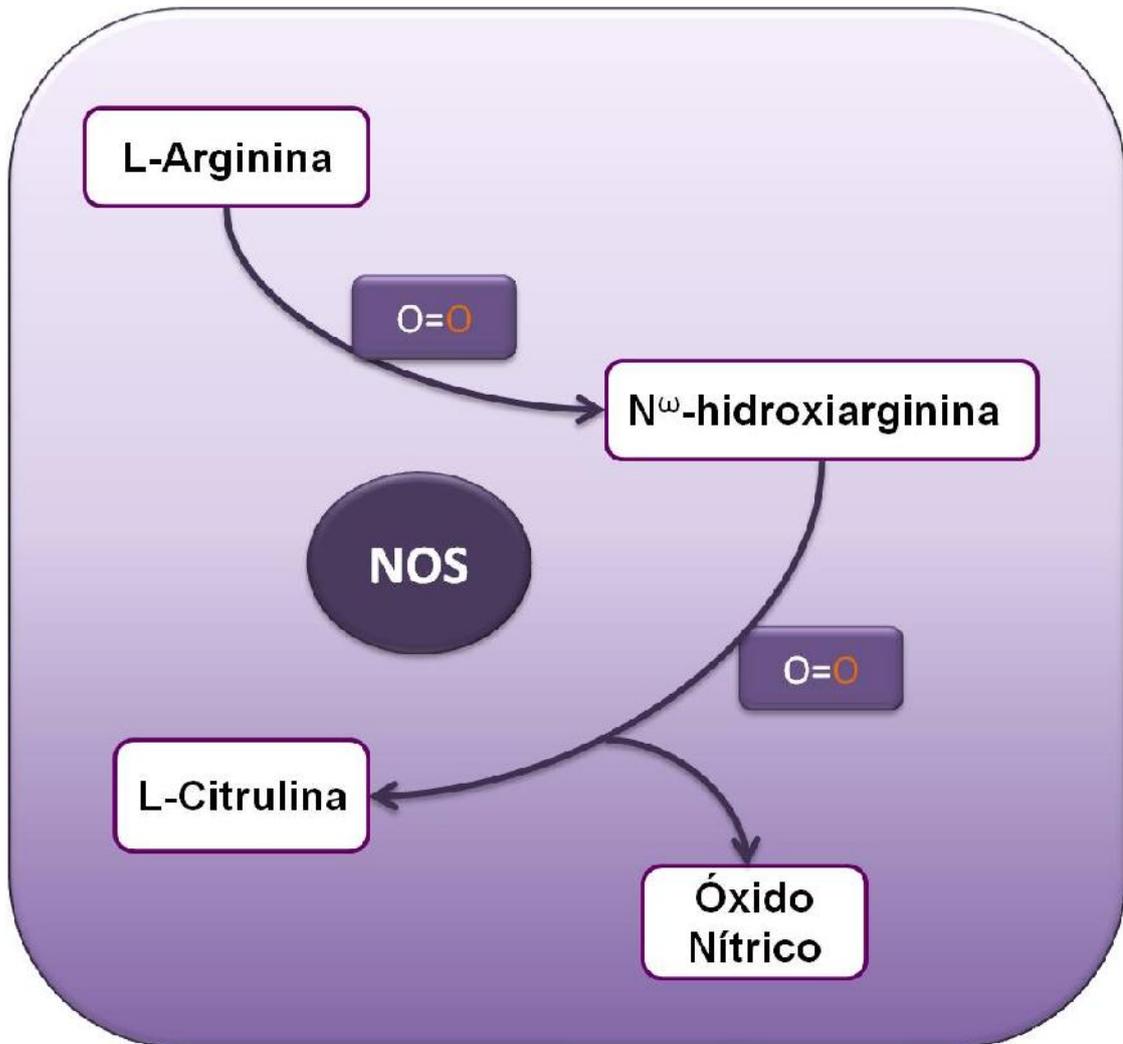
O IFA é sensível para avaliar a lesão e possui correlação com propriedades biomecânicas, tornando-o um importante aliado em pesquisas para intervenções e tratamentos (BEST *et al*, 1993; NG *et al*, 2003; SEE *et al*, 2004).

Nesse sentido, apesar do desempenho biomecânico já ter sido relacionado com a modulação nitrérgica, o desempenho funcional ainda não foi detectado nesse contexto, havendo assim a possibilidade de estudá-lo nesse trabalho, para isso, é importante conhecer o principal representante desse sistema, o óxido nítrico.

## 2. 6 O ÓXIDO NÍTRICO

A síntese do NO é realizada pela família de enzimas óxido nítrico sintase (*Nitric Oxide Synthase* - NOS). Essas enzimas 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), a qual produz NO em larga escala, por conseguinte desempenhando um papel citotóxico (MONCADA; HIGGS, 1995; MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991; MONCADA, 1999; VALLANCE, 2003; ABRAMSON, 2008; KAWANO *et al.*, 2009).

Estas enzimas utilizam como substrato (Figura 8) a L-arginina, um aminoácido que é oxidado a N-hidroxiarginina, e em seguida a NO e L-citrulina (KNOWLESS; MONCADA, 1994; MONCADA; HIGGS, 1995; ARCHER, 1993).



**Figura 8** – Síntese de óxido nítrico. O aminoácido L-arginina é oxidado pela enzima óxido nítrico síntese a uma molécula intermediária chamada N<sup>ω</sup>-hidroxiarginina. Essa molécula passa por uma nova oxidação gerando finalmente o NO e L-citrulina.

Depois de sintetizado, o NO ativa reversivelmente a guanilato ciclase, produzindo guanosina monofosfato cíclico (GMPc), um importante segundo mensageiro intracelular. De outro modo, o NO pode ser metabolizado ao reagir com oxihemoglobulina formando nitrato e metahemoglobulina, assim sendo eliminado (VALLANCE, 2003).

Outras possibilidades são interações com biomoléculas acarretando alterações na atividade biológica; reação com oxigênio gerando nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ); reações com EROs, como o ânion radical superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) gerando peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), ou ainda ligações a metais de transição, cruciais para o funcionamento de diversas enzimas (KNOWLESS; MONCADA, 1994; ARCHER, 1993).

Os efeitos de interação do NO com outras moléculas no tendão não são bem conhecidos. É possível a ocorrência de s-nitrosilação de proteínas envolvidas na síntese bem como no próprio colágeno, o que ainda não foi descrito no tendão. Contudo, já foi referido na literatura que o COL III pode sofrer nitrosilação, estando intensamente associado a doenças degenerativas como osteoartrite e artrite reumatóide. Além disso, o NO pode atuar também como agente inibitório de importantes enzimas para a síntese de colágeno, como demonstrado para a prolil hidroxilase (CAO *et al* 1997; RICHARDOT *et al*, 2009; DOOLEY *et al.*, 2007).

## 2.7 ÓXIDO NÍTRICO E REGENERAÇÃO DO COLÁGENO NO TENDÃO

Estudos sobre a relação entre NO e regeneração são bem evidenciados em tecidos como pele e coração (HSU *et al*, 2006; WANG; SAWICKI; SCHULZ, 2002), entretanto a mesma abordagem para regeneração tendínea é carente de estudos. A maioria dos trabalhos existentes conta com a administração sistêmica de drogas que modulam a formação de NO (MURREL *et al.*, 1997; MURREL, 2008; MURREL *et al.*, 2007; TOMIOSSO *et al.*, 2009). Sabe-se, porém que essa molécula é fundamental para diversas atividades celulares, portanto, uma inibição sistêmica prejudicaria a

homeostase corporal, inviabilizando avaliar a ação da molécula na injúria, restrita a zona tendínea (MONCADA, 1999; JAFFREY; SNYDER, 1995).

Murrell e colaboradores (1997) mostraram com o bloqueio sistêmico das NOS uma redução na magnitude da regeneração, sugerindo que o NO poderia ser importante para a cicatrização. Entretanto, é válido notar que após a inibição sistêmica das NOS foi detectado uma série de comprometimentos concomitantes ao efeito danoso no tendão, sustentando a hipótese da inibição sistêmica prejudicar a homeostase, acarretando em problemas na defesa contra microorganismos, adesão celular, resposta imunológica e outras ações ligadas a atividade do NO, culminando no déficit regenerativo (MURRELL, 2007; VALLENCE, 2002).

Indícios da atuação benéfica do NO nas tendinopatias são demonstrados no papel estimulatório do NO para a transcrição e tradução de genes fundamentais para a cicatrização (MOLLOY *et al.*, 2006). Outros dados apontam ainda que a inibição da NOS com única dose de L-NAME no estágio inicial da injúria intensificava a resposta inflamatória crônica (DARMANI; CROSSAN; CURTIS, 2004).

Baseado nesse efeito, pesquisas visando testar intervenções farmacológicas também mostraram que a administração de doadores de NO como nitroflurbiprofen proporcionaram melhora nas propriedades biomecânicas, contudo essa droga comprometeu o reparo. Em nova tentativa com o NO-paracetamol, apesar de falhar na recuperação biomecânica, notou-se aumento no teor de colágeno e melhora histológica (YUAN *et al.*, 2003; MURRELL *et al.*, 2008).

Resultados favoráveis referentes à atuação do NO na regeneração levaram a execução de ensaios clínicos. Nesses estudos, o tratamento local diário com um doador de NO, o trinitrato de gliceril (TNG), em pacientes com epicondilite lateral reduziu os sintomas, melhorou a função e o ganho de força. Em outro trabalho, o TNG foi usado para tratar tendinopatia de Aquiles, contudo nenhum benefício clínico foi observado. Entretanto, em ambos os estudos foram notados efeitos colaterais como cefaléia, parestesia e vertigem (PAOLONI *et al.*, 2003; KANE *et al.*, 2008).

Contraopondo as informações que sustentam um possível benefício do NO para a regeneração, Dooley e co-autores (2007) mostraram que a síntese de colágeno *in vitro* era inibida pela adição de NO, principalmente via nitroprussiato de sódio (*Sodium Nitroprusside* - SNP). Essa inibição parece ter sido induzida por

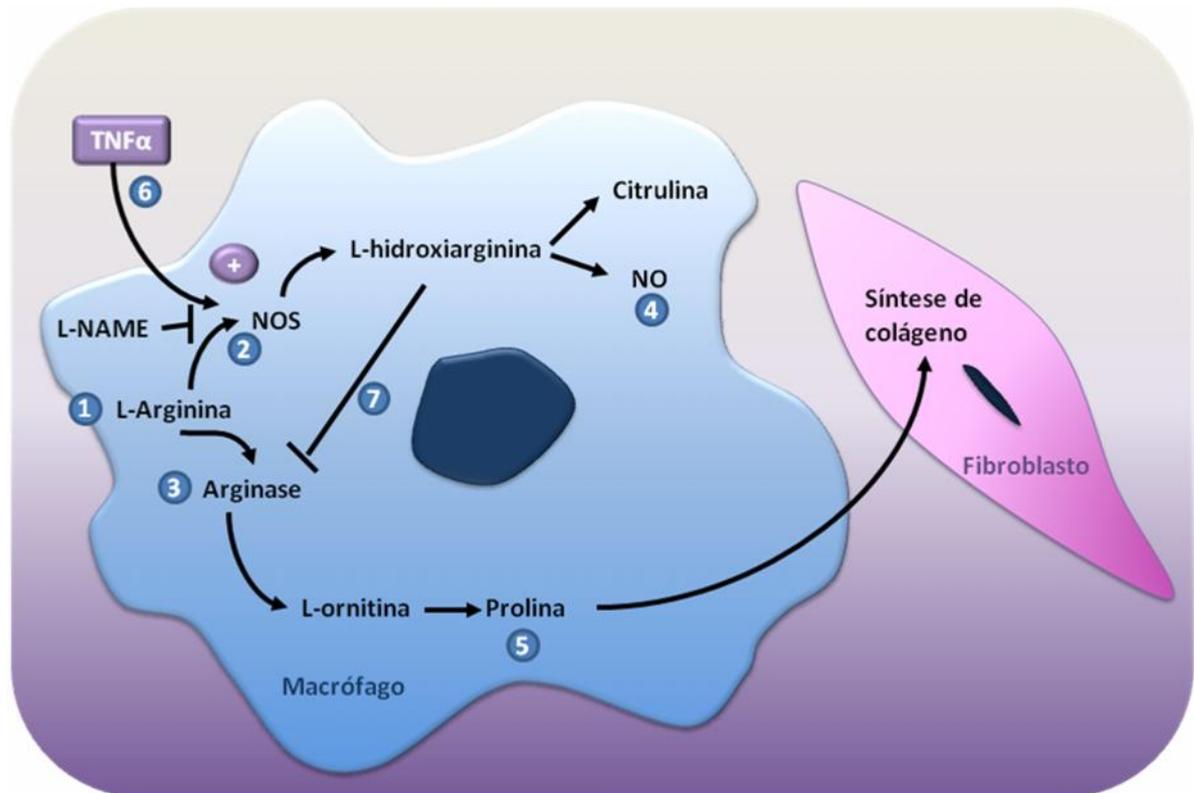
efeitos do NO em eventos pós-transcricionais do colágeno aliado a um aumento em sua degradação.

Yoshida *et al* (2006) e Moncada (1999) asseguram a existência de diferenças relacionadas à função do NO dependendo da enzima que a produz. Efeitos diferentes são atribuídos ao tecido onde é sintetizado vinculado às diferentes capacidades sintéticas das NOS. As NOSI e II contribuiriam para o estado de injúria do tecido em que estão sendo produzidas por efeito citotóxico, enquanto a NOSIII desempenharia uma função protetora, ajudando a preservar o fluxo sanguíneo e regular a formação de capilares (MIKIROVA *et al.*, 2008; YOSHIDA *et al*, 2006).

Nesse sentido, foi mostrado por Xia e grupo (2006), que o tendão de camundongos nocaute para NOSI recuperava-se espontaneamente bem, ou seja, a ausência dessa isoforma não implicava em problemas cicatriciais. Em outro estudo, observou-se que a suplementação com arginina causou notável regeneração tecidual em animais selvagens, porém não alterou o padrão regenerativo de animais nocaute para NOSII (SHI *et al.*, 2002).

A arginina é um substrato comum para a NOS e arginase. Esse aminoácido pode ser desviado da via da NOS para a via da arginase (Figura 9) formando uréia e ornitina, essencial para a formação de colágeno e poliaminas. Essa hipótese não deve ser descartada para justificar a melhora regenerativa ocasionada pela suplementação com arginina (DEBATS, 2009; BALLIGAND; FERON; DESSY, 2009).

Investigações envolvendo especificamente o tendão mostram que o efeito do NO na síntese e orientação de colágeno não chega a ser tão discrepante, todavia, pesquisas em outros órgãos como pulmão (MATTHIESEN *et al.*, 2008), coração (GAO *et al.*, 2008; SIWIK & COLUCCI, 2004) fígado (URTASUN *et al.*, 2009; URTASUN; CONDE DE LA ROSA; NIETO, 2008; VERCELINO *et al*, 2010) e pele (CORSETTI *et al.*, 2010; DOOLEY *et al.*, 2007; ACHUTH *et al.*, 2005; HSU *et al.*, 2006; OBAYASHI *et al.*, 2006) puderam constatar de forma mais intensa essa relação dual do NO e seus produtos, caracterizando efeitos modulatórios difusos para a síntese de colágeno.



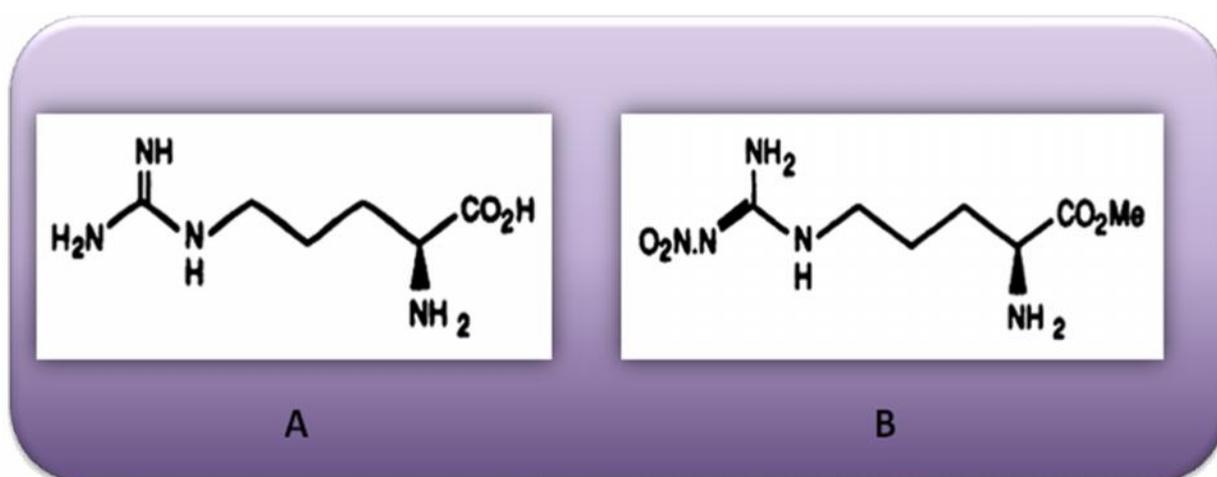
**Figura 9** – Relação entre NOS e arginase. A L-arginina (1) é o único substrato das enzimas NOS (2) e Arginase (3). O aminoácido poderia ser disputado por ambas às enzimas para gerar NO (4) ou prolina (5). Na fase aguda, estímulos externos como TNF $\alpha$  (6) podem intensificar essa disputa favorecendo a via nitrérgica. Além disso, a L-hidroxiarginina (7) inibe a atividade da arginase, mostrando mais um papel negativo do sistema nitrérgico para a síntese de colágeno.

No tecido hepático, já foi claramente estabelecido que as EROs e ERNs apresentam ações antagônicas, a primeira seria pró-fibrótica e a segunda anti-fibrótica, fato ainda não descrito no tendão (URTASUN *et al.*, 2009; URTASUN; CONDE DE LA ROSA; NIETO, 2008).

Nesse contexto, devido às funções sistêmicas diversificadas do NO, o uso de um inibidor atuando indiscriminadamente nas NOS acobertaria a real função desempenhada para a recuperação de uma lesão restrita.

Juntamente a isso, um dos efeitos do NO é a manutenção do tônus vascular, por sua vez, a depleção dessa molécula promove quadros de hipertensão por vasoconstrição sistêmica (TOFOVIC *et al.*, 2005). Esses baixos níveis de NO circulante em indivíduos com quadro inflamatório focal pode suscitar redução potencial nas respostas de ativação do sistema imune e migração celular, prejudicando a regeneração tecidual (GURDOL *et al.*, 2010).

Não foi identificada nenhuma pesquisa que averiguasse o efeito da inibição local da síntese de NO na regeneração tendínea. Partindo desse princípio, o presente trabalho levanta a hipótese de que a inibição local com o análogo da L-arginina, o L-Nitro-Arginina-Metil-Éster (Figura 10) exerceria um papel predominantemente positivo para o reparo tendíneo, minimizando os efeitos prejudiciais do NO.



**Figura 10** - Estrutura química da L-arginina (A) e seu análogo usado na pesquisa, L-NAME (B).  
Fonte: Adaptado de Moncada et al, 1991.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do bloqueio da ativação nitrérgica local por meio do uso de L-nitro-arginina-metil-éster (L-NAME) no reparo do tendão de Aquiles em ratos submetidos à lesão tendínea.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- ✓ Averiguar por meio da dosagem de nitrito a ativação nitrérgica no tendão na fase crônica da lesão e a efetividade da inibição pelo uso do L-NAME, conforme o modelo experimental estabelecido, após 21 de lesão.
- ✓ Avaliar através de microscopia de luz o efeito da inibição nitrérgica local na organização tecidual após 21 dias de injúria.
- ✓ Caracterizar através de microscopia de luz e autofluorescência o padrão de orientação das fibras colágenas entre os grupos experimentais 21 dias após a ruptura, e o efeito da inibição nitrérgica local nessa orientação.
- ✓ Avaliar com base no Índice Funcional de Aquiles o padrão funcional da marcha no grupo controle, e o progresso da recuperação funcional para o grupo ruptura+veículo.
- ✓ Verificar o efeito da inibição nitrérgica local no desempenho funcional da marcha dos animais utilizando o Índice Funcional de Aquiles.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS

Foram utilizados 40 ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), com massa corporal na faixa de  $302 \pm 36$  g provenientes do Biotério pertencente ao Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará (ICB-UFPA). Os animais permaneceram em gaiolas de polipropileno padrão, mantidas em ambiente controlado com ciclo claro/escuro de 12 horas, além de receberem água e ração balanceada *ad libitum*. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com animais de experimentação da UFPA (CEPAE-UFPA) sob o parecer BIO021-11.

### 4.2 PESAGEM DOS ANIMAIS

Como um dos efeitos notáveis da inibição nitrérgica sistêmica em modelo animal é a perda de massa corporal (YUAN *et al*, 2003; TOFOVIC *et al*, 2005), verificamos esse parâmetro, comumente usado, para indicar alterações sistêmicas induzidas pela administração da droga. Para isso, todos os animais foram pesados antes do início dos experimentos e uma vez por semana até o dia do sacrifício para posterior análise comparativa com o grupo controle.

#### 4. 3 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Os animais foram anestesiados com Ketamina 10% (80mg/kg) e Cloridrato de Xilazina a 2% (12mg/kg) com aplicação intraperitoneal. A pele sobre a região posterior da tíbia do membro posterior direito foi tricotomizada manualmente. Posteriormente à assepsia local, realizou-se uma incisão longitudinal de cerca de 0,5 cm na pele acima da inserção calcânea para ter acesso ao tendão do tríceps sural e isolá-lo. Após a dissecação foi realizada a sutura de Kessler (MURRELL et al, 1992), ocorrida antes da ruptura devido ao diminuto tamanho do tendão. Em seguida, o mesmo foi seccionado totalmente por cisalhamento transversal.

Posteriormente, o tendão e a pele foram suturados com fio de poliamida monofilamento não absorvível número 4.0, e submetida novamente à assepsia local.

Após a lesão não houve nenhuma restrição ou imobilização do segmento, apenas higienização diária com solução fisiológica até a cicatrização da pele. Ao final do tratamento, como estabelecido para cada grupo experimental, os animais foram sacrificados no 21º dia após a lesão por meio de deslocamento cervical ou guilhotina.

#### 4. 4 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Esta pesquisa propôs quatro grupos experimentais. O primeiro foi constituído de animais totalmente sadios (controle; n=8). O segundo grupo foi submetido à ruptura e recebia solução salina 0,9% (ruptura+veículo; n=8). O terceiro foi sujeito a lesão experimental e recebeu tratamento com o inibidor não seletivo da síntese de óxido nítrico, L-nitro-arginina-metil-éster (L-NAME; Sigma, St. Louis, Mo. USA) diluído para a concentração de 5mM em solução salina (ruptura+LNAME; n=8). Por fim, o quarto grupo passou pela lesão experimental e recebeu o doador de óxido

nítrico, nitroprussiato de sódio (SNP; Sigma, St. Louis, Mo., USA) diluído para a concentração de 3mM em solução salina (ruptura+SNP, n=8). Adicionalmente a esses grupos, utilizamos 8 animais submetidos à lesão sem nenhuma outra intervenção para avaliar a ativação nitrérgica (n=5) e o padrão histológico de nosso modelo (n=3). Um resumo esquemático com os grupos experimentais e a metodologia é descrito na figura 11.

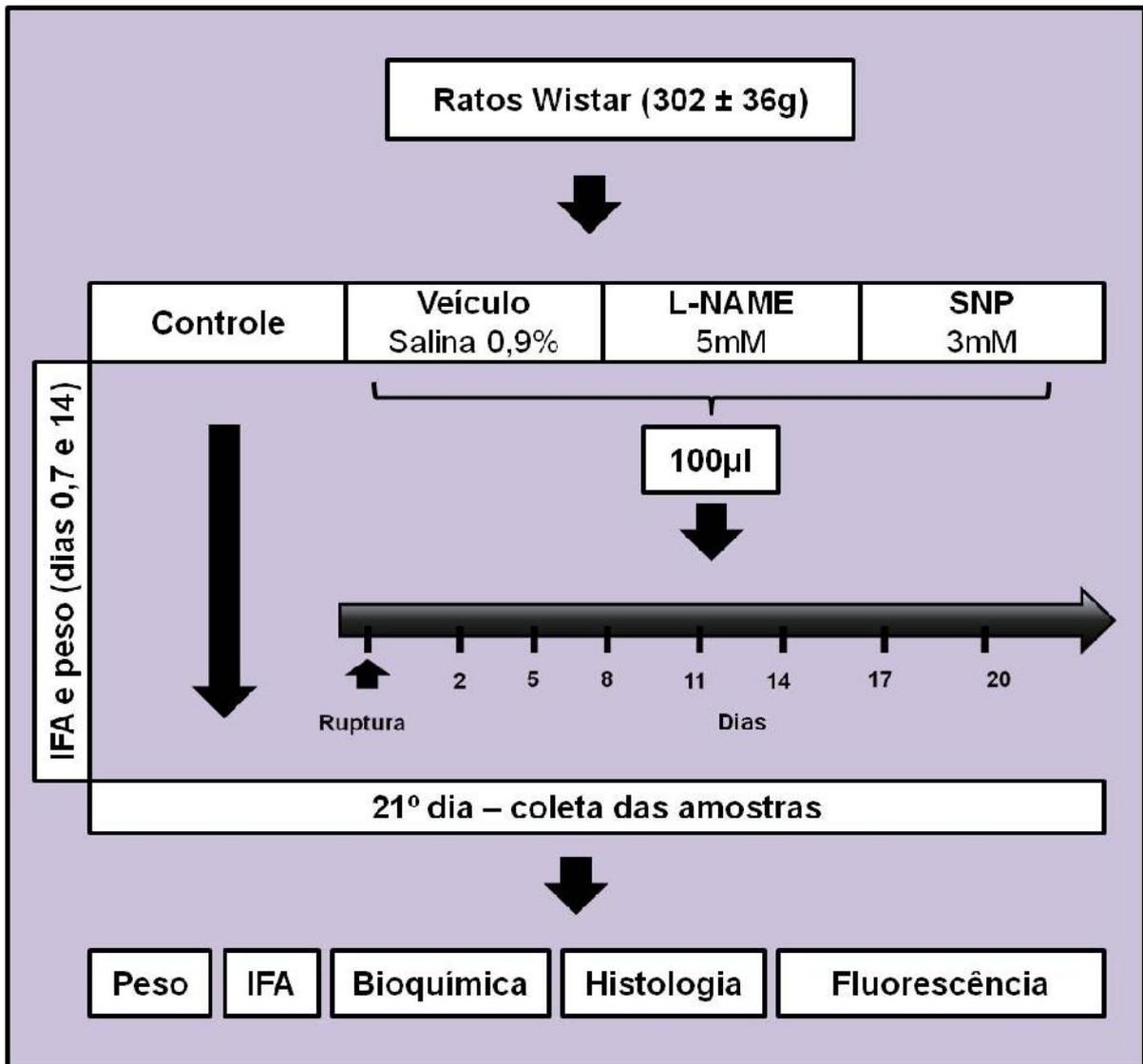
O volume de 100µl de cada solução foi administrado na região paratendínea com uma seringa calibre 26 a cada dois dias a partir do segundo dia pós-lesão, estendendo-se até o 20º dia. No 21º dia, todos os ratos foram mortos por descolamento cervical ou guilhotina.

Os animais foram avaliados quanto ao ganho de massa corporal e padrão de marcha, enquanto as amostras de tendão foram usadas para análise histológica, bioquímica e de fluorescência. Para a análise bioquímica foi usado também o sangue do animal.

Ressaltamos que todos os animais dos grupos passavam por pesagem e avaliação funcional (n=8). Destes, três foram usados para histologia e fluorescência, e cinco foram destinados a avaliação bioquímica.

#### 4. 5 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Para análise histológica o tecido foi fixado por 24h em paraformaldeído preparado a 4% diluído em tampão fosfato (0,1M, pH 7.4). Depois de fixado, o tecido foi lavado em tampão fosfato por três vezes consecutivas, para em seguida ser crioprottegido por 24h em sacarose a 30% diluída também em tampão fosfato, conforme adaptado de ELLIOTT *et al*, 2008. Após a crioproteção, o material foi embebido em Tissue Tek (Sakura Finetek, Inc., Califórnia, USA) para ser cortado em 15 µm de espessura com orientação longitudinal em criostato (Leica, CM3050 S) ajustado para -24°C.



**Figura 11** – Diagrama esquemático do desenho experimental da pesquisa. Os tratamentos foram realizados a partir do segundo dia após a injúria, sendo administrados novamente a cada dois dias, conforme indicado nos dias em destaque ao longo da seta horizontal. No 21º dia os animais eram sacrificados para obtermos amostras de sangue e tecido.

As secções obtidas foram coradas com a técnica de hematoxilina e eosina (HE). Para isso, as lâminas inicialmente foram imersas em xilol por duas vezes consecutivas durante 5 minutos cada para então passarem por uma bateria decrescente de álcool na seguinte ordem e diluição: 100%, 100%, 95%, 90%, 80% e 70%, mantendo-as em cada diluição por 5 min. Após essa bateria, as lâminas foram imersas em hematoxilina de Harris por 40 segundos. Depois dessa coloração o tecido foi lavado em água deionizada por 20 minutos. A seguir, as lâminas foram imersas em eosina por mais 30 segundos e então lavadas em água deionizada por 20 minutos. Após esse último passo, as lâminas eram submetidas ao processo de desidratação, passando pela bateria agora crescente de álcool, na sequência de 70%, 80%, 90%, 95%, 100% e novamente 100%. Por fim as lâminas foram imersas em xilol e montadas em glicerol diluído em água deionizada a 30%. Um microscópio de luz (Nikon, Eclipse E800 Yokohama, Japan) com câmera digital (Nikon, DXM 1200, Japan) acoplada foi usado para análise histológica e captura de imagens, as quais foram armazenadas para posterior avaliação semi-quantitativa e qualitativa.

#### 4. 6 ANÁLISE POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Para verificar o padrão de organização das fibras colágenas, que são naturalmente fluorescentes (HOELL *et al*, 2006), serão utilizadas secções obtidas pelo criostato, como mencionado anteriormente, as quais serão lavadas em PBS e observadas no microscópio de fluorescência (Nikon, Eclipse E800 Yokohama, Japan) utilizando-se o filtro adequado para o comprimento de onda de 495nm, referente a fluorescência do isotiocianato de fluoresceína (FITC). A organização do tecido foi avaliada de forma qualitativa por fotomicrografias obtidas através de um sistema de câmera digital acoplada ao microscópio de fluorescência.

#### 4. 7 DOSAGEM DE NITRITO

Com o objetivo de verificar as variações na produção de óxido nítrico tecidual no modelo experimental foi utilizado o método de dosagem de nitrito através da reação de Griess (GREEN *et al*, 1982). Este método baseia-se na quantificação indireta de NO pelo seu principal metabólito, o nitrito. Nessa técnica, o nitrito da amostra reage em meio ácido com a sulfanilamida produzindo um sal de diazônio, o qual reage com o naftileno, produzindo uma coloração rósea.

Para esta reação o tecido foi cortado em pequenos pedaços e homogeneizado em 1 ml de solução salina por ultrasonificação, a seguir, 700 µL do homogeneizado foi centrifugado, obtendo-se o sobrenadante para essa dosagem. O plasma também foi obtido após a centrifugação do sangue. A partir desses procedimentos, 500 µL de cada amostra foi misturada com o mesmo volume do reagente de Griess, que compreende naftleno a 0.1%, diluído em água deionizada e sulfanilamida a 1%, diluída em ácido fosfórico a 5%. Os valores da absorvância foram mensurados por espectrofotometria ajustando o comprimento de onda para 540 nm. Esses valores foram referidos a uma curva padrão com concentrações conhecidas de nitrito para determinar a concentração de  $\text{NO}_2^-$  na amostra. Os níveis de nitrito foram corrigidos pela relação feita com a concentração de proteínas encontradas na amostra.

#### 4. 8 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A quantificação de proteínas do tecido foi obtida através do método de Bradford (1976). Conforme o princípio dessa técnica, o corante azul brilhante de comassie presente no reativo de Bradford se liga a resíduos carregados

positivamente em proteínas, resultando em um complexo que possui um máximo de absorvância diferente do obtido com o corante livre.

Após o processamento do tecido para a dosagem de nitrito, 100 µl do homogeneizado foi diluído em 300 µl de água destilada e 100 µl de NaOH 1 N.

Desta diluição, 100 µl foram adicionados em tubos contendo água destilada (100 µL). Em seguida, 2 ml do reativo de revelação (Azul Brillhante Comassie G-250 dissolvido em etanol 95% e ácido fosfórico 85%) foram adicionados, e ao final de 2 min de reação e agitação os conteúdos foram determinados por espectrofotometria ajustando o comprimento de onda para 595 nm.

Os valores de proteína foram calculados a partir da equação da reta obtida por uma curva-padrão previamente estabelecida com diferentes concentrações de Albumina Bovina Sérica (BSA).

#### 4. 9 AVALIAÇÃO FUNCIONAL

O teste funcional realizado foi o Índice Funcional de Aquiles (IFA), proposto por Murrel *et al* (1992). Esse teste foi conduzido em todos os animais no período pré-operatório, assim como na fase pós-operatória em 7, 14 e 21 dias.

Os ratos foram testados em uma passarela de 10 cm de largura por 60 cm de comprimento forrado com um papel branco. Depois de terem suas patas traseiras pintadas com tinta atóxica, os animais foram colocados no aparato para caminhar em linha reta, deixando no papel as pegadas em azul. Esse papel foi codificado pelo numero do animal e estocado para digitalização e mensuração por um único avaliador com auxílio do software Imaje J®. As medidas foram tomadas a partir da segunda passada de marcha do animal e o índice calculado de acordo com a equação:

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

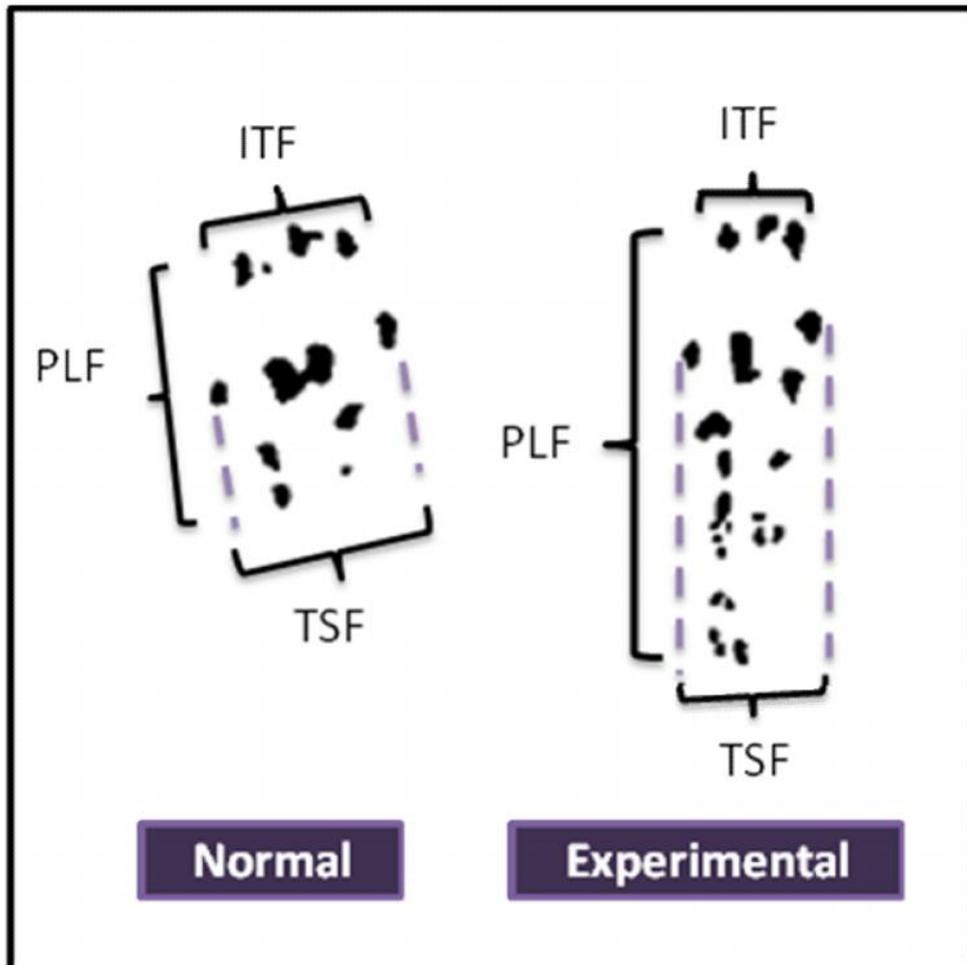
Conforme os elementos da equação, o máximo comprimento da pegada é definido como o fator de comprimento da pegada (PLF), e obtido por  $PLF_{\text{Esq}} - PLF_{\text{Dir}} / PLF_{\text{Dir}}$ . A distância entre o primeiro e o quinto dedo é chamado de fator de espalhamento dos dedos do pé (TSF), e obtido por  $TSF_{\text{Dir}} - TSF_{\text{Esq}} / TSF_{\text{Esq}}$  e a distância entre o segundo e o quarto dedo é o fator teste intermediário (ITF), calculado por  $ITF_{\text{Dir}} - ITF_{\text{Esq}} / ITF_{\text{Esq}}$ . Esses fatores (Figura 12), previamente obtidos foram calculados e usados para a equação do IFA.

#### 4. 10 ANÁLISE DE DADOS POR SOFTWARE

Para avaliar a progressão da cicatrização, cortes longitudinais foram coletados e organizados em secções referentes às porções ventral, medial e dorsal do tendão para em seguida serem coradas com HE.

Nestas lâminas coradas é possível identificar a organização do colágeno no tecido por duas principais referências, a orientação das células no eixo do tendão e a própria organização em paralelo das fibras colágenas coradas em róseo. Desse modo, fotomicrografias de regiões onde houve organização de fibras foram sistematicamente capturadas. Destas, a partir da referência da escala, o diâmetro de fibras organizadas foi mensurado, calculando-se então o diâmetro médio de colágeno organizado a partir das três secções, o qual foi avaliado para cada tendão e grupo, conforme descrito por Bring *et al*, (2007).

Todos os dados de imagem digital foram processados por meio do software Image J® e expressas convencionalmente em milímetros.



**Figura 12** - Obtenção das medias para o cálculo do IFA.

Fonte: Adaptado de Murrel et al, 1994.

#### 4. 11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

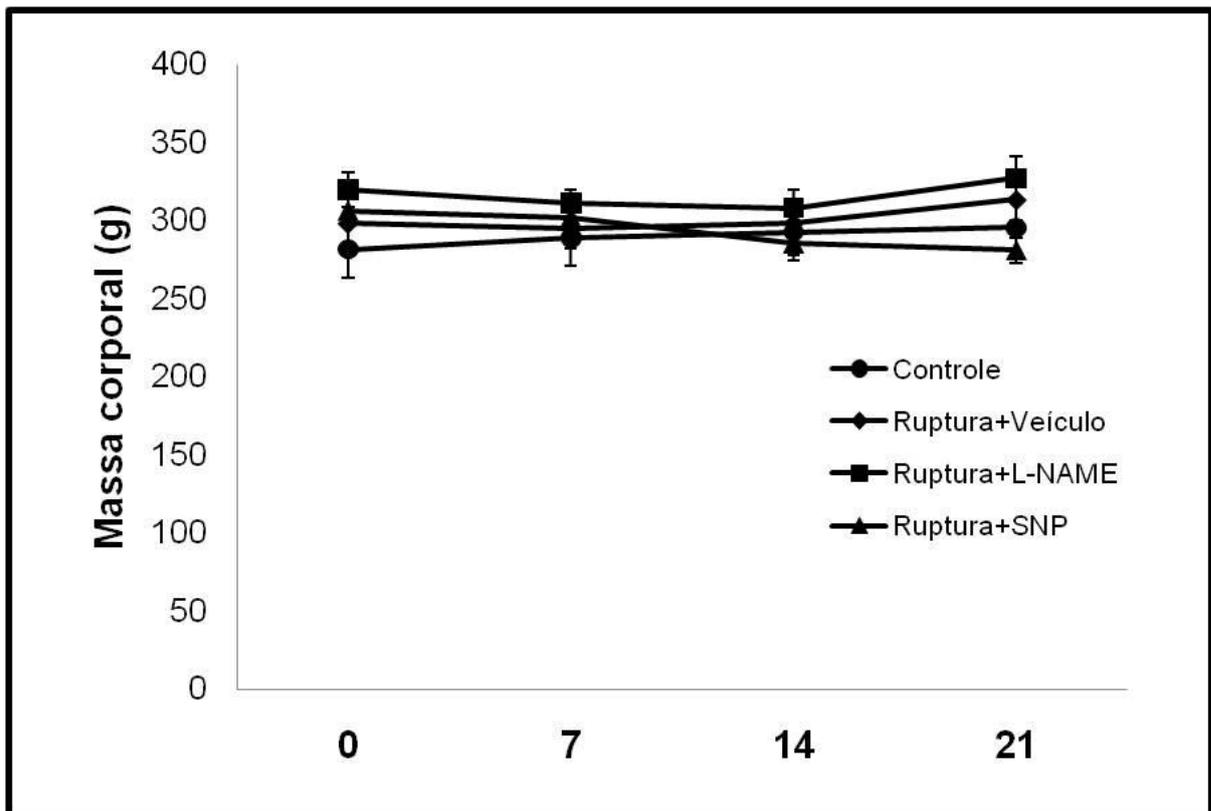
O programa estatístico usado na avaliação destes experimentos foi o BioEstat 5.0, onde os dados foram analisados utilizando o teste de Análise de Variância (ANOVA) de um critério, seguida pelo teste Tukey para comparações múltiplas. Os valores de  $p < 0.05$  foram considerados significativos. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão.

## 5 RESULTADOS

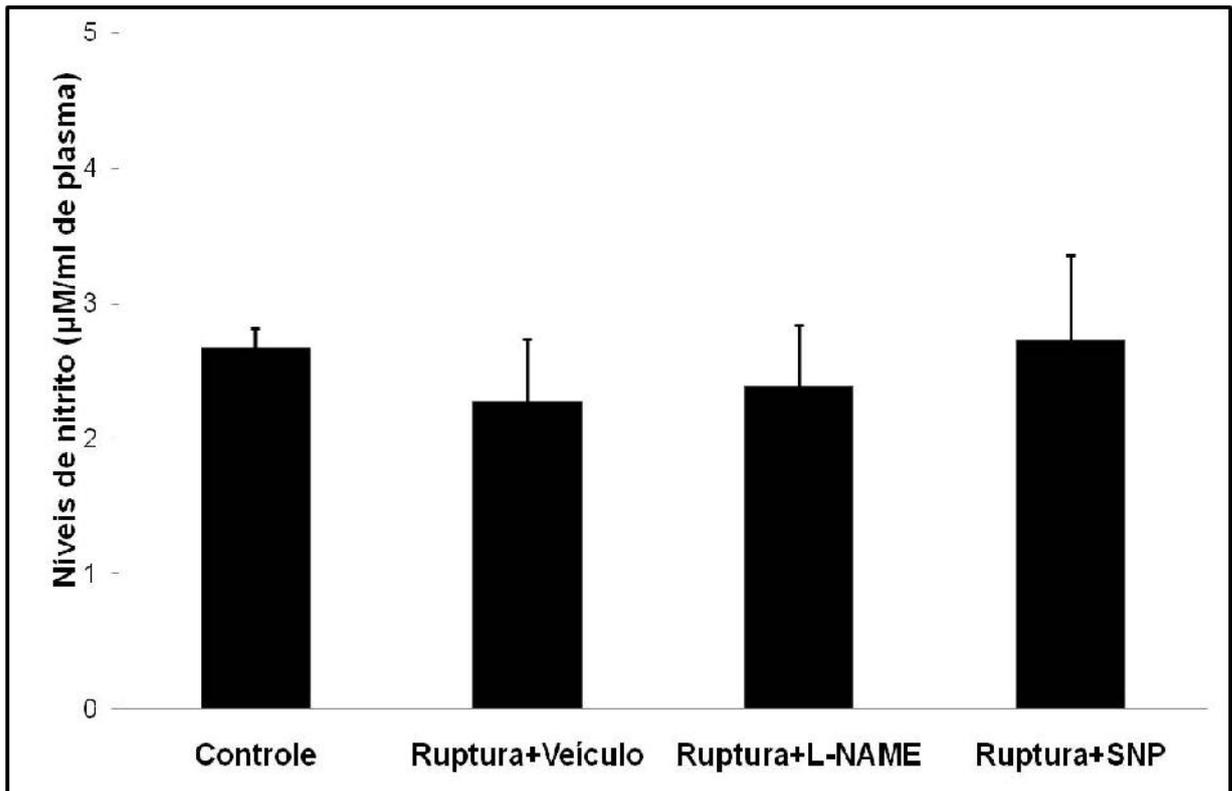
### 5.1 O TRATAMENTO COM DROGAS NO LOCAL DA INJÚRIA NÃO ALTEROU O GANHO DE MASSA CORPORAL NEM OS NÍVEIS DE NITRITO NO PLASMA.

Com a finalidade de avaliarmos a magnitude da inibição nitrérgica local na regeneração tendínea, verificamos a repercussão dessa administração na avaliação do ganho de massa corporal ao longo do tratamento. Nossos resultados mostraram que nenhum dos tratamentos locais alterou de forma significativa o ganho de massa entre os grupos experimentais antes da lesão ( $p=0.3645$ ), em 7 ( $p=0.6590$ ), 14 ( $p=0.6629$ ) ou 21 dias após a injúria ( $p=0.1477$ ) (Figura 13).

Reforçando a idéia da inibição exclusivamente local da NOS nesse modelo verificamos os níveis plasmáticos de nitrito pelo método de Griess. Obtivemos como resultados entre os diferentes tratamentos valores similares para ruptura+veículo ( $2.27 \pm 0.46 \mu\text{M/ml}$ ), ruptura+L-NAME ( $2.38 \pm 0.45 \mu\text{M/ml}$ ), ruptura+SNP ( $2.72 \pm 0.63 \mu\text{M/ml}$ ) e controle ( $2.66 \pm 0.15 \mu\text{M/ml}$ ), conforme verificado na Figura 14, não havendo significância estatística entre eles ( $p=0.8909$ ). A não alteração na aquisição de massa corpórea e nos níveis de nitrito plasmático nos permite assegurar que o tratamento local não interferiu expressivamente nos parâmetros sistêmicos dos animais.



**Figura 13** – Ganho de massa corporal. Foi avaliado semanalmente o efeito do tratamento local com veículo, L-NAME e SNP sob a aquisição de massa corporal em ratos submetidos à tenotomia. Os valores são expressos em média  $\pm$  erro padrão,  $n=8$ . (ANOVA-Tukey sem significância entre os dias para cada grupo ou entre os grupos no mesmo dia).



**Figura 14** – Níveis de nitrito plasmático. Foi verificado o efeito do tratamento local com veículo, L-NAME e SNP nos níveis de nitrito no plasma de ratos submetidos à tenotomia. O tratamento foi mantido conforme descrito previamente e as amostras coletadas no 21º dias após a injúria. Os valores são expressos em média  $\pm$  erro padrão, n=5 (ANOVA-Tukey, p=0.8909).

## 5.2 O MODELO DE INJÚRIA TENDÍNEA POR RUPTURA TOTAL DO TENDÃO DE AQUILES MANTEVE OS NÍVEIS DE NITRITO NO TECIDO AUMENTADOS EM 21 DIAS.

A fim de averiguar a presença de óxido nítrico no tecido em 21 dias após a injúria e sua inibição com o L-NAME, realizamos a dosagem de nitrito no tendão conforme metodologia para processamento e dosagem dessas amostras. Essa análise constatou a presença de níveis de nitrito significativamente mais elevados que o controle nas amostras submetidas à lesão experimental ( $1.03 \pm 0.05 \mu\text{M}/\text{mg}$  controle vs  $3.85 \pm 0.2 \mu\text{M}/\text{mg}$  ruptura,  $p < 0.01$ ), contudo esse aumento foi inibido consideravelmente no animal tratado com L-NAME (ruptura vs  $1.2 \pm 0.4 \mu\text{M}/\text{mg}$  L-NAME,  $p < 0.01$ ), conforme demonstrado na Figura 15. Apesar da visível redução promovida pelo tratamento com L-NAME, os valores de nitrito não diferiram estatisticamente do controle.

## 5.3 A REDUÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO PELA INIBIÇÃO COM L-NAME MELHOROU O PADRÃO DE ORGANIZAÇÃO DAS FIBRAS COLÁGENAS NO TECIDO.

Com o intuito de caracterizar as alterações histológicas promovidas pelo modelo de injúria tendínea na reorganização tecidual em 21 dias, avaliamos pela técnica histoquímica de hematoxilina-eosina o padrão de organização das fibras colágenas e a disposição celular no tecido. Com base nessa análise observamos uma notável desorganização estrutural comparado ao controle (Figura 16 A e B). O tecido cuja ruptura foi executada (Figura 16 C, D e E) é tomado por numerosas células de morfologia ligeiramente arredondada, típico de células morfologicamente transformadas. Além disso, a disposição irregular no tecido difere do padrão em

fileira encontrado no tendão controle. A presença de inúmeros vasos também é evidente (Figura 16E), já que no tendão controle nenhum vaso é encontrado.

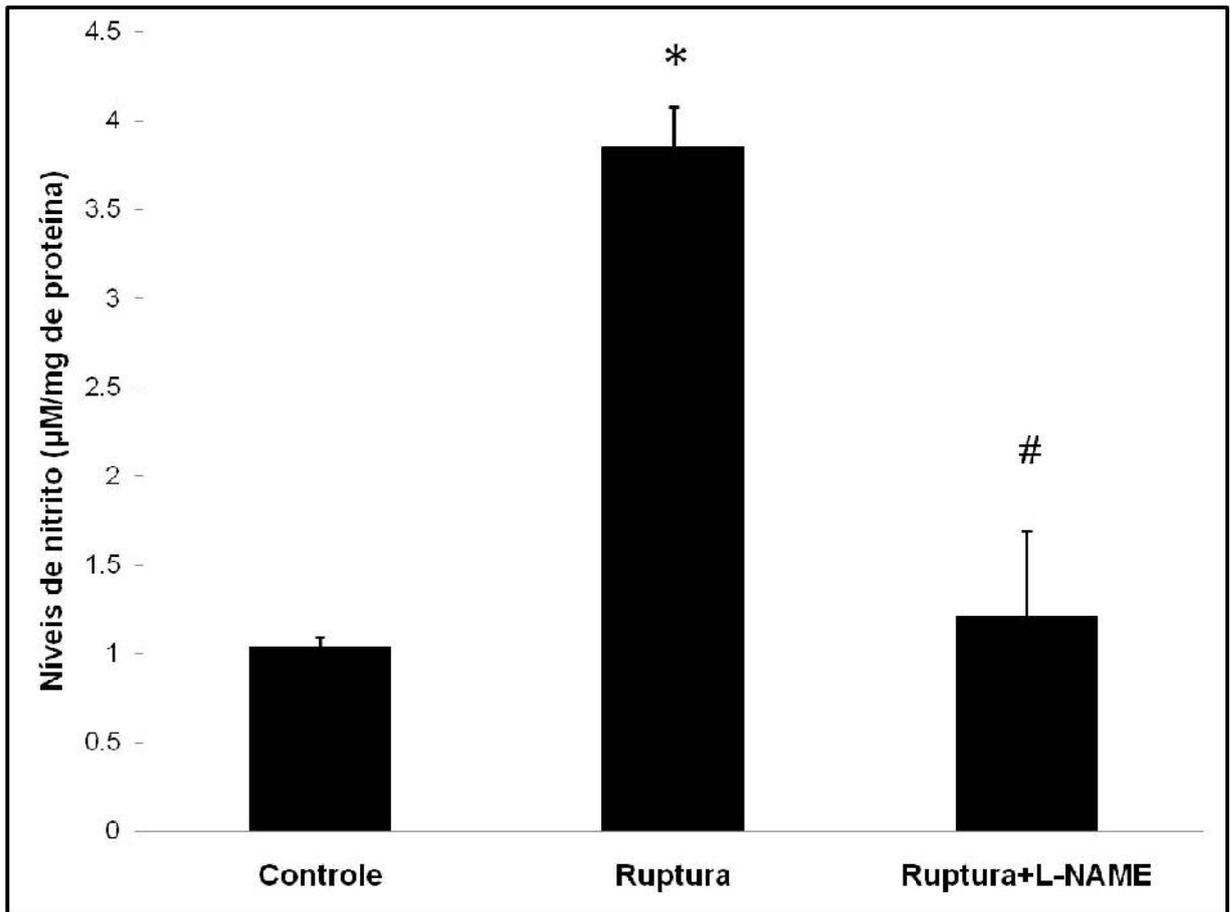
Objetivando avaliar morfológicamente as implicações da inibição nitrérgica local na reorganização das fibras colágenas do tendão em 21 dias, avaliamos pela mesma técnica histoquímica a evolução dos grupos ruptura+veículo, ruptura+L-NAME e ruptura+SNP.

O grupo experimental ruptura+L-NAME apresentou melhor padrão de organização das fibras, sendo observado também a predominância de células mais alongadas e finas do que as dos grupos ruptura+veículo ou ruptura+SNP. A disposição em fileiras também foi verificada, caracterizando um padrão análogo ao tendão controle (figura 17 B). Outra importante característica observada é a ausência de vasos entre o tecido. Juntos, esses parâmetros sugerem uma melhor recuperação tecidual.

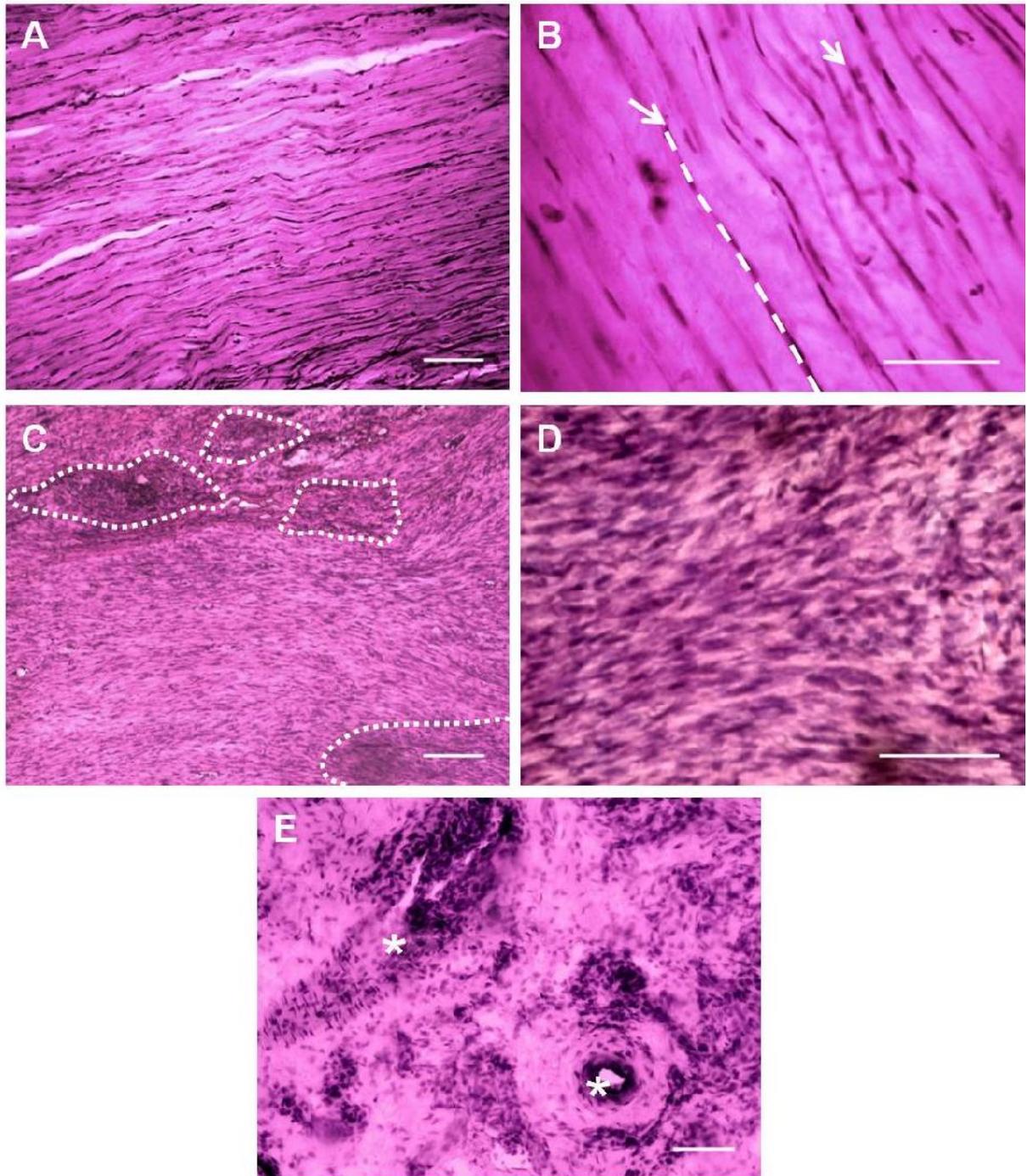
Por outro lado, os grupos ruptura+veículo e ruptura+SNP revelaram significativa desorganização tecidual, além disso, é possível notar zonas de maior densidade celular nas fotomicrografias referentes a esses grupos, conforme observado na figura 17 A e C.

A indicação histológica de uma melhor organização de fibras colágenas presentes no tendão dos animais tratados com L-NAME nos levou a mensurar por meio de uma análise semiquantitativa essa organização, conforme descrito por Bring *et al.*, (2007).

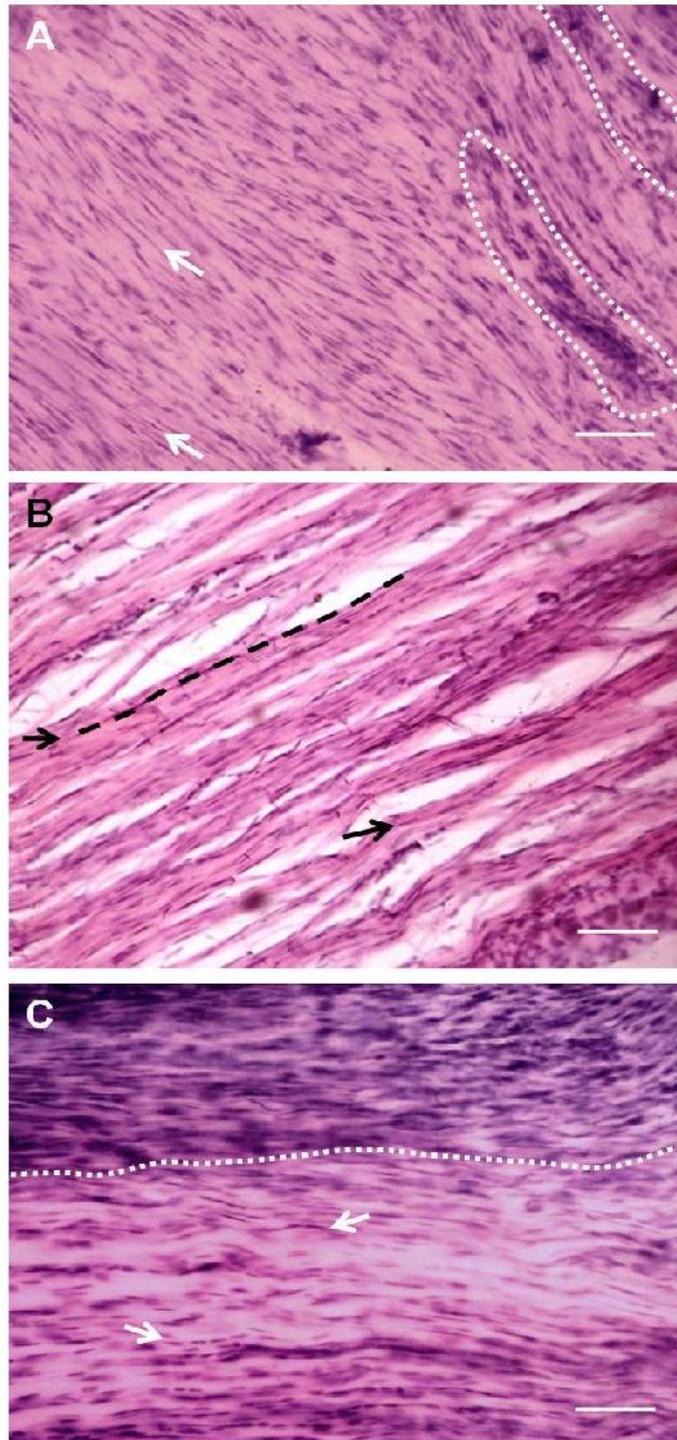
No grupo controle, o diâmetro médio de fibras colágenas organizadas assume a média de  $0.87 \pm 0.08$  mm. Por outro lado, após 21 dias de ruptura sem nenhuma intervenção efetiva, conforme observado no grupo ruptura+veículo, a desorganização se estabelece e o diâmetro de colágeno organizado decai para  $0.21 \pm 0.02$  mm. Valores próximos foram encontrados em animais tratados localmente com SNP ( $0.30 \pm 0.04$  mm), enquanto que os tratados com L-NAME revelaram significativa melhora na organização do colágeno tendíneo ( $0.54 \pm 0.09$  mm) se comparados ao veículo ( $p < 0.01$ ) ou ao SNP ( $p < 0.05$ ), conforme apresentado na figura 18.



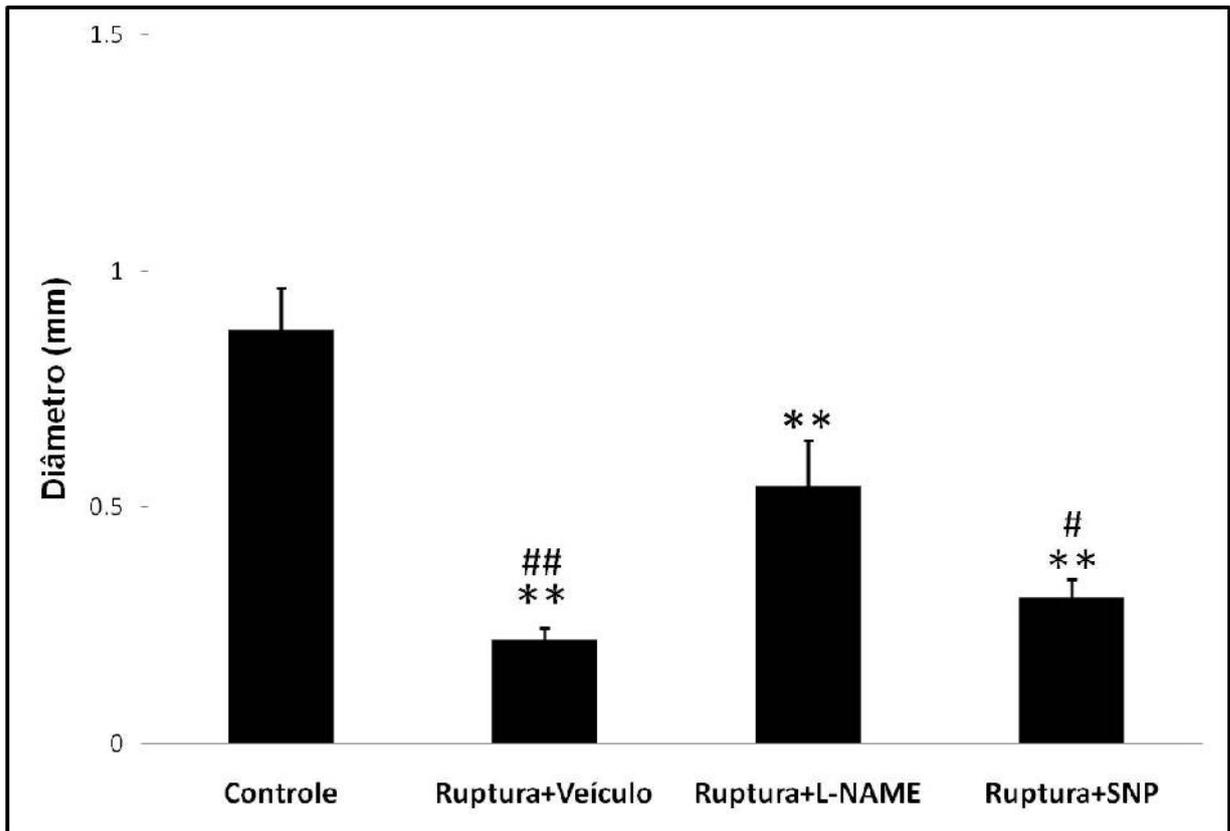
**Figura 15** – Níveis teciduais de nitrito. Foi observado o efeito da injúria e injúria associada à inibição nitrérgica nos níveis de nitrito no tecido. Os valores são expressos em média  $\pm$  erro padrão,  $n=5$  (ANOVA-Tukey, \*  $p<0.01$  em relação ao controle; #  $p<0.01$  em relação ao grupo ruptura).



**Figura 16** - Caracterização histológica do modelo de injúria tendínea. A análise histológica foi realizada em ratos controle (A e B) e ruptura (C, D e E). O tendão com ruptura apresentou mudanças consistentes com as alterações descritas na fase crônica, inclusive a presença de vasos (E, indicado por \*). Notar organização celular em fileira indicado por seta e linha pontilhada (B) e aumento na densidade celular delimitada por áreas pontilhadas (C). Coloração por hematoxilina eosina. Em A, C e E, objetiva de 10x, barra da escala de 100µm. Em B e D, objetiva de 40x, barra da escala 50µm, n= 3.



**Figura 17** - Organização tecidual após 21 dias de lesão e tratamento. A análise histológica foi realizada em animais tratados com veículo (A), L-NAME (B) ou SNP (C). O grupo ruptura+L-NAME apresentou melhor orientação tecidual, menor densidade celular e melhor organização das células (indicado pela linha tracejada em B) se comparado ao ruptura+veículo e ruptura+SNP. Notar tendência de organização celular em fileira indicado por seta. A alta densidade celular é mostrada em áreas delimitadas pelo pontilhado em A e C. Coloração por hematoxilina eosina. Objetiva de 10x, n= 3. Barra da escala, 100 $\mu$ m.



**Figura 18** - Avaliação do diâmetro médio de fibras colágenas organizadas. Foi avaliado o efeito do tratamento local com veículo, L-NAME e SNP no diâmetro médio de fibras colágenas organizadas no tendão de ratos cirurgicamente lesionados. Os grupos ruptura+veículo e ruptura+SNP não apresentaram melhora quanto à organização do colágeno. O grupo ruptura+L-NAME obteve maior diâmetro de fibras organizadas. Os valores são expressos em média  $\pm$  erro padrão,  $n=3$  (ANOVA-Tukey. \*\*  $p<0.01$  vs controle, ##  $p<0.01$  vs L-NAME, #  $p<0.05$  vs L-NAME).

Dando continuidade a análise morfológica, observamos a organização do colágeno de modo complementar por meio da propriedade natural de fluorescência quando exposto a radiação ultravioleta. Nesta condição (figura 19), a fluorescência decorrente do colágeno mostrou maior alinhamento das fibras no grupo ruptura+L-NAME do que em ruptura+veículo ou ruptura+SNP.

#### 5.4 A INIBIÇÃO DA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE PROMOVEU MELHORA NO DESEMPENHO FUNCIONAL DE ANIMAIS EM 21 DIAS APÓS A INJÚRIA.

Apesar da resposta histológica de reparo após a modulação nitrérgica ser de suma importância, a avaliação da funcionalidade dessa resposta permite inferir a efetividade prática dessa recuperação.

Para estudar o efeito da inibição nitrérgica no desempenho funcional, o índice funcional de Aquiles padrão foi obtido do grupo controle, avaliado paralelamente aos animais experimentais. Desse modo, os valores encontrado para esse grupo não apresentaram diferença estatística entre os dias zero ( $-4.66 \pm 2.99$ ), 7 ( $-4.38 \pm 2.48$ ), 14 ( $-4.60 \pm 2.55$ ) e 21 ( $-3.10 \pm 2.91$ ;  $p=0.9737$ ).

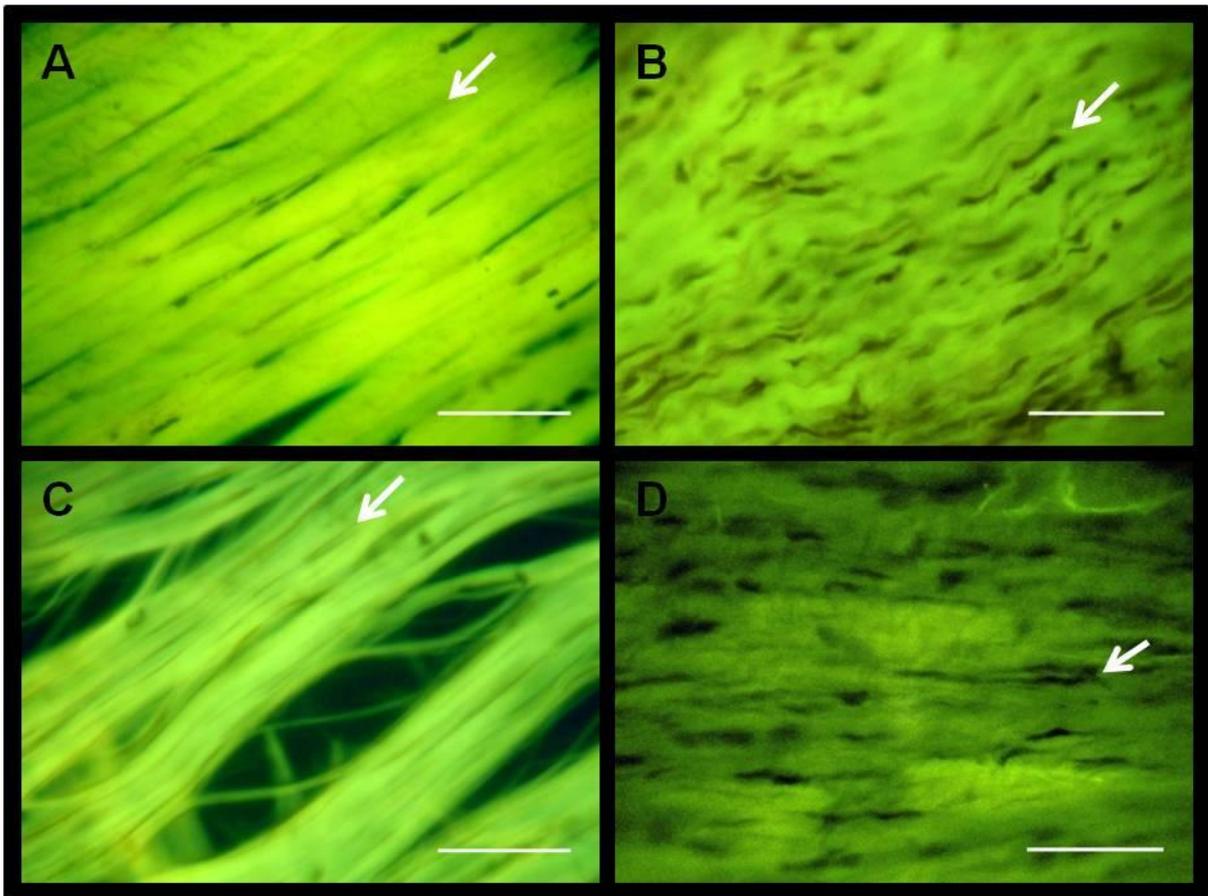
Para os grupos ruptura+veículo ( $1.67 \pm 2.7$ ), ruptura+L-NAME ( $4.01 \pm 2.6$ ) e ruptura+SNP ( $-9.02 \pm 2.6$ ) o IFA referente ao dia zero foi similar ao grupo controle, não havendo diferença entre os grupos ( $p=0.0789$ ).

Quando a análise foi feita para o 7º dia após a lesão, observamos significativa redução do valor do índice para ruptura+veículo ( $-55.28 \pm 3.96$ ), ruptura+SNP ( $-56.03 \pm 3.49$ ) e ruptura+L-NAME ( $-40.36 \pm 4.56$ ) quando referidos ao controle ( $-4.38 \pm 2.48$ ,  $p<0.01$ ). É importante notar, que apesar do grupo L-NAME apresentar valores inferiores ao IFA do controle, eles não foram tão comprometedores para a função locomotora quanto veículo e SNP (L-NAME vs veículo e SNP,  $p<0.05$ ).

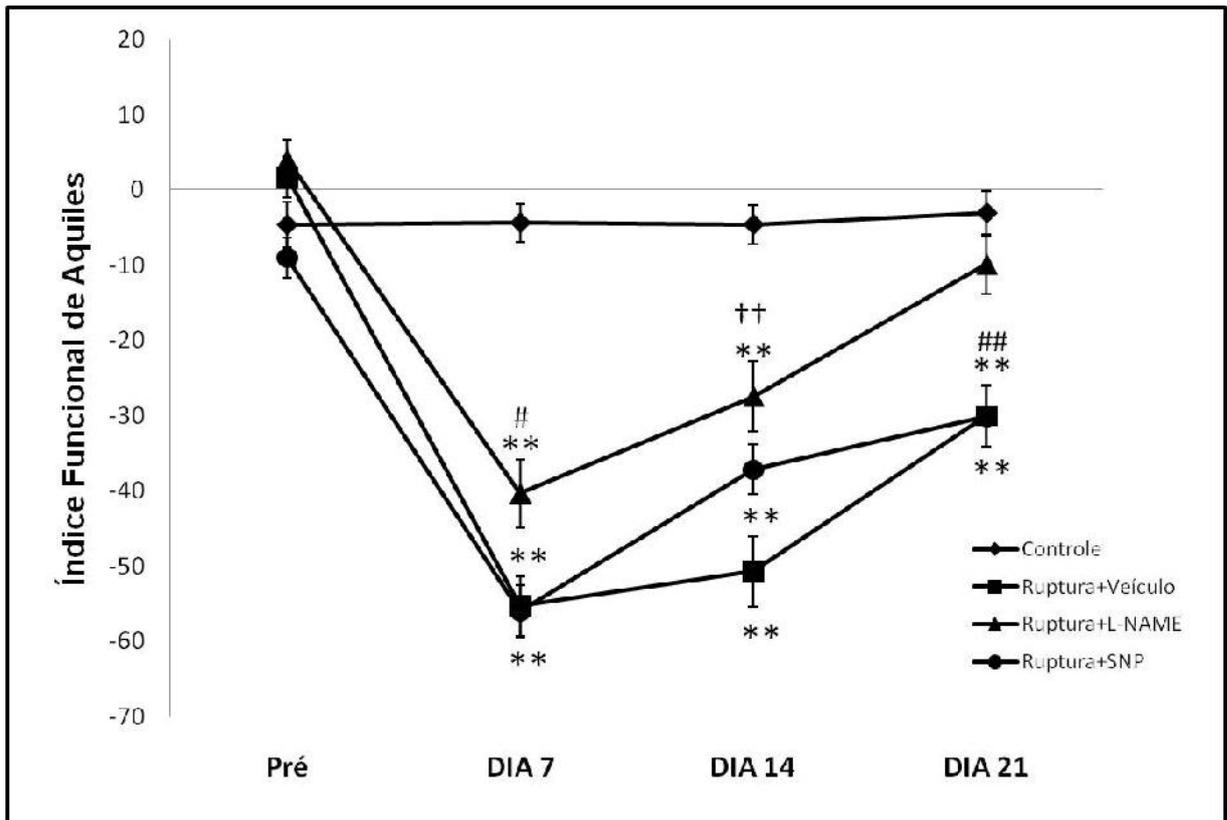
Na avaliação funcional do 14º dia ainda é notável a diferença entre ruptura+veículo ( $-50.68 \pm 4.68$ ), ruptura+L-NAME ( $-27.44 \pm 4.63$ ) e ruptura+SNP (-

37.18  $\pm$ 3.31) em relação ao controle (-4.60  $\pm$ 2.55,  $p < 0.01$ ). No entanto, nessa fase, o IFA do grupo ruptura+L-NAME sofreu um pequeno acréscimo, assim como o ruptura+SNP, tornando-os estatisticamente semelhantes, o que não ocorre ao grupo ruptura+veículo, que se mantém inferior ao ruptura+L-NAME (L-NAME vs veículo,  $p < 0.01$ ).

No 21º dia o desempenho funcional dos grupos ruptura+veículo e ruptura+SNP mantiveram-se insatisfatórios (-3.10  $\pm$ 2.91 controle vs -30.00  $\pm$ 4.06 veículo e -30.08  $\pm$ 4 SNP,  $p < 0.01$ ). De outro modo, o grupo ruptura+L-NAME assumiu valores consideravelmente mais positivos no cálculo do IFA (-9.88  $\pm$ 3.90), não diferindo do controle. Por conseguinte, ruptura+veículo e ruptura+SNP obtiveram índices inferiores ao do L-NAME (L-NAME vs veículo e SNP,  $p < 0.01$ ), indicando que ainda em 21 dias o padrão de marcha estava significativamente alterado, enquanto os animais cuja a inibição nitrérgica foi estabelecida a recuperação surgiu precocemente (Figura 20).



**Figura 19** - Avaliação da fluorescência do colágeno tendíneo. A avaliação foi feita em animais controle (A) e submetidos à tenotomia seguido de tratamento com veículo (B), L-NAME (C) e SNP (D). Tecido visualizado sob microscópio de fluorescência utilizando o filtro indicado para FITC. As fotomicrografias sugerem maior organização tecidual observada em A e C. A orientação das células estão indicadas por setas. Notar maior densidade celular e desorganização tecidual em B e D. Objetiva de 40x, n= 3. Barra da escala, 50 $\mu$ m.



**Figura 20** - Papel do óxido nítrico local na recuperação funcional da marcha. O índice funcional de Aquiles foi avaliado em animais controle ou com ruptura do tendão e posterior tratamento com veículo, L-NAME ou SNP. Os dados indicam que o tratamento com L-NAME gerou progressiva melhora funcional comparado aos demais grupos. Os valores são expressos em média  $\pm$  erro padrão,  $n=8$  (ANOVA-Tukey. \*\*  $p<0.01$  vs controle; #  $p<0.05$  vs veículo e SNP; ††  $p<0.01$  vs veículo ##  $p<0.01$  vs veículo e SNP).

## 6 DISCUSSÃO

A literatura reporta que a etiologia, patogênese e o processo de reparo da tendinopatia são pouco conhecidas (PUFE *et al*, 2005; RILEY, 2004; REDDY *et al*, 1999; MAFFULLI *et al*, 2008). Recentes pesquisas focam uma das conseqüências mais comuns na injúria independente da hipótese etiológica, o aumento na concentração de NO no local (MURRELL *et al*, 1997; LIN *et al*, 2001a; LIN *et al*, 2001b; LONGO; RONGA; MAFFULLI, 2009, SHARMA; MAFFULLI, 2006).

Estudos mostram que a inibição sistêmica da NOS em animais cujo tendão foi lesionado mecanicamente foram prejudiciais à 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 ao local da injúria apresentou importante melhora histológica e funcional. Para nosso conhecimento, essa é a primeira pesquisa que promove a inibição nitrérgica no local da injúria. Essa intervenção diferencial pode elucidar melhor o efeito da modulação na lesão, sem interferir significativamente em outras atividades fisiológicas.

Nossos dados estão de acordo com trabalhos que demonstram alterações patológicas provenientes de estresse nitrosilativo em diversos tecidos, apesar de alguns resultados ainda serem controversos (KAWANO *et al*, 2009; HSU *et al* 2006; PACHER *et al*, 2005; URTASUN; CONDE DE LA ROSA; NIETO, 2008; SIWIK; COLUCCI, 2004; BALLIGAND; FERON; DESSY, 2009; URTASUN *et al*, 2009; GURDOL *et al*, 2010; ARASAPAM *et al*, 2006).

Trabalhos prévios sugerem que o efeito fisiológico ou citotóxico desempenhado pelo NO depende, em parte, da isoforma enzimática que o produz (YOSHIDA *et al*, 2006; MONCADA, 1999; XIA *et al*, 2006; BALLIGAND; FERON; DESSY, 2009). No tendão já foi demonstrado que a síntese de NO por NOSII não acelera a regeneração. Deste modo, conclui-se que os benefícios atribuídos ao NO, conforme sugerido pela literatura, não provém dessa isoforma (XIA *et al*, 2006).

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; PALMER;

HIGGS, 1991; MONCADA, 1999; VALLANCE, 2003; ABRAMSON, 2008; KAWANO *et al.*, 2009; BOGDAN; RÖLLINGHOFF; DIEFENBACH, 2000), portanto, um modelo de inibição da NOS que não altere parâmetros sistêmicos é um ponto muito importante para minimizar influências externas na avaliação desse fenômeno local.

Nesse sentido, nossos resultados apontam que os dados de massa corporal e níveis plasmáticos de nitrito não foram afetados pela ruptura nem pela administração de L-NAME. Por outro lado, um significativo aumento nos níveis de nitrito no tecido após o 21º dia de lesão foi constatado, sendo este inibido quando usado o L-NAME no local. Os dados da literatura que sugerem um efeito prejudicial da inibição da NOS na regeneração mostraram uma nítida interferência sistêmica, como pode ser verificado pela perda de peso, paresia em membros, dispnéia, aumento da pressão arterial e morte. Essas alterações podem ser fruto de eventos que comprometem a regeneração por motivos secundários a atuação do inibidor no tecido (MURRELL *et al.*, 1997; TOMIOSSO *et al.*, 2010; GAO *et al.*, 2008; CHATZIANTONIOU *et al.*, 1998).

Estudos revelam que a suplementação terapêutica local com doador de NO é capaz de promover efeitos colaterais nem sempre associados à melhora funcional (PAOLONI *et al.*, 2003; KANE *et al.*, 2008). Outros dados suportam que a inibição crônica de NOS é um importante modelo de injúria cardiovascular e renal com alta taxa de mortalidade (TOFOVIC *et al.*, 2005), esclarecendo a necessidade de termos avaliado a abrangência da modulação nitrérgica em nossa pesquisa.

Nosso trabalho mostrou que em 21 dias após a lesão os níveis de nitrito no tecido estão significativamente acima da média dos animais controle, consistente com os achados a cerca da expressão temporal das NOS no tendão após a injúria (LIN *et al.*, 2001a).

Conforme esses dados, apesar do evidente aumento na concentração de nitrito na fase aguda (DARMANI; CROSSAN; CURTIS, 2004; DARMANI *et al.* 2004; MURRELL *et al.*, 1997), o acréscimo tardio observado em nosso trabalho poderia estar relacionado com o aumento na expressão da NOSI nesse mesmo período (LIN *et al.*, 2001a; LIN *et al.*, 2001b; MURRELL, 2007).

A literatura indica que em várias condições fisiológicas ou patológicas a expressão da NOSI pode ser dinamicamente regulada, principalmente no estresse celular induzido por agentes físicos, químicos ou biológicos decorrentes de injúria

patológica ou mecânica. Esse processo, conseqüentemente é capaz de desencadear um aumento na produção de NO pelo tecido (FÖRSTERMANN; BOISSEL; KLEINERT, 1998).

Dentro desse contexto, investigamos o papel da modulação nitrérgica local na organização do tecido em nosso modelo experimental. Nossas amostras revelaram uma importante desorganização tecidual, muito semelhante ao que é reportado na literatura para a fase crônica da injúria (CHEN *et al*, 2004; YEUNG; GUO; NG, 2006, 2006; DAHLGREN *et al*, 2005; PUFE *et al*, 2005; COOK *et al*, 2004; XU; MURRELL, 2008).

Por conseguinte, queríamos saber se nossos tratamentos geravam alguma alteração nesse padrão morfológico de lesão. Nesse sentido, observamos que, diferente das alterações morfológicas clássicas presente nos animais que receberam veículo ou SNP, o grupo que recebeu L-NAME apresentou um padrão histológico consideravelmente melhor (LIAN *et al*, 2006; XU; MURRELL, 2008).

A melhora consistiu em menor densidade celular, morfologia mais alongada, ausência de vasos sanguíneos entre colágeno, maior alinhamento celular e maior quantidade de zonas com feixes de colágeno organizado. Todos esses achados sugerem que a inibição da NOS no local da injúria parece acelerar o processo de regeneração e organização do tecido (MURRELL *et al*, 1997; BRUNS *et al*, 2000).

Diferente dos achados para o grupo L-NAME, os animais que receberam SNP contrapõem-se com sua hiper celularidade e morfologia celular mais arredondada, Essa alteração não foi encontrada em animais tratados com veículo, cujas células, apesar de alongadas e fusiformes, não foram semelhantes as dos animais tratados com L-NAME.

A transformação morfológica das células após a injúria, caracterizada pelo arredondamento e alongamento do núcleo e corpo celular, estão relacionadas com uma redução no componente de tensão e aumento no componente de achatamento do tecido, refletindo no fenótipo celular a redução funcional do tecido (COOK *et al*, 2004; MAFFULLI *et al*, 2008; GIGANTE *et al*, 2009; CHUH *et al*, 2010; CLEGG; STRASSBURG; SMITH, 2007).

É bem demonstrado na literatura que a neovascularização parece estar implicada em processos nociceptivos e organizacionais no tecido (PUFE *et al*, 2005;

SCHIZAS *et al*, 2010). A presença de vasos em condições patológicas entre as fibras colágenas sugere coexistência com fibras nervosas e expressão de NMDAR1, glutamato, SP e CGRP, todos relacionados com o processo algico na lesão (BRING *et al*, 2007; ACKERMANN *et al*, 2003; LIAN *et al*, 2006).

O principal fator relacionado com a presença de vasos e nervos entre a malha colágena é a desorganização das fibras no tecido, possibilitando a penetração de vasos nessa malha, contudo a reorientação das fibras pode minimizar essas alterações (BRING *et al*, 2007). Nesse sentido, a inibição nitrérgica local pode ser um forte aliado na promoção dessa melhoria.

Como nossos dados histológicos para L-NAME indicaram um melhor padrão de organização tecidual e celular, verificamos quantitativamente essa organização conforme descrito anteriormente. Como resultado obtivemos um maior diâmetro de colágeno organizado para esse grupo.

Acreditamos em duas possibilidades para a melhor organização tecidual encontrada: (1) a redução nos níveis locais de NO poderia facilitar a atividade de fatores de crescimento fundamentais para a regeneração, principalmente o TGF- $\beta$ ; (2) a redução de NO, e conseqüentemente, de seus produtos, poderiam evitar a nitrosilação do próprio colágeno e de proteínas envolvidas em sua estabilidade e remodelagem.

Em relação a primeira proposição, é reportado que a regeneração tendínea pode ser acelerada através do uso de fatores de crescimento exógeno. Dentre eles o TGF- $\beta$  é o mais estudado (DAHLGREN *et al*, 2005; DARMANI *et al* 2004; YALAMANCHI *et al*, 2002; VIRCHENKO *et al*, 2006a; SÁNCHEZ *et al*, 2007).

Esse fator promove uma importante inibição na produção de NO por mecanismos bem estabelecidos (VODOVOT *et al*, 1993). Além disso, como sua atividade pro-fibrótica está vinculada a redução da síntese de NO, é possível que uma inibição da NOS intensifique esse efeito.

Estudos demonstram que a inibição da NOS também pode resultar em aumento na síntese de colágeno via estimulação da arginase, entretanto, devido estarmos avaliando a fase crônica da injúria, o mecanismo da arginase não será considerado (CURRAN; WINTER; BOUCHIER-HAYES, 2006; SANTHANAM *et al*, 2008).

Outros dados demonstram ainda um impressionante efeito do TGF- $\beta$  na recuperação das propriedades mecânicas, aumento na síntese e estabilidade do colágeno e remodelagem na matriz, por isso, sugerimos que o TGF- $\beta$  participe da melhora promovida pela inibição com L-NAME (HOU *et al*, 2009).

Sustentando a segunda possibilidade para o efeito benéfico da inibição nitrérgica, estudos mostraram que o NO promove nitrosilação, uma modificação pós-translacional de proteínas implicando em alteração funcional (BALLIGAND; FERON; DESSY, 2009). Essa alteração pode afetar a entrega de oxigênio ao tecido, modulação da função de fatores de transcrição, enzimas, receptores de membrana e canais de íons (BALLIGAND; FERON; DESSY, 2009; VALLANCE, 2003; VALKO *et al*, 2007). A literatura reporta também uma relação da nitrosilação com efeitos sobre a degeneração, inflamação (ABRAMSON, 2008) e dor neurogênica (KAWANO *et al*, 2009; CHEN *et al*, 2010).

Há evidências de que o NO inibe a atividade da prolil hidroxilase, enzima fundamental para um passo crítico na síntese de colágeno, não sendo descartada a possibilidade de inativação por nitrosilação (DOOLEY *et al*, 2007; CAO *et al*, 1997).

Apesar de nenhum dado a cerca da nitrosilação do COL I ter sido mencionado na literatura, Richardot e colaboradores (2009) mostraram que o NO é capaz de promover esse efeito em resíduos de tirosina de COL III, um tipo frequente de colágeno presente após a injúria tendínea (LONGO; RONGA; MAFFULLI, 2009).

O NO é a única molécula biológica produzida em quantidade suficiente para competir com a superóxido dismutase pelo ânion superóxido, formando assim o peroxinitrito (URTASUN; CONDE DE LA ROSA; NIETO, 2008). Esse produto pode também comprometer a remodelagem do colágeno na matriz pela ativação ou inativação de MMPs via nitrosilação, desequilibrando o balanço entre MMPs e TIMPs (PACHER *et al*, 2005; OKAMOTO *et al*, 2001; SIWIK; COLUCCI, 2004; URTASUN *et al*, 2009; RILEY, 2004).

De forma complementar aos dados histológicos, foi observado nas imagens por fluorescência do tecido um aumento na organização das fibras para animais tratados com L-NAME. A avaliação da fluorescência do colágeno vem sendo amplamente utilizada para o diagnóstico de câncer por ser mais confiável e eficaz (CHOWDARY *et al*, 2009; ZHENG *et al*, 2003; GEORGAKOUDI *et al*, 2002)

Apesar da fluorescência das moléculas de colágeno serem bem conhecidas (HOELL *et al*, 2006), não há dados na literatura sobre a modulação nitrérgica e a avaliação do colágeno no tendão. Parte da literatura que trata a respeito dessa modulação utiliza apenas tecido corado sob microscopia de luz polarizada, no entanto, verificou-se que as mesmas informações sobre a organização do colágeno podem ser visualizadas sob microscopia de fluorescência (YUAN *et al*, 2003; TOMIOSSO *et al*, 2010; DOLBER; SPACH, 1993).

Sob microscopia de luz polarizada foi mostrado que o uso sistêmico de L-NAME resultou em pouca birrefringência e manutenção da desorganização tecidual (YUAN *et al*, 2003; TOMIOSSO *et al*, 2010), mas como já fora elucidado antes, o uso sistêmico de inibidores da NOS pode acarreta em implicações secundárias ao efeito local que se almeja avaliar.

Por fim, nossos dados mostraram que o tratamento local com L-NAME promoveu significativa melhora funcional, sobretudo no 21º dia. Resultados funcionais similares foram obtidos pelo tratamento com ultrassom terapêutico contínuo (NG *et al*, 2003), implementação de exercício físico (SEE *et al*, 2004) e tratamento com um agente anti-ulcerante (KRIVIC *et al*, 2005).

Best e colaboradores (1992) mostraram que existe uma importante 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.

Verificamos com este trabalho, que independente do sistema que esteja envolvido na melhora da regeneração, a inibição local da síntese de NO pelo uso de seu análogo, L-NAME, acelerou o processo de reparo no tendão, conforme melhora nos parâmetros histológicos (Figura 17 e 18) e funcionais (Figura 20). Esse efeito parece estar relacionado a um papel estritamente local no tecido, pois difere de dados observados quando o tratamento atinge níveis sistêmicos (TOMIOSSO *et al*, 2010; MURRELL *et al*, 1997).

A observação do efeito benéfico da inibição nitrérgica no local da injúria neste trabalho é de fundamental importância para futuras pesquisas de cunho terapêutico, cujo foco busque avaliar por meio de intervenção farmacológica local a aceleração da recuperação tecidual e funcional de animais com a injúria tendínea.

## 7 CONCLUSÃO

- O tratamento com L-NAME e SNP no local da injúria não alterou o ganho de peso nem os níveis de nitrito no plasma.
- O modelo de injúria tendínea por ruptura total do tendão de Aquiles usado nesta pesquisa assumiu características similares as da tendinopatia crônica.
- O modelo de injúria tendínea manteve os níveis de nitrito no tecido aumentados em 21 dias, os quais foram reduzidos com a administração de L-NAME.
- A redução da atividade nitrérgica local acelerou a organização das fibras colágenas, evitou a formação de vasos e diminuiu a densidade celular no tecido.
- A inibição nitrérgica local promoveu precoce desempenho funcional de animais em 21 dias após a injúria.

## 8 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.

ACHUTH, HN; MOOCHHALA, SM; MAHENDRAN, R; TAN, WT. Nitrosoglutathione triggers collagen deposition in cutaneous wound repair. **Wound Rep Reg.** 13: 383–389, 2005.

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.

ALBERTS, B; JOHNSON, A; LEWIS, J; RAFF, M; ROBERTS, K; WALTER, P. **Molecular Biology of the Cell.** 4° ed. Garland Science, New York and London, 2002.

ANITUA, E; SÁNCHEZ, M; ZALDUENDO, MM; DE LA FUENTE, M; PRADO, R; ORIVE, G; ANDÍA, I. Fibroblastic response to treatment with different preparations rich in growth factors. **Cell Prolif.** 42: 162–170, 2009.

ARASAPAM, G.; SCHERER, M.; COOL, J.C.; FOSTER, B.K.; XIAN, C.J. Roles of COX-2 and iNOS in the Bony Repair of the Injured Growth Plate Cartilage. **J Cel Biochem.** 99:450–461, 2006.

ARCHER, S. Measurement of nitric oxide in biological models. **FASEB Journal.** 7: 349-360, 1993.

BAILEY, A.J.; PAUL, R.G.; KNOTT, L. Mechanisms of maturation and ageing of collagen. **Mech Ageing Develop.** 106: 1–56, 1998.

BALDOCK, C; GILPIN, CJ; KOSTER, AJ; ZIESE, U; KADLER, KE; KIELTY, CM; HOLMES, DF. Three-dimensional reconstructions of extracellular matrix polymers using automated electron tomography. **J Struct Biol.** 138: 130–136, 2002.

BALLIGAND, J.-L.; FERON, O.; DESSY, C. eNOS Activation by Physical Forces: From Short-Term Regulation of Contraction to Chronic Remodeling of Cardiovascular Tissues. **Physiol Rev.** 89: 481–534, 2009.

BANOS, C; THOMAS, A; KUO, C. Collagen Fibrillogenesis in Tendon Development: Current Models and Regulation of Fibril Assembly. **Birth Def Res (Part C).** 84: 228-244, 2008.

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.

BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. **Curr Opin Immunol.** 2:64-76, 2000.

BRADFORD, M. A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analyt Biochem.** 72: 248-254, 1976.

BRASIL. **Ministério da Saúde.** Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. Área Técnica de Saúde do Trabalhador. LER/DORT : dilemas, polêmicas e dúvidas. Elaboração de Maria Maeno *et al.* Brasília: Ministério da Saúde, 2001.

BRASIL. **Ministério da Saúde.** Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. Saber LER para prevenir DORT. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2007.

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.

BRUNS, J; KAMPEN, J; KAHRS, J; PLITZ, W. Achilles tendon rupture: experimental results on spontaneous repair in a sheep-model. **Knee Surg, Sports Traumatol, Arthrosc.** 8: 364–369, 2000.

CANTY, EG; KADLER, KE. Collagen fibril biosynthesis in tendon: a review and recent insights. **Comp Biochem Physiol Part A.** 133: 979–985, 2002.

CAO, M; WESTERHAUSEN-LARSON, A; NIYIBIZI, C; KAVALKOVICH, K; GEORGESCU, HI; RIZZO, CF; HEBDA, PA; STEFANOVIC-RACIC, M; EVANS, CH.

Nitric oxide inhibits the synthesis of type-II collagen without altering Col2A1 mRNA abundance: prolyl hydroxylase as a possible target. **Biochem J.** 324: 305-310, 1997.

CHATZIANTONIOU, C; BOFFA, J; ARDAILLOU, R; DUSSAULE, J. Nitric Oxide Inhibition Induces Early Activation of Type I Collagen Gene in Renal Resistance Vessels and Glomeruli in Transgenic Mice. **J Clin Invest.** 101(12): 2780–2789, 1998.

CHEN, Y-J.; WANG, C-J.; YANG, K.D.; KUO, Y-R.; HUANG, H-C.; HUANG, Y-T.; SUN, Y-C; WANG, F-S. Extracorporeal shock waves promote healing of collagenase-induced. Achilles tendinitis and increase TGF- $\beta$ 1 and IGF-I expression. **J Orthop Res.** 22: 854-861, 2004.

CHEN, Z.; MUSCOLI, C.; DOYLE, T.; BRYANT, L.; CUZZOCREA, S.; MOLLACE, V.; MASTROIANNI, R.; MASINI, E.; SALVEMINI, D. NMDA-receptor activation and nitroxidative regulation of the glutamatergic pathway during nociceptive processing. **PAIN.** 149: 100–106, 2010.

CHOWDARY, M.V.P.; MAHATO, K.K.; KUMAR, K.K.; MATHEW, S.; RAO, L.; KRISHNA, C.M.; KURIEN, J. Autofluorescence of Breast Tissues: Evaluation of Discriminating Algorithms for Diagnosis of Normal, Benign, and Malignant Conditions. **Photomed Laser Surg.** 27: 241–252, 2009.

CLEGG, PD; STRASSBURG, S; SMITH, RK. Cell phenotypic variation in normal and damaged tendons. **Int J Exp Path.** 88: 227–235, 2007.

COOK, J.L.; FELLER, J.A.; BONAR, S.F.; KHAN, K.M. Abnormal tenocyte morphology is more prevalent than collagen disruption in asymptomatic athletes' patellar tendons. **J Orthop Res.** 22: 334-338, 2004.

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.

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.

CURRAN, J.N.; WINTER, D.C.; BOUCHIER-HAYES, D. Biological fate and clinical implications of arginine metabolism in tissue healing. **Wound Rep Reg.** 14: 376–386, 2006.

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.

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. **Mediat Inflamm.** 13(3): 157-164, 2004.

DARMANI, H; CROSSAN, J.C.; MCLELLAN, S.D.; MEEK, D.; CURTIS, A. Expression of nitric oxide synthase and transforming growth factor-beta in crush-injured tendon and synovium. **Mediat Inflamm.** 13(5/6): 299-305, 2004.

DEBATS, IB; WOLFS, TG; GOTOH, T; CLEUTJENS, JPM; PEUTZ-KOOTSTRA, CJ; VAN DER HULST, RR. Role of arginine in superficial wound healing in man. **Nitric Oxide.** 21(3-4): 175-183, 2009.

DOLBER, P.C.; SPACH, M.S. Conventional and confocal fluorescence microscopy of collagen fibers in the heart. **J Histochem Cytochem.** 41(3): 461-469, 1993.

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 Radic 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; GRIMSHOLM, O; JÖNSSON, M; ALFREDSON, H; DANIELSON, P. New insight into the non-neuronal cholinergic system via studies on chronically painful tendons and inflammatory situations. **Life Sci.** 84: 865-870, 2009.

FÖRSTERMANN, U.; BOISSEL, J-P.; KLEINERT, H. Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). **FASEB Journal.** 12: 773-790, 1998.

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.

GAJKO-GALICKA, A. Mutations in type I collagen genes resulting in osteogenesis imperfecta in humans. **Acta Biochim Polon.** 49: 433-441, 2002.

GAO, L; YIN, H; SMITH JR, RS; CHAO, L; CHAO, J. Role of kallistatin in prevention of cardiac remodeling after chronic myocardial infarction. **Lab Invest.** 88: 1157–1166, 2008.

GELLER, D.A.; BILLIAR, T.R. Molecular biology of nitric oxide synthases. **Cancer Metast Rev.** 17: 7–23, 1998.

GEORGAKOUDI, I.; JACOBSON, B.C; MÜLLER, M.G.; SHEETS, E.E.; BADIZADEGAN, K.; CARR-LOCKE, D.L.; CRUM, C.P.; BOONE, C.W.; DASARI, R.R.; VAN DAM, J.; FELD, M.S. NAD(P)H and Collagen as in Vivo Quantitative Fluorescent Biomarkers of Epithelial Precancerous Changes. **Cancer Res.** 62: 682–687, 2002.

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. **Anal Biochem.** 126(1) 131-138, 1982.

GURDOL, F.; CIMSIT, M.; ONER-IYIDOGAN; Y.; KOCAK, H.; SENGUN, S.; YALCINKAYA-DEMIRSOZ, S. Collagen synthesis, nitric oxide and asymmetric dimethylarginine in diabetic subjects undergoing hyperbaric oxygen therapy. **Physiol Res.** 59(3): 423-9, 2010.

HEINEMEIER, K; LANGBERG, H; OLESEN, JL; KJAER, M. Role of TGF-β1 in relation to exercise-induced type I collagen synthesis in human tendinous tissue. **J Appl Physiol.** 95: 2390–2397, 2003.

HOELL, T.; HUSCHAK, G; BEIER, A.; HÜTTMANN, G.; MINKUS, Y.; HOLZHAUSEN, H.; MEISEL, H. Auto fluorescence of intervertebral disc tissue: a new diagnostic tool. **Eur Spine J.** 15(Suppl. 3): S345–S353, 2006.

HOU, Y.; MAO, Z.; WEI, X.; LIN, L.; CHEN, L.; WANG, H.; FU, X.; ZHANG, J.; YU, C. The roles of TGF-b1 gene transfer on collagen formation during Achilles tendon healing. **Biochem Biophys Res Commun.** 383: 235–239, 2009.

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.

ITO, Y; TORIUCHI, N; YOSHITAKA, T; UENO-KUDOH, H; SATO, T; YOKOYAMA, S; NISHIDA, K; AKIMOTO, T; TAKAHASHI, M; MIYAKI, S; ASAHARA, H. The Mohawk homeobox gene is a critical regulator of tendon differentiation. **PNAS**. 107(23): 10538–10542, 2010.

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

KANE, T; ISMAIL, M; CALDER, J. Topical Glyceryl Trinitrate and Noninsertional Achilles Tendinopathy. **Am J Sports Med**. 36(6): 1160-1163, 2008.

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

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

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

KJAER, M. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. **Physiol Rev**. 84(2): 649-698, 2004.

KNOWLES, R; MONCADA, S. Nitric oxide synthases in mammals. **Biochem J**. 298: 249-258, 1994.

KRIVIC, A.; ANIC, T.; SEIWERTH, S.; HULJEV, D.; SIKIRIC, P. Achilles Detachment in Rat and Stable Gastric Pentadecapeptide BPC 157: Promoted Tendon-to-Bone Healing and Opposed Corticosteroid Aggravation. **J Orthop Res**. 24: 982–989, 2006.

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.

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.

MAFFULLI, N.; LONGO, U.G.; FRANCESCHI, F.; RABITTI, C.; DENARO, V. Movin and Bonar Scores Assess the Same Characteristics of Tendon Histology. **Clin Orthop Relat Res.** 466: 1605–1611, 2008.

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.

MENDONÇA JR, HP; ASSUNÇÃO, AV. Associação entre distúrbios do ombro e trabalho: breve revisão da literatura. **Rev Bras Epidemiol.** 8(2): 167-176, 2005.

MIKIROVA, NA; ICHIM, TE; RIORDAN, NH. Anti-angiogenic effect of high doses of ascorbic acid. **J Transl Med.** 6(50), 2008.

MOLLOY, A.; WOOD, E. Complications of the Treatment of Achilles Tendon ruptures. **Foot Ankle Clin N Am.** 14: 745–759, 2009.

MOLLOY, T.; DE BOCK, C.E.; WANG, Y.; MURRELL, G.A. Gene expression changes in SNAP-stimulated and iNOS-transfected tenocytes - expression of extracellular matrix genes and its implications for tendon-healing. **J Orthop Res.** 24(9): 1869-82, 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. **Pharm Rev.** 43(2): 109-142, 1991.

MOS, M; VAN EL, B; DEGROOT, J; JAHR, H; VAN SCHIE, HTM; VAN ARKEL, ER; TOL, H; HEIJBOER, R; VAN OSCH, GJV; VERHAAR, JAN. 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.

MYLLYHARJU, J. Prolyl 4-hydroxylases, the key enzymes of collagen biosynthesis. **Matrix Biol.** 22: 15–24, 2003.

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.

OBAYASHI, K; AKAMATSU, H; OKANO, Y; MATSUNAGA, K; MASAKI, H. Exogenous nitric oxide enhances the synthesis of type I collagen and heat shock protein 47 by normal human dermal fibroblasts. **J Dermat Sci.** 41: 121-126, 2006.

OKAMOTO, T.; AKAIKE, T.; SAWA, T.; MIYAMOTO, Y.; VLIET, A.; MAEDA, H. Activation of Matrix Metalloproteinases by Peroxynitrite-induced Protein S-Glutathiolation via Disulfide S-Oxide Formation. **J Biol Chem.** 276: 29596–29602, 2001.

OTTANI, V; MARTINI, D; FRANCHI, M; RUGGERI, A; RASPANTI, M. Hierarchical structures in fibrillar collagens. **Micron.** 33: 587–596, 2002.

PACHER, P.; SCHULZ, R.; LIAUDET, L.; SZABÓ, C. Nitrosative stress and pharmacological modulation of heart Failure. **Trends Pharmacol Sci.** 26(6): 302–310, 2005.

PADANILAM, T.G. Chronic Achilles Tendon Ruptures. **Foot Ankle Clin N Am.** 14: 711–728, 2009.

PAOLONI, J; APPLEYARD, R; NELSON, J; MURRELL, G. Topical Nitric Oxide Application in the Treatment of Chronic Extensor Tendinosis at the Elbow. **Am J Sports Med.** 31(6): 915-920, 2003.

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.

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

RICHARDOT, P; CHARNI-BEN TABASSI, N; TOH, L; MAROTTE, H; BAY-JENSEN, A. C-; MIOSSEC, P; GARNERO, P. Nitrated type III collagen as a biological marker of nitric oxide-mediated synovial tissue metabolism in osteoarthritis. **Osteoar Cart.** 17: 1362-1367, 2009.

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. **Nature Clin Pract Rheumatol.** 4(2): 82-89, 2008.

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

SÁNCHEZ, M.; ANITUA, E.; AZOFRA, J.; ANDÍA, I.; PADILLA, S.; MUJIKA, I. Comparison of Surgically Repaired Achilles Tendon Tears Using Platelet-Rich Fibrin Matrices. **Am J Sports Med.** 35: 245-251, 2007.

SANTHANAM, L; CHRISTIANSON, DW; NYHAN D; BERKOWITZ DE. Arginase and vascular aging. **J Appl Physiol.** 105: 1632–1642, 2008.

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.

SHI, HP; EFRON, DT; MOST, D; TANTRY, US; BARBUL, A. Supplemental dietary arginine enhances wound healing in normal but not inducible nitric oxide synthase knockout mice. **Surgery**. 128: 374-378, 2000.

SIWIK, DA; COLUCCI, WS. Regulation of Matrix Metalloproteinases by Cytokines and Reactive Oxygen/Nitrogen Species in the Myocardium. **Heart Fail Rev**. 9: 43-51, 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.

TAKALUOMA, K; HYRY, M; LANTTO, J; SORMUNEN, R; BANK, RA; KIVIRIKKO, KI; MYLLYHARJU, J; SOININEN, R. Tissue-specific Changes in the Hydroxylysine Content and Cross-links of Collagens and Alterations in Fibril Morphology in Lysyl Hydroxylase 1 Knock-out Mice. **J Biol Chem**. 282(9): 6588–6596, 2007.

TOFOVIC, S.P.; SALAH, E.M.; DUBEY, R.K.; MELHEM, M.F.; JACKSON, E.K. Estradiol Metabolites Attenuate Renal and Cardiovascular Injury Induced by Chronic Nitric Oxide Synthase Inhibition. **J Cardiovasc Pharmacol**. 46: 25–35, 2005.

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.

URTASUN, R; CONDE DE LA ROSA, L; NIETO, N. Oxidative and Nitrosative Stress and Fibrogenic Response. **Clin Liver Dis**. 12(4): 769-791, 2008.

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.

VIRCHENKO, O.; ASPENBERG, P. How can one platelet injection after tendon injury lead to a stronger tendon after 4 weeks? Interplay between early regeneration and mechanical stimulation. **Acta Orthop**. 77(5): 806–812, 2006.

VIRCHENKO, O.; GRENEGÅRD, M.; ASPENBERG, P. Independent and additive stimulation of tendon repair by thrombin and platelets. **Acta Orthop**. 77 (6): 960–966, 2006.

WANG, W.; SAWICKI, G.; SCHULZ, R. Peroxynitrite-induced myocardial injury is mediated through matrix metalloproteinase-2. **Cardiovasc Res**. 53: 165–174, 2002.

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; APPELYARD, 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.

XIA, W; SZOMOR, Z; WANG, Y; MURRELL, G. Nitric Oxide Enhances Collagen Synthesis in Cultured Human Tendon Cells. **J Orthop Res**. 24:159-172, 2006.

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

YALAMANCHI, N.; MATTHEW, B.; KLEIN, B.; PHAM, H.; MICHAEL, B.S.; LONGAKER, T.; CHANG, J. Flexor tendon wound healing in vitro: lactate up-

regulation of TGF- $\beta$  expression and functional activity. **Plast Reconstr Surg.** 113: 625, 2004.

YEUNG, C.K.; GUO, X.; NG, Y.F.. Pulsed Ultrasound Treatment Accelerates the Repair of Achilles Tendon Rupture in Rats. **J Orthop Res.** 24: 193-201, 2006.

YOSHIDA, H; YANAI, H; NAMIKI, Y; FUKATSU-SASAKI, K; FURUTANI, N; TADA, N. Neuroprotective effects of edaravone: a novel free radical scavenger in cerebrovascular injury. **CNS Drug Reviews.** 12(1): 9–20, 2006.

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, G; YOUNG, BB; EZURA, Y; FAVATA, M; SOSLOWSKY, LJ; CHAKRAVARTI, S; BIRK, DE. Development of tendon structure and function: Regulation of collagen fibrillogenesis. **J Musculoskelet Neuronal Interact.** 5(1): 5-21, 2005.

ZHAO, Y; CHEN, L; GAO, S; TOSELLI, P; STONE, P; LI, W. The critical role of the cellular thiol homeostasis in cadmium perturbation of the lung extracellular matrix. **Toxicology.** 267(1-3): 60-69, 2010.

ZHENG, W.; LAU, W.; CHENG, C.; SOO, K.C.; OLIVO, M. Optimal excitation-emission wavelengths for autofluorescence diagnosis of bladder tumors. **Int. J. Cancer.** 104: 477–481, 2003.