



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

**RUPTURA TOTAL DO TENDÃO DE AQUILES INDUZ RESPOSTA
INFLAMATÓRIA E ATIVAÇÃO GLIAL NA MEDULA ESPINHAL DE
CAMUNDONGOS**

DIEGO RODRIGUES DE PAULA

BELÉM/PA

2022

DIEGO RODRIGUES DE PAULA

**RUPTURA TOTAL DO TENDÃO DE AQUILES INDUZ RESPOSTA
INFLAMATÓRIA E ATIVAÇÃO GLIAL NA MEDULA ESPINHAL DE
CAMUNDONGOS**

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Neurociências e
Biologia Celular da Universidade
Federal do Pará como requisito final
para obtenção do título de Mestre em
Neurociências e Biologia Celular.

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

BELÉM/PA

2022

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

D278r de Paula, Diego Rodrigues.
Ruptura do tendão de Aquiles induz resposta inflamatória
e ativação glial na medula espinhal de camundongos / Diego
Rodrigues de Paula. — 2022.
71 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Anderson Manuel Herculano
Oliveira da Silva
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará,
Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-
Graduação em Neurociências e Biologia celular, Belém,
2022.

1. Glia. 2. Medula espinhal. 3. Neuroinflamação. 4.
Tendinopatia. I. Título.

CDD 571.3

DIEGO RODRIGUES DE PAULA

**RUPTURA TOTAL DO TENDÃO DE AQUILES INDUZ RESPOSTA
INFLAMATÓRIA E ATIVAÇÃO GLIAL NA MEDULA ESPINHAL DE
CAMUNDONGOS**

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 final para obtenção do grau de
Mestre em Neurociências e Biologia Celular – área de concentração em
Neurociências

Banca examinadora:

Prof. Dr Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva – Orientador

Instituto de Ciências Biológicas – UFPA.

Prof^a. Dra. Suellen Alessandra Soares de Moraes – Membro da Banca

Instituto de Ciências da Saúde – UFPA.

Prof^a.Dra. Luana Ketlen Reis Leão – Membro da Banca

Instituto de Ciências Biológicas – UFPA

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Neurofarmacologia Experimental do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará sob orientação da Prof^o. Dr^o. Anderson Manoel Herculano. A realização da pesquisa contou com o apoio das seguintes instituições de fomento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) e Fundação Amazônia Amparo a Estudos e Pesquisas (Fapespa).

Dedico esta dissertação

À meus pais, Antônio Dias e Nancy de Paula, pelo amor, apoio e incentivo na minha formação pessoal e profissional. Vocês representam meu grande exemplo de caráter e dignidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela sua infinita misericórdia e graça e por me conceder esse momento de realizar essa conquista.

Aos meus Pais Antônio Dias e Nancy de Paula, que foram meu esteio e sempre apoiaram meus estudos mesmo em condições totalmente desfavoráveis à isso. Mãe, sou admirador de toda sua força e resiliência que manteve nossa família sempre unida. Agradeço as minhas irmãs Nancilene de Paula e Joycilene de Paula pelo apoio durante todo esse tempo. Minha família é meu maior bem.

Ao meu orientador Pr.º Dr. Anderson Herculano, que em 2015 abriu as portas do LNE me acolhendo como aluno de iniciação científica. Seus ensinamentos teóricos e do método científico foram essenciais para minha construção profissional e para realização deste trabalho. Sou grato também por todas as oportunidades proporcionadas e pelos desafios propostos que me permitiram adentrar no mundo da pesquisa científica.

Agradeço especialmente à Martha França, minha coorientadora pela qual tenho imensa admiração e respeito. Não somente pela contribuição na minha formação profissional, mas por seus conselhos - quase que diários - de vida. Obrigado por me ajudar num dos momentos mais difíceis que já passei e sobretudo ajudar a enxergar as adversidades da vida como oportunidades de crescimento. “Sabes que pra mim “

Aos professores do LNE, Karen Oliveira, Evander Batista, Luana Leão e Adelaide Passos pelos ensinamentos, parcerias e contribuições em minha formação, especialmente a Professora Suelen Moraes, fundadora do grupo de pesquisa em Tendinopatia, por muito gentilmente me ensinar a árdua missão (risos) de dissecar a medula espinhal de camundongos.

Ao meu grupo de pesquisa formado por Analú Maciel, Thalita Moura e Martha França, por todo apoio nos incansáveis dias de experimento e pelas discussões, um tanto filosóficas, nas tardes de café que tivemos juntos. Como

dizia nossa mestra *“somos como as palavras, só fazemos sentido quando juntos”*.

Aos meus amigos do LNE Jéssica, Nadyme, Nívia, Patrick, Brenda, Lucas, Larissa, Caio, Ketan e Gabriel. Vocês são os irmãos que a vida científica me presenteou. Passamos momentos incríveis juntos dentro e fora do laboratório, inclusive nas viagens para congressos que nos renderam histórias inimagináveis e risadas incansáveis.

Também agradeço a essas duas pessoas incríveis que me incentivaram muito a finalizar essa pesquisa, com palavras e atitudes de encorajamento e ânimo. Obrigado por tudo Evaldo Zeferino e Rosana Benchimol.

Aos meus amigos plantonista do HPSM, Thaynah, Açucena, Rangel e Angélica e do HRM: Rafaela, Beatriz, Daniela, Anne e Nayara por todo apoio e amizade.

Não poderia deixar de agradecer ao bioterista Seu Amarildo Gomes, que conquista todos com sua simpatia e bom humor.

Ao CNPq e CAPES pelo apoio financeiro para realização desta pesquisa.

Por fim à Universidade Federal do Pará e ao PPNBC, pelo apoio estrutural e oportunidades de formação. Meu muito obrigado!

“A persistência é o caminho do êxito.”
(Charles Chaplin).

RESUMO

A ruptura do tendão de Aquiles é um acidente comum que afeta atletas profissionais e recreativos. Sintomas algícos agudos e crônicos são comumente observados em pacientes após ruptura, geralmente associados a resposta inflamatória local. Os fatores que causam sensibilidade exagerada à dor em pacientes sintomáticos são pouco compreendidos. Evidências sugerem que a ruptura do tendão de Aquiles, não se restringe às alterações estruturais do tecido, mas é capaz de induzir alterações no sistema nervoso central (SNC). Nesse sentido, este estudo objetivou avaliar o impacto da ruptura do tendão de Aquiles no perfil bioquímico e histológico na medula espinhal (L5) e na resposta nociceptiva em modelo murino. Os animais, após cirurgia de tenotomia do tendão de Aquiles, foram divididos em dois grupos: controle (CG - sem ruptura) e Ruptura (GR - tenotomizados). A sensibilidade mecânica foi avaliada através do teste de von Frey no 7º e 14º dia pós tenotomia (dpt). A reatividade glial foi avaliada por imuno-histoquímica para microglia (IBA-1) e astrócitos (GFAP), e a resposta inflamatória foi avaliada por imunofluorescência para NOS-2 e COX-2 em 7 e 14 dpt. Quantificamos os níveis de nitrito no segmento medular lombar, por dosagem bioquímica (método de Griess). Demonstramos, pelo teste de sensibilidade mecânica, hiperalgesia na pata ipsilateral do grupo ruptura após 7 e 14 dpt quando comparado ao grupo controle. Esse fenômeno foi acompanhado por hiperativação de astrócitos e microglia em áreas de processamento sensorial da medula espinhal L5, predominantemente no lado ipsilateral à lesão do tendão. Identificamos ativação inflamatória através da expressão de COX-2 e NOS-2, exclusivamente no 14º dpt. Esses dados foram sustentados por achados bioquímicos que demonstraram elevação significativa dos níveis de nitrito na medula espinhal lombar dos animais submetidos à ruptura do tendão de Aquiles em 7 e 14 dpt. O presente estudo demonstrou pela primeira vez que a ruptura total do tendão de Aquiles induz resposta neuroinflamatória associada a ativação glial na medula espinhal (L5) de camundongos.

Palavras-chave: Glia, medula espinhal, neuroinflamação, Tendinopatia.

ABSTRACT

Achilles tendon rupture is a common accident that affects both professional and recreational athletes. Acute and chronic pain are commonly seen in patients after rupture, usually associated with local inflammatory activation. The factors leading to hyperalgesia in symptomatic patients are poorly understood. Evidence suggests that Achilles tendon rupture is not restricted to tissue changes, but is able to evoke changes in the central nervous system (CNS). This study aimed to evaluate the impact of Achilles tendon rupture on the biochemical and histological profile in the spinal cord (L5) and on the nociceptive response in a murine model. The animals after Achilles tendon tenotomy surgery were divided into two groups: control (without rupture) and Rupture (tenotomized). Mechanical sensitivity test (von Frey) was assessed on the 7th and 14th day post-tenotomy (dpt). Glial reactivity was assessed by immunohistochemistry for microglia (IBA-1) and astrocytes (GFAP). Inflammatory activation was assessed by immunofluorescence for NOS-2 and COX2 at 7th and 14th dpt. We show, by the mechanical sensitivity test, an increase in the algescic response in the ipsilateral paw of the ruptured group on the 7th and 14th dpt when compared to the control group. This phenomenon was accompanied by hyperactivation of astrocytes and microglia in sensory processing areas of the L5 spinal cord, predominantly on the ipsilateral side to the tendon injury. We show inflammatory activation by expression of COX-2 and NOS-2, exclusively in the 14th dpt. These data were supported by biochemical findings that demonstrated significant nitrite levels increase in the lumbar spinal cord of animals submitted to Achilles tendon rupture at 7 and 14 dpt. The present study demonstrated for the first time that complete rupture of the Achilles tendon induces a neuroinflammatory response associated with glial activation in the spinal cord (L5) of mice.

Keywords: Glia, Spinal cord, Neuroinflammation, Tendinopathy.

LISTA DE ABREVIATURAS

- CCL2: ligante 2 de quimiocinas
- CDC: corno dorsal contralateral
- CDI: corno dorsal ipsilateral
- CGRP: peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
- COX-2: Ciclo-oxigenase-2 (induzível)
- CVC: corno ventral contralateral
- CVI: corno ventral ipsilateral
- DAB: 3,3' diaminobenzidina
- DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole
- GFAP: proteína glial fibrilar ácida
- HE: Hematoxilina Eosina
- IBA1: Ionized calcium binding adaptor molecule 1
- L5: nível medular 5ª lombar
- NFL: National Football League
- NMDA: N-metil-D-aspartato
- NO: Óxido nítrico
- NOS 2: óxido nítrico sintase tipo 2
- OTG: órgão tendinoso de golgi
- PARs: receptores ativados por proteases
- PBS: tampão fosfato-salino
- PFA: paraformaldeído
- PGE: prostaglandina E2
- SNC: sistema nervoso central
- SP: substância P

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Composição do complexo musculotendinoso Tríceps Sural	20
Figura 2: Alterações estruturais do tendão na tendinopatia	23
Figura 3: Estrutura e composição anatômica da medula espinhal	27
Figura 4: Desenho esquemático representativo do processamento da via ascendente nociceptiva	28
Figura 5: Imagem descritiva do procedimento cirúrgico de tenotomia.....	33
Figura 6: Figura esquemática representando o aparato de adaptação e testagem do teste de von Frey	38
Figura 7: Efeitos da ruptura do tendão de Aquiles no limiar nociceptivo mecânico.....	40
Figura 8: Histoquímica para hematoxilina & eosina em cortes transversais da medula espinhal de camundongos no segmento L5	42
Figura 9: Efeitos da ruptura do tendão de Aquiles na reatividade dos astrócitos da medula espinhal	44
Figura 10: Efeitos da ruptura do tendão de Aquiles na reatividade microglial da medula espinhal	46
Figura 11: Efeitos da ruptura do tendão de Aquiles na reatividade glial nos cornos dorsais lados ipsi e contralateral à ruptura.....	48
Figura12: Resposta inflamatória na medula espinhal induzida pela ruptura	

do tendão de Aquiles: Expressão de COX-2 50

Figura 13: Resposta inflamatória na medula espinhal induzida pela ruptura

do tendão de Aquiles: Expressão de NOS-2 51

Figura 14: Efeito da ruptura do tendão nos níveis de nitrito no SNC

de camundongos tenotomizados..... 53

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Considerações gerais.....	17
1.2 Aspectos fisiopatológicos da tendinopatia	19
1.3 Tendinopatia e a problemática da dor	21
1.4 Sistema nervoso central (SNC) e tendinopatia	24
1.5 Plasticidade neural central em resposta a lesões periféricas e avaliação nociceptiva	29
2. OBJETIVOS.....	31
2.1 Objetivo geral	31
2.2 Objetivos específicos.....	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1 Animais experimentais	32
3.2 Cirurgia Tenotomia (indução de ruptura tendínea).....	32
3.3 Grupos e delineamento experimental.....	33
3.4 Dissecção da medula espinhal.....	33
3.5 Processamento histológico.....	34
3.6 Coloração com hematoxilina e eosina (H&E)	34
3.7 Imunohistoquímica	35
3.8 imunofluorescência	35
3.9 Quantificação da reatividade glial.....	36
3.10 Dosagem de nitrito	36
3.11 Teste comportamental de sensibilidade mecânica (Von Frey)	37
3.12 Análise estatística	38
4. RESULTADOS.....	39

4.1 A ruptura total do tendão de Aquiles reduz o limiar nociceptivo mecânico de camundongos.....	39
4.2 Caracterização da amostra por H&E	41
4.3 Efeito da ruptura do tendão de Aquiles na ativação de astrócitos no segmento L5 da medula espinhal.....	43
4.4 Efeito da ruptura do tendão de Aquiles na ativação de micróglias no segmento L5 da medula espinhal.....	45
4.5 Análise do número de células GFAP e IBA-1 positivas nos cornos dorsais da medula espinhal (L5) de camundongos após tenotomia	47
4.6 Efeitos da ruptura do tendão de Aquiles na ativação inflamatória do SNC: expressão de COX-2 e NOS-2 no segmento L5 da medula espinhal.....	49
4.7 Efeitos da ruptura do tendão de Aquiles nos níveis de nitrito na medula espinhal de camundongos.....	52
5. DISCUSSÃO	54
6. CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS.....	61

1. INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A tendinopatia é uma lesão que atinge os tendões, a qual caracteriza-se por uma injúria de natureza degenerativa ou inflamatória, estando mais associada a indivíduos que são expostos a altas cargas mecânicas e ao uso excessivo dessa estrutura, que o predispõe a microrrupturas gerando regeneração inadequada do tendão, tornando esse tecido susceptível à lesões (RILEY et al., 2002). Em atletas, os tendões mais acometidos nos membros inferiores são o tendão patelar e o tendão de Aquiles (CLAYTON & COURTBROWN, 2008; KNAPIK, POPE, 2020). Em ambas as condições clínicas, geralmente o indivíduo acometido refere dor no tendão relacionada a práticas esportivas como saltar, agachar e correr (BANK et al., 1999; RILEY et al., 2002; BIRCH, 2007). A tendinopatia pode ser induzida por um processo inflamatório, gerando alterações que podem se manifestar de forma aguda ou crônica. Uma consequência comum da tendinopatia do tendão de Aquiles, é a ruptura deste tecido que pode ocorrer de forma parcial ou total (RILEY et al., 2002; KNAPIK, POPE, 2020).

Apesar de existir uma lacuna com poucos estudos que documentam a prevalência de rupturas de tendão de Aquiles na população em geral, alguns estudos descrevem a prevalência desta tendinopatia em atletas profissionais e recreacionais. Uma pesquisa conduzida no Reino Unido mostrou que a ruptura do tendão de Aquiles tem incidência de 11,3 casos por 100.000 pessoas por ano (CLAYTON & COURTBROWN, 2008). Na Finlândia, a incidência aumentou de 2 para 12 casos por 100.000 pessoas dos anos 1970 para os 1990, e a maioria dos casos esteve relacionado à prática esportiva (LEPPILAHTI et al., 1996). Em 2015, nos estados unidos a incidência de tendinopatia do tendão de Aquiles em corredores foi de 5 casos por 100.000 pessoas por ano (KNAPIK, POPE, 2020).

Em 2005 houve um levantamento com dados epidemiológicos a respeito de lesões tendíneas, o qual verificou altas taxas de lesões em atletas profissionais. Outra pesquisa apenas com atletas identificou que 68% deles apresentavam tendinopatia do tendão de Aquiles, enquanto 3% relataram a

ruptura completa. Já em outro trabalho que comparou a presença de lesões entre atletas e controles, verificou-se que 29% dos atletas contra 4% dos controles apresentavam lesão por uso repetitivo (JÄRVINEN *et al.*, 2005).

O tendão de Aquiles é o tendão mais acometido nas extremidades inferiores de atletas e notadamente o mais reportado por sofrer rupturas espontâneas. Esse fato gera consequências para o atleta que comumente leva ao afastamento da prática esportiva ou redução da performance. Parekh e colegas documentaram 31 casos de rupturas do tendão de Aquiles na National Football League (NFL) entre os anos de 1997 e 2002. A média de idade e tempo na liga foi de 29 anos e 6 anos, respectivamente. Aproximadamente 32% dos jogadores (10/31) nunca mais jogaram na NFL, e aqueles que retornaram apresentaram uma redução em seu desempenho de mais de 50%. A presença de anormalidades morfológicas no tendão e/ou dor e/ou sinais de disfunção (lesões ou sintomas que requerem afastamento da prática esportiva ou redução da performance) são desfechos comumente investigados em pesquisas sobre a tendinopatia em humanos e em modelo animal (PAREKH, 2009, MORAES *et al.*, 2013; SOUZA, *et al* 2019).

Diversos estudos se concentram na investigação de tratamentos para tendinopatia, no entanto, os tratamentos disponíveis até o momento ainda não se mostram totalmente efetivos a fim de proporcionar um rápido e duradouro processo de reparo do tendão, uma vez que o quadro algico e de re-ruptura são muito persistentes e prevalentes, assim como o surgimento de tendinopatia em outros tecidos decorrente da sobrecarga por compensação (MOLLER *et al.*, 2001, OHBERG *et al.*, 2001; DOCKING *et al.*, 2015).

Por outro lado, outras investigações focaram na fisiopatologia, afim de compreender os fatores que levam as alterações clássicas do tecido lesionado, principalmente no que diz respeito ao processo cicatricial e mudanças estruturais e funcionais no tecido, porém pouco se sabe a respeito da influência dessas lesões de tendão em outros tecidos ou sistemas. Dentro desse contexto, alguns estudos já iniciaram discussões a respeito de evidências de alterações no sistema nervoso central (SNC) durante o processo de cicatrização, demonstrando que estas lesões podem se mostrar

muito mais complexas do que se acredita (ANDERSSON et al., 2011; O'BRIEN; SMITH, 2013; ALFREDSON et al., 2014).

1.2 ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS DA TENDINOPATIA

O tendão de Aquiles é o maior e mais forte tendão do corpo humano e é composto pelos músculos gastrocnêmio e sóleo para criar um complexo musculotendinoso (tríceps sural) que cruza o joelho, tornozelo e articulação subtalar (figura 1). O tendão de Aquiles está sujeito a cargas estáticas e dinâmicas extensas e pode ser submetido a cargas de 2 a 3 vezes o peso corporal e em algumas situações de atividades atléticas pode chegar em até 10 vezes o peso corporal (JÄRVINEN et al., 2005).

O processo inflamatório na tendinopatia caracteriza a primeira fase do processo de reparo, denominada de fase inflamatória que dura de 0 a 2 semanas. Por conseguinte, tem-se a fase proliferativa (2 a 4 semanas) seguida da fase de remodelagem (4 a 10 semanas). A sequência das três fases é dividida didaticamente, porém nos momentos de transição entre elas, os eventos característicos de cada fase ocorrem ao mesmo tempo (BRING, 2007; RILEY, 2008; ABATE et al., 2009).

O tendão saudável possui uma textura fibroelástica de aparência branca e brilhante. É constituído por células de morfologia alongada dispostas em fileiras, estes tipos celulares são fibroblastos especializados denominados de tenócitos que se organizam em feixes de fibras paralelas ao colágeno (Figura 2), sua principal função é a síntese de componentes fibrilares (colágeno e elastina) e não fibrilares (glicoproteínas e proteoglicanas) da matriz extracelular do tecido conjuntivo (SILVER et al., 2003; VIDAL, 2003).

O colágeno tipo I é constituído de tripla hélice de polipeptídios que garante ao tendão resistência para suportar cargas mecânicas e, juntamente com uma proteína elástica denominada elastina que compõe cerca de 1 a 10% da massa seca do tendão, garante elasticidade ao tecido tendinoso, capacidade para absorver choques e a alta resistência a fadiga (GOSLINE et al., 2002; KANNUS, 2000; SILVER et al., 2003; VIDAL, 2003)



Figura 1: Composição do complexo musculotendinoso Tríceps sural. Formado pelos músculos gastrocnêmio e sóleo que se inserem através do tendão de Aquiles no osso calcâneo. Fonte: <https://www.centraldafisioterapia.com.br>. Acessado em 11 de fevereiro de 2022.

Após a lesão, o tecido muda completamente essa estrutura. Há uma perda drástica do colágeno tipo I, e as fibras encontradas que foram recém sintetizadas ficam desorganizadas sendo geralmente compostas por colágeno tipo III (figura 2). Um aumento no volume total do tendão também é notável em decorrência da quantidade de água que migra para o tecido (SHARMA; MAFFULLI, 2006; RILEY, 2008).

Junto a essas alterações também é descrito ocorrer aumento da microvasculatura e neovascularização ao redor da malha de colágeno (figura 2). Em condições de homeostasia o tendão é caracterizado por ser pouco vascularizado e pouco inervado. Porém em condições patológicas ocorre intenso crescimento de fibras nervosas (autônômicas e sensoriais) entre as fibras de colágeno, junto ao aumento de mediadores químicos e citocinas pró-inflamatórias, que sugerem um importante papel na regulação da dor, inflamação e reparo do tecido, o que poderia justificar a dor crônica no quadro clínico de tendinopatia (BJUR et al., 2005; LIAN et al., 2006; RILEY, 2008; XU; MURRELL, 2008; ACKERMANN, 2013).

1.3 TENDINOPATIA E A PROBLEMÁTICA DA DOR

Atualmente, os fatores que causam sensibilidade exagerada à dor em pacientes com tendinopatia são pouco compreendidos. Uma incompatibilidade entre a intensidade da dor e as alterações patológicas subjacentes é frequentemente observada. Relatos e estudos demonstram que o processo de dor está comumente presente em todas as fases do processo de cicatrização, perdurando por longos períodos e que não acompanham de igual modo as melhoras teciduais e funcionais, além do que representa um fator limitante nas atividades habituais do indivíduo e ainda é considerada de difícil tratamento (ALFREDSON et al., 2003).

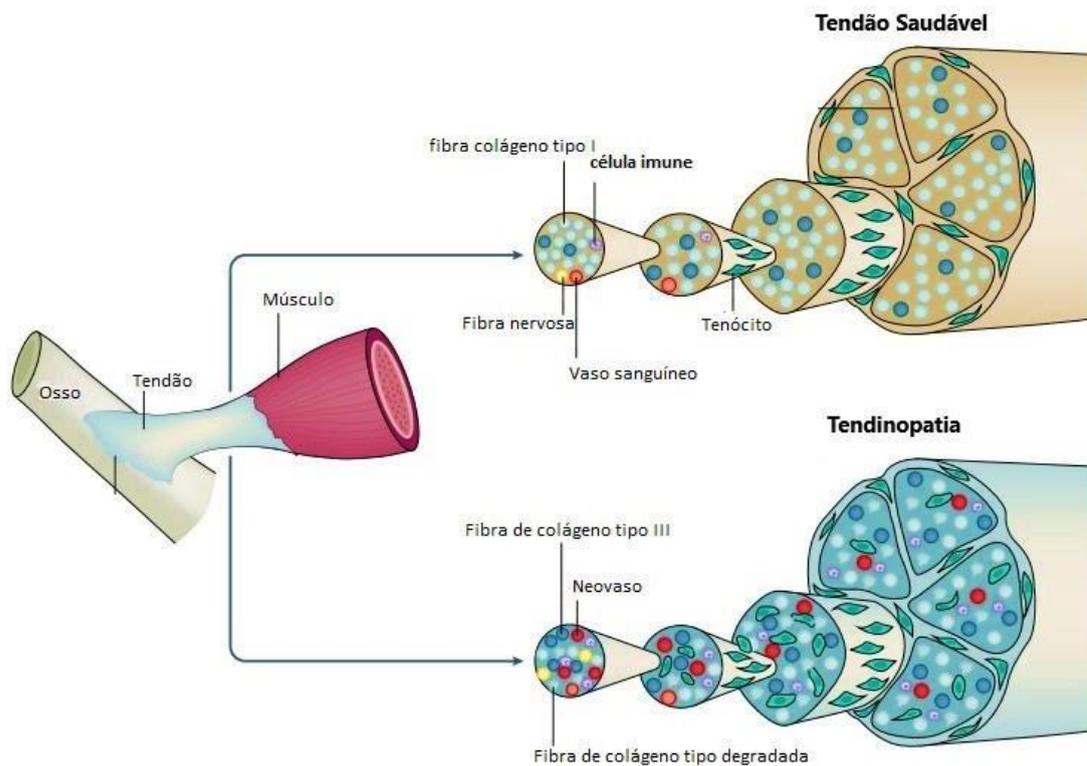
Uma característica anatômica dos tendões é sua extensa função proprioceptiva, são providos de terminais nervosos como corpúsculos de Ruffini (tipo I), corpúsculos de Vater-Pacini (tipo II), órgão tendinoso de Golgi

(tipo III) e terminais nervosos livres (tipo IV). Dessa forma, o tendão é sensível à pressão, tensão, aceleração e desaceleração e dor (ABATE et al., 2009).

Fisiologicamente, a condição primária para que a transmissão de informação nociceptiva ocorra é a presença de estruturas nervosas combinado a expressão de receptores e mediadores químicos. Estudos demonstraram aumento da expressão de neuromoduladores sensoriais nos tendões tais como a substância P (SP), a acetilcolina e o glutamato, sugerindo que a liberação e regulação desses neuromoduladores esteja diretamente relacionada a ativação de fibras nervosas aferentes (ACKERMAN, 2013).

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

Christensen et al. (2015), em seu estudo associa a produção de substância P no tendão lesionado a intensificação do processo inflamatório, sendo um possível sinalizador para células inflamatórias como os mastócitos. Essas células, quando degradadas liberam triptases que ativam receptores ativados por protease (PARs), descritos nesse estudo pela presença em neovasos, terminais nervosos livres e tenócitos. A hipótese é que esses receptores estejam envolvidos no início e manutenção da hiperalgesia nas tendinopatias.



Figuras 2: Alterações estruturais do tendão na tendinopatia. O tendão normal é uma rede bem organizada de fibrilas de colágeno. A matriz extracelular é densa, com uma rede fibrilar de fibras colágenas predominantemente alinhadas paralelamente, consistindo principalmente de colágeno tipo I. Na tendinopatia, os tenócitos diminuem de volume, tornando-se mais longos e delgados, há um aumento do colágeno tipo III. A neovascularização e a neoinervação também são frequentemente encontradas no tendão doente. Adaptado e traduzido de Miller, 2021.

Além disso, estudos mostraram uma regulação positiva do sistema glutamatérgico (glutamato e seus receptores periféricos) em pacientes com tendinopatia do manguito rotador e tendinopatia de Aquiles. O aumento dos níveis de glutamato em situações de tendinopatia é atribuído a uma resposta a agentes inflamatórios (ACKERMANN et al., 2014).

Os estudos realizados sugerem que o excesso de glutamato no tecido conjuntivo do tendão lesionado está associado ao processo de remodelamento tecidual, sendo responsável por alterações como proliferação celular, apoptose e síntese de colágeno (SCHIZAS et al., 2012).

A respeito da modulação nociceptiva no tendão, acredita-se que o sistema glutamatérgico tem um papel chave, entretanto, o exato papel ainda é incerto quanto às respectivas vias metabólicas. Porém, evidências apontam que os níveis do neurotransmissor no tendão e a sensibilidade a dor são diretamente proporcionais, fato associado ao aumento significativo do seu receptor NMDAR1, cuja interação ligante-receptor é encontrado majoritariamente na parede de nervos e vasos. Além disso, a modulação do receptor através do uso de antagonistas mostrou-se eficaz na redução da sensibilidade nociceptiva em modelo experimental. (ACKERMANN, 2013; JULIO-PIEPER et al., 2011).

Nesse sentido, muito se especula a respeito dos processos e vias inflamatórias no tendão que possivelmente estão associados com a hiperalgesia persistente. Apesar do grande avanço, esse aspecto ainda não é totalmente compreendido. Por esse motivo, a compreensão de todos os mecanismos que estão envolvidos na lesão é essencial para o desenvolvimento de novas terapias e aperfeiçoamento dos tratamentos disponíveis.

1.4 SISTEMA NERVOSO CENTRAL E TENDINOPATIA

Novas evidências já sugerem a participação do sistema nervoso central (SNC) no controle neuroinflamatório. O SNC é capaz regular e amplificar a

inflamação periférica através de três vias neuronais: a regulação autonômica, a sensorial e a glutamatérgica. A resposta inflamatória pode então ser modulada através da liberação combinada de diversos neuromoduladores, como o neuropeptídeo Y, a acetilcolina, a substância P, o glutamato, dentre outros. (ACKERMANN, 2013; ACKERMANN et al., 2014).

Essa regulação é em grande parte processada na medula espinhal, que é responsável pelo controle dos movimentos corporais, regulação de funções viscerais e processamento de informações sensoriais provenientes de órgãos e tecidos periféricos. A medula espinhal consiste em uma estrutura do sistema nervoso central localizada no interior do canal central da coluna vertebral que se estende desde a parte inferior do encéfalo (limitada pelo bulbo próximo ao forame magno) até a borda superior da segunda vértebra lombar em humanos adultos (TORTORA; DERRICKSON, 2012; BICAN *et al*, 2013).

Anatomicamente a medula espinhal é classificada em segmentos e dela emergem 31 pares de nervos espinhais (dorsais e ventrais) dos forames intervertebrais, separados em intervalos regulares. Não há segmentação anatômica óbvia, mas, por conveniência, a designação dos nervos espinhais baseia-se no segmento da coluna vertebral em que estão localizados. São eles: 8 cervicais (C1-C8), 12 torácicos (T1-T12), 5 lombares (L1-L5), 5 sacrais (S1-S5), e 1 par de nervos coccígeos (TORTORA; DERRICKSON, 2012; BICAN *et al*, 2013).

Nos segmentos cervical e lombar, há a formação de espessamentos na medula espinhal denominados intumescência cervical e lombar, das quais emergem os nervos que formam os plexos dos membros torácicos e lombares. A intumescência lombar que se estende desde a nona até a décima segunda vértebra torácica é a região de onde emerge o nervo ciático que posteriormente irá se subdividir e dar origem ao nervo tibial, que é responsável pela transmissão de informações aos músculos (gastrocnêmio e sóleo) que se ligam ao tendão calcâneo. Estas informações são conduzidas da medula ao membro ipsilateral (FISCH, 2009; DRAKE *et al.*, 2010).

Semelhante ao encéfalo, a medula é organizada em substância branca e cinzenta, sendo a cinzenta composta predominantemente por neurônios e a branca por células gliais. A região ventral da medula é responsável pelo processamento das funções motoras, que se subdivide, na substância cinzenta, em cornos ventrais direito e esquerdo. Já as informações sensoriais são processadas pelos cornos dorsais direito e esquerdo. O processamento de informação, motora ou sensorial, é majoritariamente ipsilateral ao hemisfério (TORTORA; DERRICKSON, 2012; BICAN *et al*, 2013).

As diferenças entre a substância cinzenta e branca da medula espinhal são causadas pela distribuição diferencial da bainha de mielina. Os principais componentes da substância branca são os axônios mielinizados e os oligodendrócitos produtores de mielina. A substância branca é onde estão presentes as células da micróglia, e não contém corpos de células neuronais. A substância cinzenta contém astrócitos abundantes e grandes corpos de células neuronais, especialmente os neurônios motores nos cornos ventrais (BICAN *et al*, 2013) Figura 3.

O processamento de informações na medula espinhal é muito bem orquestrado e funcionalmente definido através das lâminas de Rexed. Em 1952 o neurocientista sueco Bror Rexed, investigou os neurônios da substância cinzenta na medula espinhal de *Felis Catus*, ele determinou que estes se agrupam em 10 lâminas que são diferenciadas pelo tipo celular e a velocidade de transmissão nervosa característicos. As lâminas I, II, III, IV e V são as primeiras dispostas nos cornos dorsais e estão diretamente relacionadas ao processamento e transmissão de estímulos nociceptivos e sensoriais. As lâminas V e VI estão associadas a recepção de estímulos proprioceptivos derivadas de ossos, músculos, articulações e ligamentos. As lâminas de VII a X no corno ventral estão relacionadas ao processamento de estímulos provenientes de órgãos e também da atividade motora (TODD, 2010) Figura 4.

O processamento de dor (Figura 4) basicamente ocorre através de estímulos eferentes das fibras A β , fibra C e fibra A- δ , que fazem sinapse

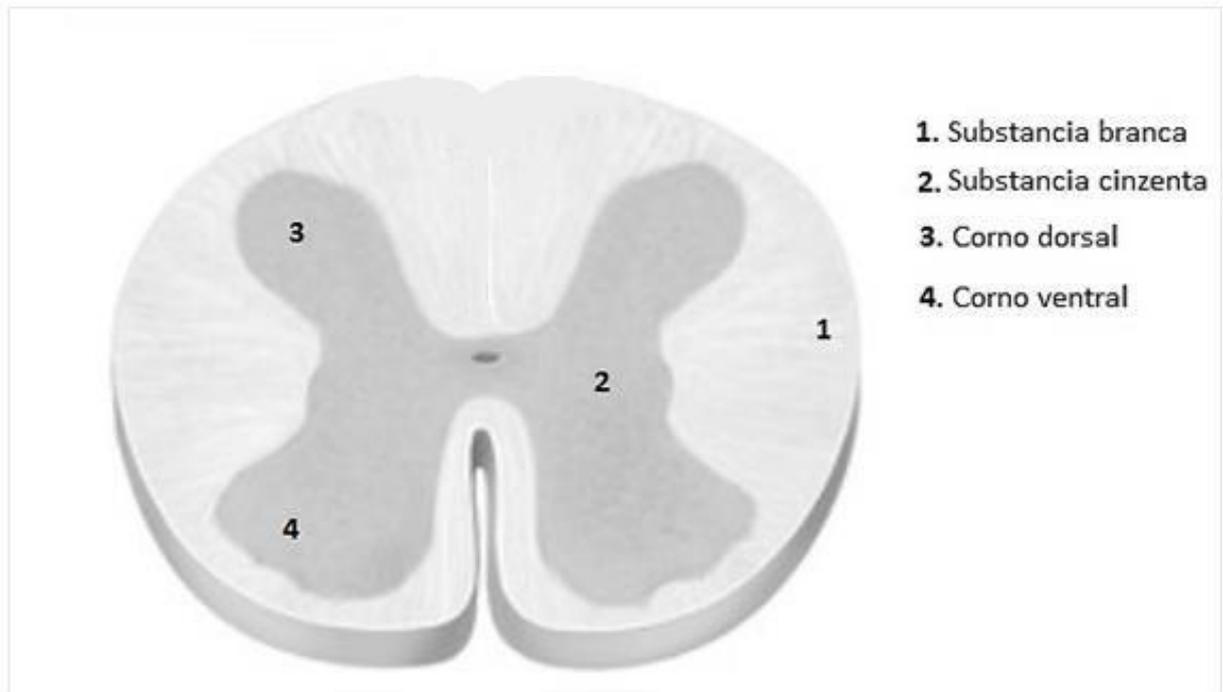


Figura 3: Estrutura e composição anatômica da medula espinhal. Desenho esquemático de uma seção transversal da medula espinhal. Demonstrando a substância branca na parte externa e cinzenta na interna formando o “H” medular. Na região superior os cornos dorsais, onde estão localizados os corpos neuronais sensoriais, e anterior os cornos ventrais onde estão os corpos neuronais motores. Fonte: modificado de eref.thieme.de/cockpits.

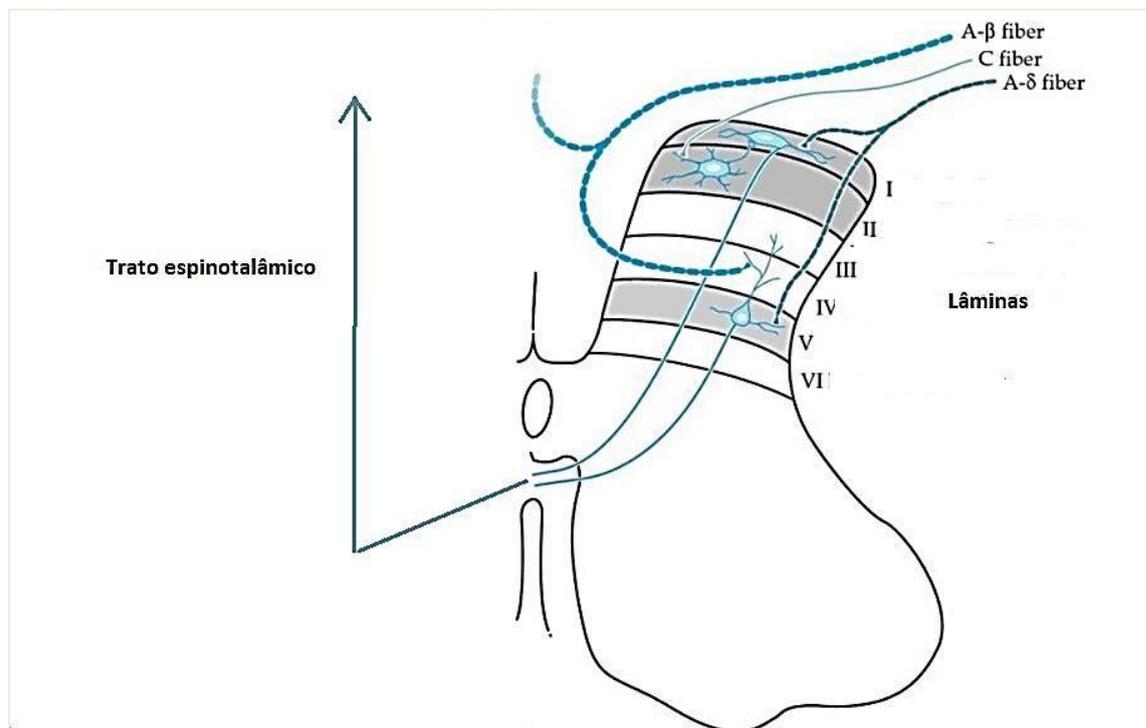


Figura 4. Desenho esquemático representativo do processamento da via ascendente nociceptiva. As fibras sensoriais A β , fibra C e fibra A- δ fazem conexões sinápticas com o segundo neurônio nas lâminas de Rexed que se projetam medialmente, cruzam a linha média e ascendem cranialmente formando o trato espinotalâmico. Fonte: Adaptado e traduzido de <http://neurophilum.com/2013/01/laminas-de-rexed>. Acessado em 18 de fevereiro de 2022.

nas primeiras cinco lâminas descritas previamente. Esses segundos neurônios projetam-se medialmente e cruzam a linha média no próprio segmento levando informações ao lado contralateral e ascendem cranialmente pela substância branca da medula formando o trato espinotalâmico. (LOESER, 2001; TODD, 2010).

Vários estudos recentes em dor crônica mostraram a resposta central após uma lesão periférica avaliando os níveis medulares lombares pós-neuropatia induzida por diversos modelos de lesão em nervo periférico, sobretudo do ciático (WANG et al., 2009; ZHANG et al., 2012; NAIK, et al., 2006). A análise da expressão de marcadores inflamatórios, tal como a COX 2, e da reatividade glial, como o GFAP, é uma abordagem bastante utilizada para avaliar a plasticidade que ocorre após essas lesões (WANG et al., 2009).

Diversos estímulos lesivos já foram reportados por gerar respostas centrais em nível medular e encefálico, como o contato com estímulos nocivos térmicos, mecânicos e químicos. Considerando esse fato e os novos achados relacionados a tendinopatia, nosso grupo notou que há poucas descrições acerca de alterações em marcadores celulares medulares em resposta a uma lesão tendínea (MORAES, 2015; MENDES, *et al*, 2021). Portanto, ainda existe uma enorme lacuna relativa às respostas centrais após uma injúria no tendão (YANG et al., 2008; ACKERMANN, 2014)

1.5 PLASTICIDADE NEURAL CENTRAL EM RESPOSTA A LESÕES PERIFÉRICAS E AVALIAÇÃO NOCICEPTIVA.

As células neuronais que processam as informações do tendão de Aquiles estão localizadas na intumescência lombar no segmento L5 (YOUNG et al., 1983; ACKERMANN, 2013). Poucos estudos avaliaram como a medula espinhal responde à lesão no tendão de Aquiles (YANG et al, 2008; MORAES, 2015; MENDES, *et al*, 2021). Além disso, ainda não está claro se as lesões do tendão de Aquiles são capazes de desencadear uma resposta inflamatória na medula espinhal de pacientes lesionados.

Como demonstrado anteriormente, a ativação inflamatória na medula espinhal lesionada pode ser monitorada pela ativação glial ou neuronal (WANG et al, 2009; SHAMS et al, 2017), bem como pela medição *in loco* de mediadores inflamatórios como as enzimas ciclooxigenase-2 (COX-2) e óxido nítrico sintase-2 induzível (NOS-2). Além disso, astrócitos e micróglia ativadas produzem mediadores inflamatórios como prostaglandinas e óxido nítrico (NO) que são importantes indicadores de lesão do SNC (SAMAD et al, 2001; SOMINSKY et al, 2008). A produção desses agentes inflamatórios é frequentemente avaliada pela expressão local de NOS-2 e COX-2 que são enzimas responsáveis por sua síntese (SAMAD et al, 2001; HERVERA et al, 2010).

O modelo murino é o modelo experimental mais utilizado em estudos relacionados a tendinopatia. Além do relativo baixo custo de manutenção, este representa eficácia por mostrar compatibilidades bioquímica, histológica e também funcional com o tendão humano. Além de representar um excelente modelo animal para verificar alterações comportamentais, tal como alterações de sensibilidade nociceptiva (mecânica, térmica, química) (MURRELL et al., 1992; NAIK et al, 2006). O teste de von Frey, é amplamente utilizado nesse modelo animal para investigar alterações nociceptivas. É realizado através da aplicação de estímulos mecânicos que permitem avaliar a resposta comportamental, sugerindo aumento da sensibilidade do nociceptor frente a estímulos inócuos (hiperalgesia), medida indireta de dor. Ou seja, ativam nociceptores de fibras A δ . As respostas são classificadas através da aplicação dos estímulos mecânicos que vão determinar o limiar nociceptivo (NAIK et al, 2006).

Levando em consideração todo o exposto, nosso grupo questionou se haveria uma resposta inflamatória na medula frente a ruptura do tendão calcâneo. Desse modo, este estudo propõe avaliar o impacto da ruptura do tendão de Aquiles no perfil bioquímico e histológico na medula espinhal e na resposta nociceptiva de camundongos tenotomizados.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o impacto da ruptura do tendão de Aquiles no perfil bioquímico e histológico na medula espinhal e na resposta nociceptiva de camundongos tenotomizados.

2.1 Objetivos específicos

- Identificar os efeitos da ruptura do tendão de Aquiles no limiar nociceptivo em 7 e 14 dias após tenotomia, através do teste de von Frey.
- Analisar, através de ensaio imunohistoquímico os efeitos da ruptura do tendão de Aquiles na reatividade astrocitária e microglial (GFAP e IBA1) da medula espinhal, em 7 e 14 dias pós tenotomia.
- Investigar, através de ensaio de imunofluorescência para COX-2 e NOS-2, a ocorrência de resposta inflamatória na medula espinhal induzida pela ruptura do tendão de Aquiles, em 7 e 14 dias pós tenotomia.
- Avaliar, por meio de dosagem de nitrito, a possível ativação nitrérgica na intumescência lombar em 7 e 14 dias pós tenotomia.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 39 camundongos da linhagem Balb/C (*Mus musculus*), machos, com massa corporal na faixa de 25-30g 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 25°C com ciclo claro/escuro (12:12) horas, além de receberem água e ração *ad libitum*.

Este projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa com animais de experimentação da UFPA (CEPAEUFGPA) sob o parecer 2066070716.

3.2 Cirurgia Tenotomia (tenotomia cirúrgica):

Após sedoanestesia via IP (intra peritoneal) com cloridrato de cetamina 10% (90mg/kg) e cloridrato de xilazina 2% (5 mg/kg), todos os animais, exceto o grupo Controle, tiveram sua pata traseira direita tricotomizada. Posteriormente foi realizada uma incisão longitudinal na pele, de cerca de 0,3cm acima da região do osso calcâneo para ter acesso ao tendão do musculo tríceps sural, o qual foi totalmente seccionado por cisalhamento transversal (Figura 5). Posteriormente, somente a pele foi suturada com fio de poliamida monofilamento não absorvível número 4.0 e submetida novamente à assepsia local. Após o procedimento não houve nenhuma restrição ou imobilização do segmento, apenas higienização diária com solução fisiológica até a cicatrização da pele.

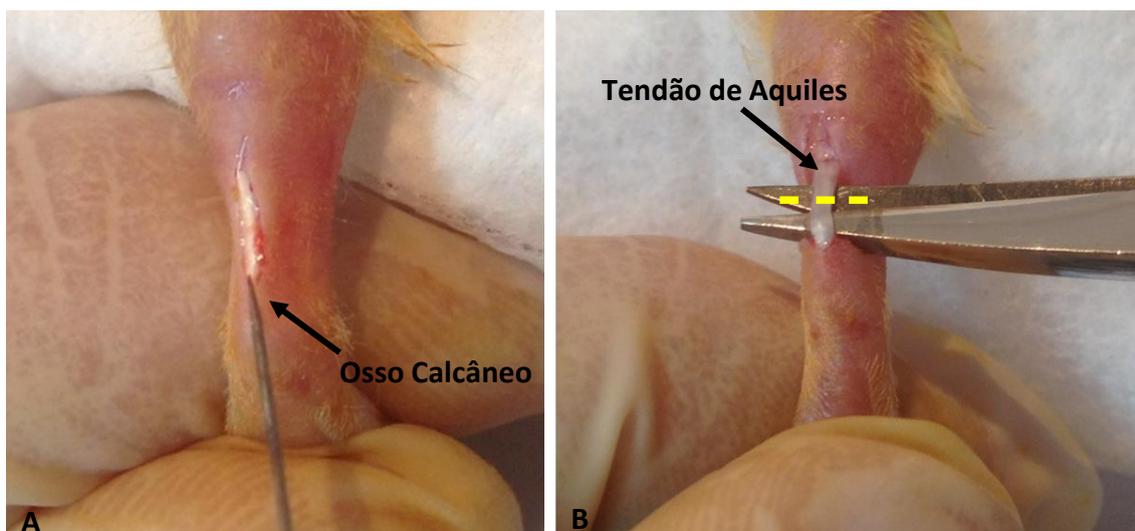


FIGURA 5: Imagem descritiva do procedimento cirúrgico de tenotomia. **A** incisão da pele 0,3 cm acima do osso calcâneo. **B** exposição + ruptura do tendão. A linha tracejada mostra o local onde foi realizada a ruptura por cisalhamento.

3.3 Grupos e delineamento experimental

Para a execução dos experimentos, os animais foram divididos em dois grupos: **Controle** (sem ruptura) e **Ruptura** (com tenotomia cirúrgica), os quais foram avaliados em 7 e 14 dias pós tenotomia (dpt). Os experimentos foram realizados onde cada grupo experimental teve análise morfológica, imunohistoquímica (9 animais, 3 por grupo) e bioquímica (18 animais, n=6 por grupo) da medula espinhal, além da análise comportamental (nociceptiva, 12 animais n= 4 por grupo).

3.4 Dissecção da medula espinhal

Após anestesia IP, foi realizado a eutanásia dos animais por perfusão transcardíaca com solução salina (0,9%) seguido de paraformaldeído (PFA) 4% para fixação tecidual, ambos com pH 7,4. A medula espinhal foi então dissecada completamente do canal central das vertebra da coluna vertebral, a região lombar da medula espinhal foi removida por laminectomia e posteriormente fixada com PFA 4% por 24 horas.

ANÁLISE HISTOLÓGICA

3.5 Processamento histológico

Após dissecação e pós fixação em PFA 4% da medula espinhal as amostras de todos os grupos foram lavadas 3 vezes em solução salina tamponada (PBS, pH 7.4, 0,1M) e mantidas em temperatura de 4°C na mesma solução. Após esse procedimento os tecidos passaram por soluções de crioproteção crescentes de sacarose (10%, 20% e 30%) em temperatura ambiente e depois mantidos na solução a 30% até o momento da criomicrotomia.

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

3.6 Coloração com hematoxilina e eosina (H&E)

A fim de identificar e avaliar a estrutura tecidual do segmento lombar L5, foi utilizada a técnica de coloração por hematoxilina e eosina. Para essa coloração, as lâminas com as secções histológicas de medula espinhal foram inicialmente imersas em água destilada mantendo-as por 5 minutos. Após esse período, as lâminas foram imersas em hematoxilina de Harris por 30 segundos e lavadas em água destilada corrente posteriormente.

Em seguida, as lâminas foram imersas em eosina por mais 30 segundos e então lavadas em água destilada corrente. Após esse último passo, as lâminas foram imersas em álcool 70% e por fim montadas em Permount® (Fisher Scientific, New Jersey, USA). Um microscópio de luz transmitida (Nikon, Eclipse E800 Yokohama, Japan) com câmera digital (Nikon, DXM 1200, Japan) acoplada foi usado para análise histológica e captura das imagens.

3.7 Imunohistoquímica

Foi realizada imunohistoquímica para expressão de GFAP e IBA-1, afim de se avaliar a reatividade glial de astrócitos e micróglia respectivamente, nas amostras coletadas em 7 e 14 dias após a indução de ruptura total do tendão. As amostras foram incubadas em peróxido de hidrogênio (3%- por 20 min) seguida de lavagem com PBS, posteriormente foram incubadas com anticorpo primário *overnight* (GFAP/ Mouse – Sigma; IBA-1 AIF1 – Merkmilipore) ambos diluídos em solução bloqueio (3% BSA, 0,3% Triton em PBS e soro de mouse ou horse respectivamente) nas titulações de 1:1000 (GFAP) e 1:200 (IBA-1).

Após lavagem, os cortes foram incubados com anticorpo secundário diluída em solução bloqueio (Goat anti-mouse-Sigma ou Mouse anti-horse - Sigma). Por fim, as amostras foram incubadas com complexo avidina-biotina (ABC) e revelado com DAB. As lâminas então foram montadas em Entelan e posteriormente visualizadas em microscópio de campo claro (Nikon, Eclipse E800 Yokohama, Japan).

3.8 Imunofluorescência

Para avaliar o potencial neuroinflamatório foi realizada imunomarcção das enzimas óxido nítrico sintase tipo 2 (NOS-2) e ciclooxigenase 2 (COX-2), nas amostras coletadas no 7º e 14º dia pós lesão, as quais foram incubadas em solução de bloqueio de sítios inespecíficos (1% BSA, 0,25%, DMSO 10%, Glicina 0.3 M Triton X-100 em PBS filtrado, pH 7,4) por duas horas. Posteriormente as amostras foram lavadas 3 vezes com PBS e então incubadas *overnight* com os anticorpos primário anti-NOS-2/rabbit -Santa Cruz Biotechnology ou anti-COX-2 SAB42 Sigma-Aldrich (concentração 1:200). No dia seguinte as amostras foram lavadas com PBS por 3 vezes e incubadas com anticorpo secundário (Alexa Fluor 488 ou Alexa Fluor 594-Santa Cruz Biotechnology, para NOS-2 E COX-2, respectivamente) na concentração de 1:1000 por 2 horas. Para a marcação dos núcleos celulares

foi utilizado o marcador DAPI (4',6Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride-1:10.000) por 2 minutos. Sequencialmente as amostras foram lavadas com água destilada e montadas em lâminas contendo 20µl de N-propil-galato, posteriormente foram visualizadas e fotomicrografadas em microscópio de fluorescência (Nikon, Eclipse E800 Yokohama, Japan) com os filtros adequados e com a lente objetiva de 20x para análise de possíveis marcações.

3.9 Quantificação da reatividade glial

A quantificação da reatividade glial, revelada por imuno-histoquímica (GFAP e IBA-1), foi realizada no software ImageJ® através da ferramenta de contagem manual. Foram utilizadas 4 fotomicrografias de cada campo (1.530 mm²) correspondente aos cornos ventrais e dorsais direito e esquerdo do segmento lombar L5.

A medula espinhal então foi identificada e demarcada e as células imunorreativas para GFAP e IBA-1 presentes nos cornos dorsal e ventral, bem como no lado ipsilateral e contralateral da lesão foram quantificadas. Os dados foram expressos em média e desvio padrão.

3.10 Dosagem de nitrito

A produção de óxido nítrico na medula espinhal L5 foi mensurada por determinação dos níveis de nitrito, de acordo com o protocolo descrito por Darmani et al. A intumescência lombar do grupo controle foi fragmentada manualmente juntamente com solução de PBS (10x o volume do tecido) para homogeneização. O homogeneizado foi centrifugado e 700µl do sobrenadante foi utilizado para o ensaio colorimétrico de dosagem de nitrito através do reagente de Griess (naftleno a 0.1%, diluído em água deionizada e sulfanilamida a 1%, diluída em ácido fosfórico a 5%), no qual, foi adicionado a amostra na mesma proporção (1:1) em duplicata (GREEN et al., 1982).

Os valores de absorvância foram mensurados por espectrofotometria utilizando um leitor de microplaca (Biotek ELX-800) com comprimento de

onda de 540nm. A concentração de nitrito das amostras foi calculada com base nos valores de absorvância obtidos de uma curva padrão de nitrito com concentrações conhecidas (0-50 μ M) e posteriormente corrigidas pela concentração de proteínas contida na amostra.

3.11 Teste comportamental de sensibilidade mecânica (Von Frey)

A hiperalgesia dos animais foi avaliada através do teste de von Frey. O protocolo utilizado no presente estudo foi realizado adaptado de Chaplan et al., 1994. Os animais foram colocados em um aparato retangular (50 cm x 35 cm) em um piso de malha perfurada (5mm² de diâmetro) elevada 25 cm do solo. O limiar de retirada da pata traseira foi determinado usando os filamentos de von Frey que variam de 0,05 a 10 g (figura 6). Os testes para os grupos controle e grupo ruptura começaram após 5 minutos de habituação.

A região plantar da pata traseira (figura 6-B) ipsilateral à ruptura tendínea dos camundongos foi estimulada com uma série de filamentos graduados progressivamente (0,05-10 g) os quais foram aplicados à superfície plantar por 5-6 s para cada filamento. Cada filamento foi aplicado 10 vezes e o valor mínimo que causou pelo menos 3 respostas foram registradas como limiares de retirada da pata (PWT). Retirada aguda, mordida, lambida ou sacudida do membro posterior ipsilateral e vocalização foram considerados sinais positivos de retirada. A média desses valores foi utilizada para análise dos dados. O limiar de retirada foi determinado para cada animal antes da cirurgia, 7 e 14 dias após a cirurgia em grupos independentes. Todo o procedimento experimental foi realizado como um teste cego, de modo que o experimentador não estava ciente do grupo (controle ou ruptura) que estavam sendo testados.

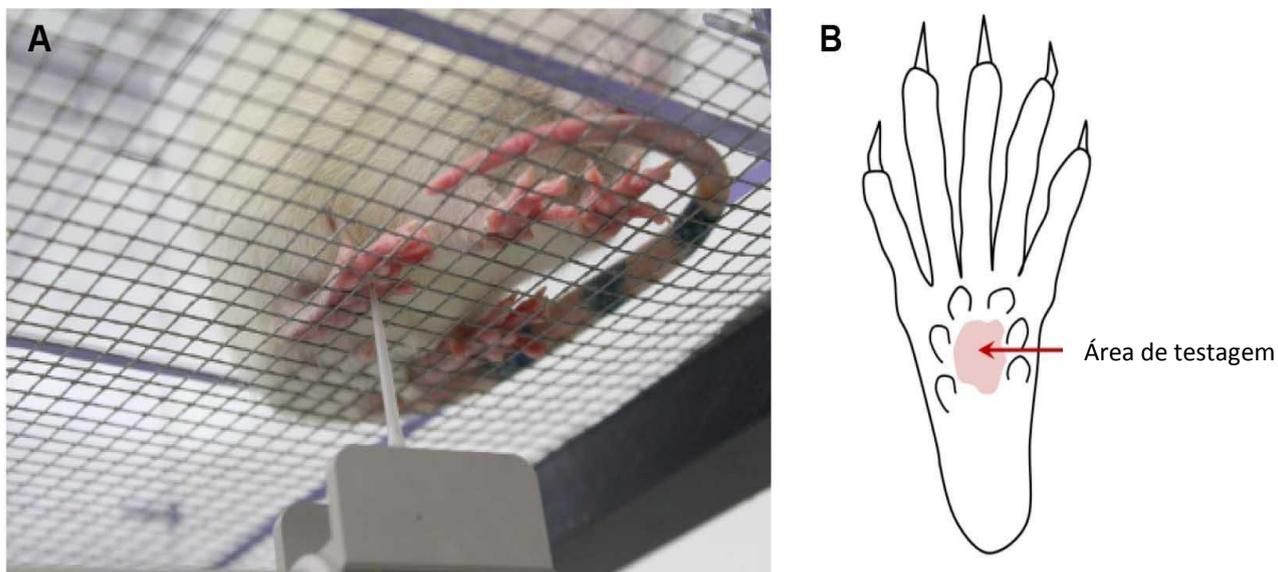


Figura 6: Figura esquemática representando o aparato de adaptação e teste do teste de von Frey. **A** – Animal sob a malha perfurada. **B** – Desenho representativo da pata traseira e do local de aplicação dos filamentos. Adaptada de bio-protocol.org.

3.12 Análise estatística

Foram utilizados para análise dos dados de contagem de células (imunohistoquímica) e de testes comportamentais o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Os dados foram expressos em média e desvio padrão e a diferença entre os grupos controle e rompido foi avaliada pelo teste ANOVA one-way seguido de testes post-hoc de Tukey. Para os dados comportamentais, foi realizado o teste de ANOVA de duas vias seguido de post-hoc de Tukey. As análises estatísticas foram feitas com BioStat 5.0 e $p \leq 0,05$ foi considerado significativo.

4. RESULTADOS

4.1 A RUPTURA TOTAL DO TENDÃO DE AQUILES REDUZ O LIMIAR NOCICEPTIVO MECÂNICO DE CAMUNDONGOS.

Para avaliar a resposta nociceptiva dos camundongos após a ruptura utilizamos o teste de von Frey, determinado pelo limiar de retirada da pata (PWT). Conforme demonstrado na figura 7 os animais submetidos à tenotomia total do tendão de Aquiles apresentaram diminuição significativa nos valores de PWT para a pata ipsilateral ($0,05 \pm 0,18$ g) quando comparados ao grupo controle ($3,5 \pm 1,0$ g) no 7º dia pós-lesão.

Resultados semelhantes foram observados no 14º dia pós ruptura, o grupo ruptura apresentou valores reduzidos de PWT ($0,1 \pm 0,07$ g) em relação ao grupo controle ($3,3 \pm 1,1$ g). O teste de linha de base não demonstrou diferença significativa entre os animais antes dos procedimentos experimentais. Os resultados demonstram que todos os animais submetidos a ruptura apresentam alteração na sensibilidade mecânica em ambos dias de análise.

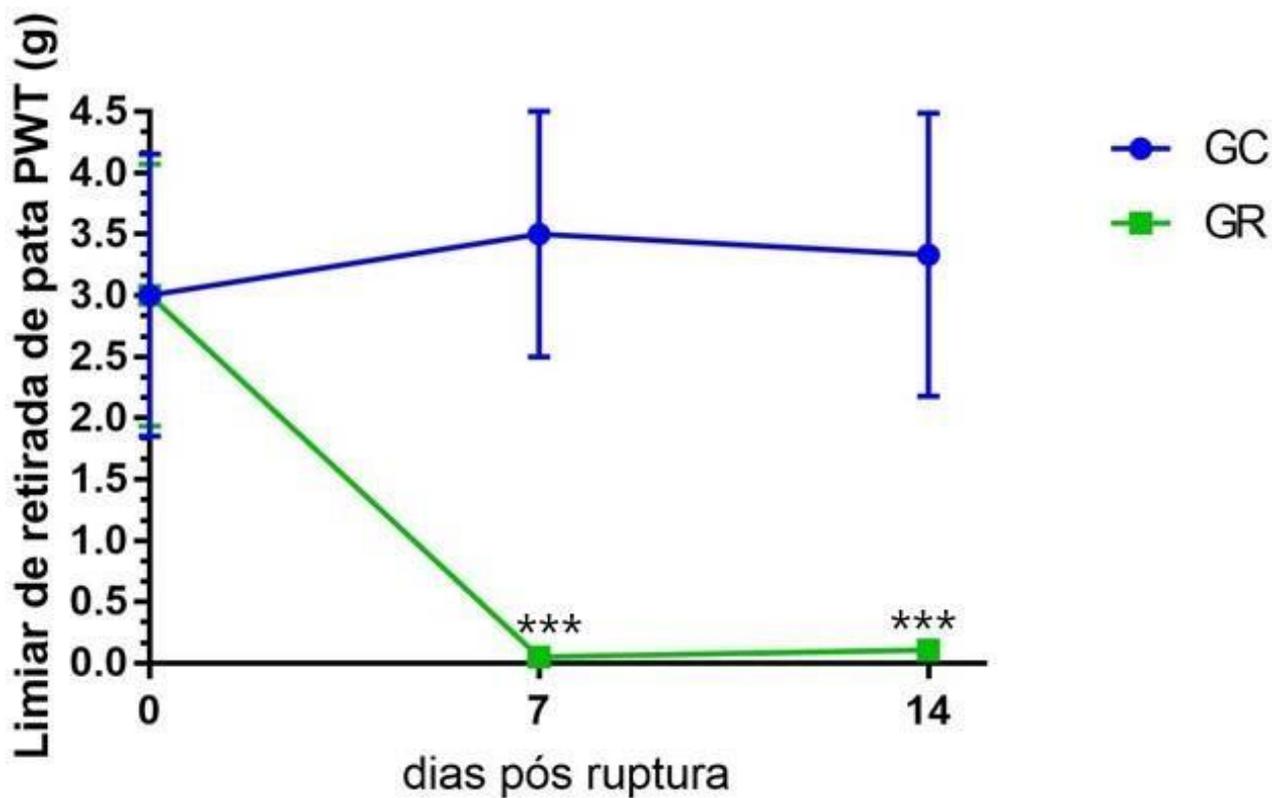


Figura 7: Efeitos da ruptura do tendão de Aquiles no limiar nociceptivo mecânico. Grupo controle (GC) e grupo ruptura (GR) analisados em 0 antes da cirurgia, 7º e 14º dias pós tenotomia do tendão de Aquiles. Os dados são apresentados como média \pm DP. *** Diferença significativa ($P < 0,01$) entre GC versus GR, $n=4$ /grupo, avaliada pelo teste ANOVA two-way seguido de comparações post hoc de Tukey.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA POR H&E

Com o objetivo de caracterizar o tecido foi realizado histoquímica para hematoxilina e eosina na medula de animais do grupo controle sem nenhum tipo de intervenção, afim de confirmar o local de análise correspondente ao segmento lombar.

Na figura 8A, é possível visualizar a configuração do nível L5 da medula espinhal, onde estão os neurônios que recebem aferências do tendão de Aquiles, com nítida delimitação da substância branca (2) e substância cinzenta (1); e dos cornos ventrais (V) e cornos dorsais (D). Em maior aumento (40x- figura 8B), vemos as características histológicas da substância branca (2) constituída por células gliais, e da substância cinzenta (1) contendo corpos de neurônios (indicado pela seta). Notar a preservação e integridade das principais estruturas da medula espinhal, a qual também será usada para imunofluorescência e imunohistoquímica.

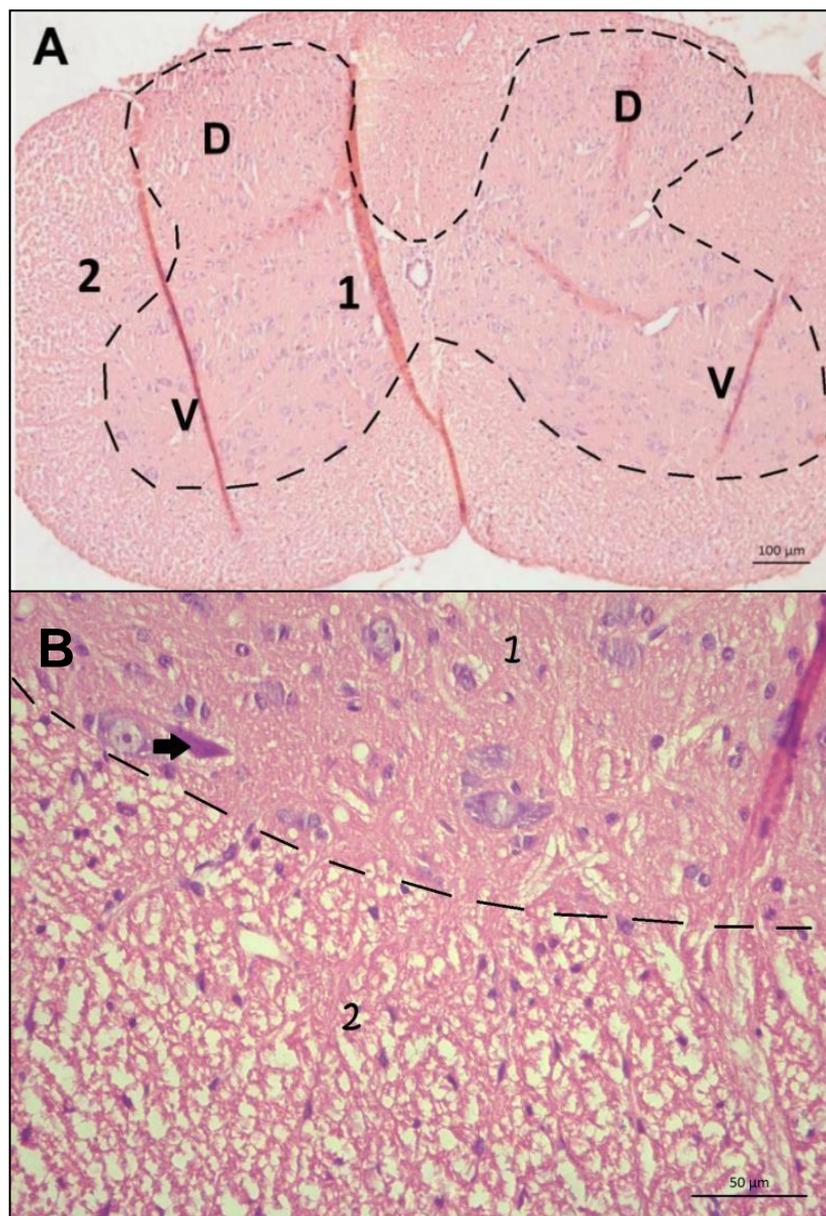


Figura 8. Histoquímica para hematoxilina & eosina em cortes transversais da medula espinhal de camundongos no segmento L5. Espessura de 10 µm e barra de escala de 100 µm (A) e 50µm (B). A e B: 1 – substância cinzenta, 2 – substância branca. D: cornos dorsais; V: cornos ventrais. Seta indica um corpo de neurônio.

4.3 EFEITO DA RUPTURA DO TENDÃO DE AQUILES NA ATIVAÇÃO DE ASTRÓCITOS NO SEGMENTO L5 DA MEDULA ESPINHAL.

Para avaliar a reatividade de astrócitos na medula espinhal utilizamos o anticorpo anti-GFAP. A análise de imunomarcção na medula espinhal L5 mostra uma coloração pouco notável para a proteína GFAP no grupo controle (Figura 9).

Contudo, nas análises do grupo ruptura em apenas uma semana (dia 7) após a ruptura do tendão de Aquiles, ocorreu uma intensa reatividade astrocitária que pode ser vista em maior quantidade nos cornos ventral e dorsal do lado ipsilateral a lesão e em menor expressão nos cornos ventral e dorsal do lado contralateral a lesão. Os quadros à esquerda de cada fotomicrografia mostram em maior aumento as células reativas. Ao avaliarmos o segmento L5 da medula espinhal em 14 dias após a lesão, também identificamos astrócitos reativos em todos os cornos investigados, quando comparado ao dia 7 observa-se que esta imunomarcção já está diminuída, porém ainda bem evidente quando comparado ao grupo controle.

Este fenômeno pode ser evidenciado no gráfico da figura 9B, que demonstra quantitativamente que os animais com tendão rompido apresentam um número aumentado de células GFAP positivas no 7º ($n= 910 \pm 29$ células/ μm^2) e 14º ($n= 860 \pm 20$ células/ μm^2) dias pós-ruptura quando comparado ao grupo controle ($n= 412 \pm 54$ células/ μm^2).

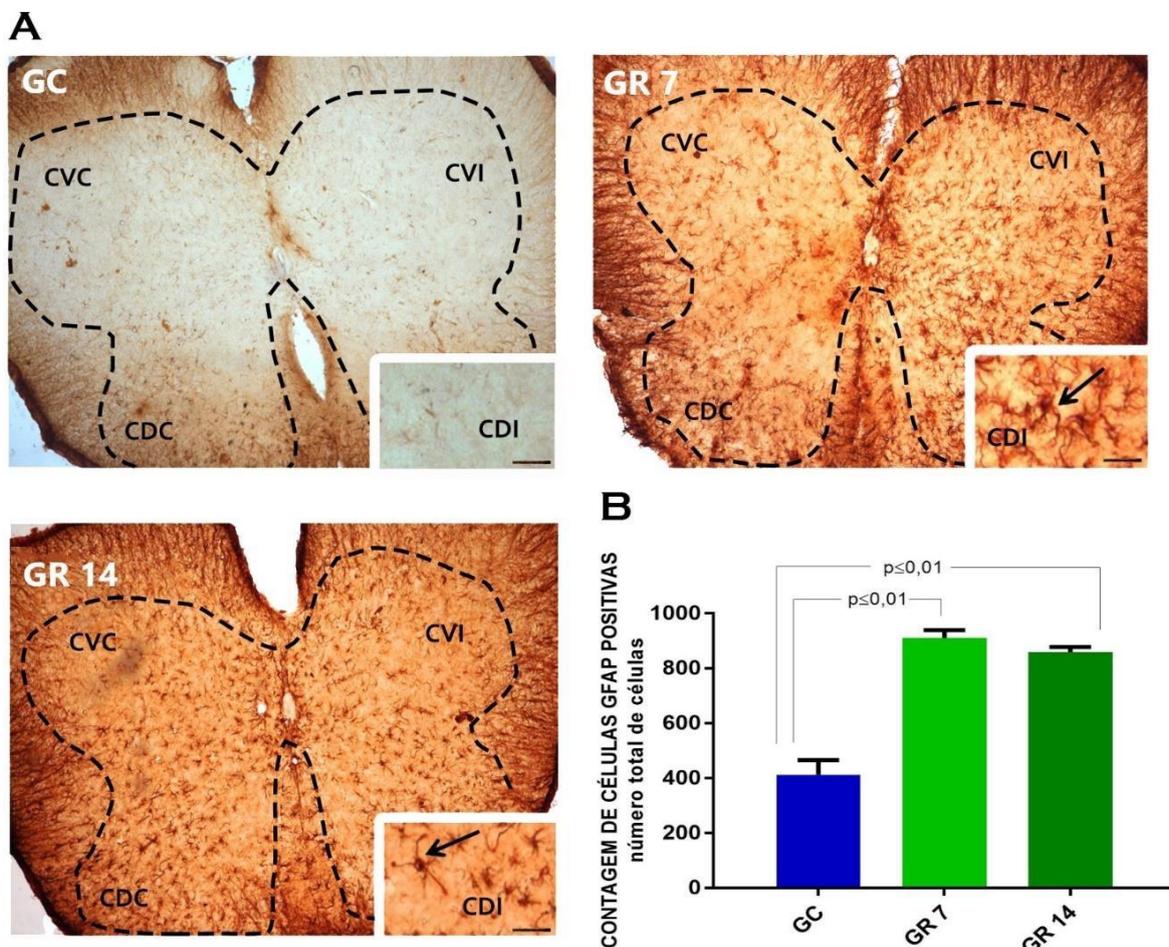


Figura 9: Efeitos da ruptura do tendão de Aquiles na reatividade dos astrócitos da medula espinhal. A- Imunohistquímica para GFAP de cortes transversais de medula espinhal de camundongos (segmento L5) no 7^o e 14^o dias pós tenotomia do tendão de Aquiles (dpt). GC grupo controle, GR 7 grupo ruptura analisado no 7^o dpt. GR 14 analisado 14^o dpt. **B-** Contagem de células positivas para GFAP na medula espinhal L5. Os dados são apresentados como média±SD, $p < 0,01$, $n=3$ /grupo, avaliados por ANOVA one-way seguido de comparações post hoc de Tukey. CVC- corno ventral contralateral, CVI- corno ventral ipsilateral, CDC- corno dorsal contralateral e CDI- corno dorsal ipsilateral. As setas pretas nas imagens ampliadas mostram forte astrogliose no corno dorsal do lado ipsilateral à lesão. Barra de escala = 100 μ m

4.4 EFEITO DA RUPTURA DO TENDÃO DE AQUILES NA ATIVAÇÃO DE MICRÓGLIA NO SEGMENTO L5 DA MEDULA ESPINHAL.

Semelhante aos achados encontrados para marcação de astrócitos, na marcação para micróglia (anti-iba1) houve pouca, quase ausente imunorreatividade em condições que o tendão de Aquiles está íntegro (grupo controle).

As análises do grupo ruptura após 7 dias de tenotomia demonstraram células imunorreativas, com diferença estatística ($p < 0,01$) quando comparada ao grupo controle (controle = $20 \pm 2,7$ células/ μm^2 vs grupo ruptura 7 = $100,5 \pm 3,53$ células/ μm^2), indicando desta forma que, decorrido uma semana após ruptura do tendão calcâneo, há ativação microglial na medula espinhal, de forma discreta quando comparado ao 14º dia de análise. Na análise do 14º dia após a ruptura do tendão de Aquiles verificamos a ocorrência de intensa ativação microglial, estando estas presente em todos os cornos avaliados, conforme evidenciado na figura 10B, o aumento do número de células positivas para IBA-1 foi observado no 14º dia após a ruptura (controle = $20 \pm 2,7$ células/ μm^2 vs grupo ruptura 14 = $158,75 \pm 35,5$ células/ μm^2).

Importante notar que a imunomarcção apresenta característica de micróglia ativadas de fenótipo pró-inflamatório (formato amebóide e ramificações espessas, como mostrado na figura 10 . Para melhor visualização, os quadros a esquerda mostram em maior aumento o formato das células reativas.

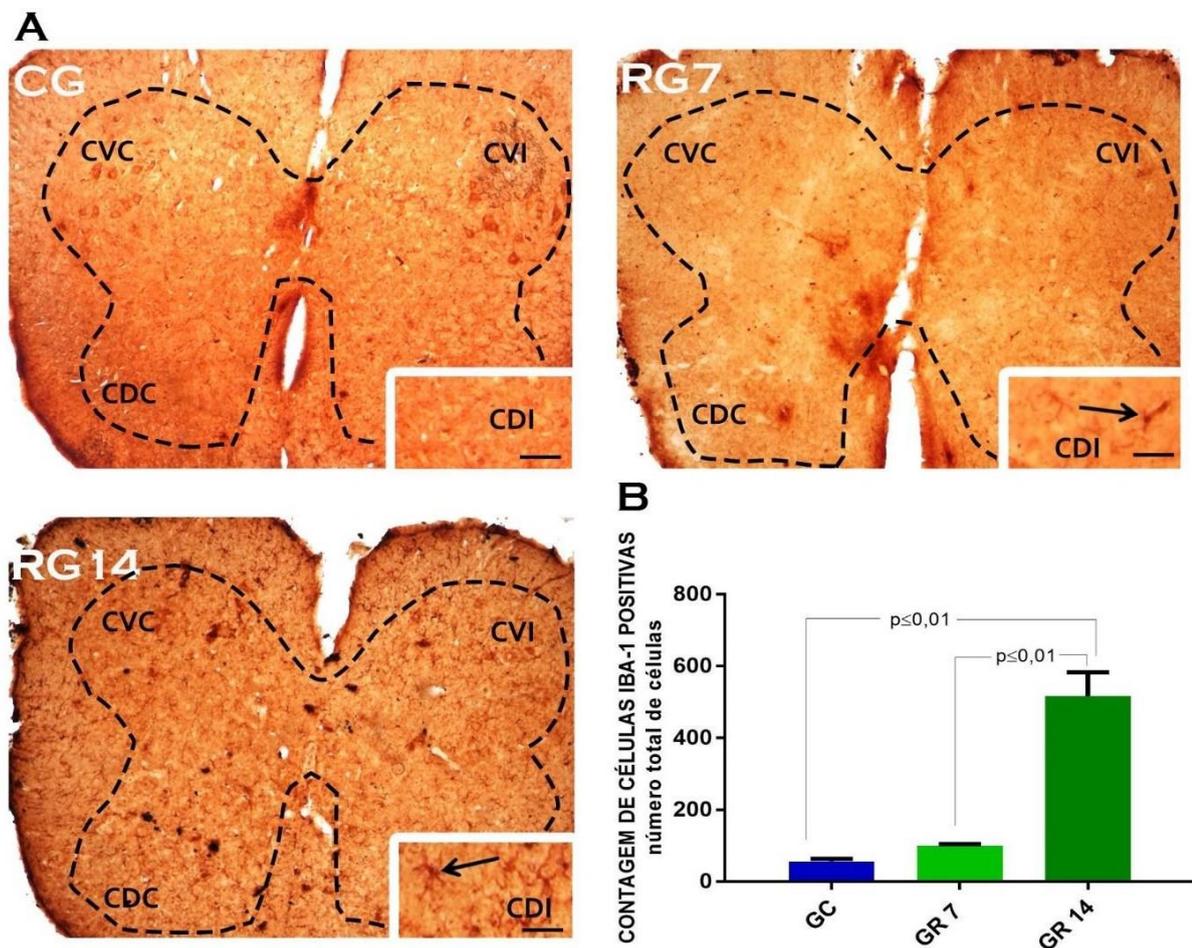


Figura 10: Efeitos da ruptura do tendão de Aquiles na reatividade microglial da medula espinhal. A- imunohistoquímica para IBA-1 de cortes transversais de medula espinhal de camundongos (segmento L5) no 7º e 14º dias pós tenotomia do tendão de Aquiles (dpt). GC grupo controle, GR 7 grupo ruptura analisado no 7º dpt. GR 14 analisado no 14º dpt. **B-** Contagem de células IBA-1 positiva na medula espinhal L5. Os dados são apresentados como média \pm SD, $p < 0,01$, $n=3$ /grupo, avaliados por ANOVA one-way seguido de comparações post hoc de Tukey. CVC- corno ventral contralateral, CVI- corno ventral ipsilateral, CDC- corno dorsal contralateral e CDI- corno dorsal ipsilateral. As setas pretas nas imagens ampliadas mostram forte microgliose no corno dorsal do lado ipsilateral à lesão, principalmente no GR 14. Barra de escala = 100 μ m

4.5 ANÁLISE DO NÚMERO DE CÉLULAS GFAP E IBA-1 POSITIVAS NOS CORNOS DORSAIS DA MEDULA ESPINHAL (L5) DE CAMUNDONGOS APÓS TENOTOMIA.

Afim de se avaliar o padrão de ativação de astrócitos e micróglia, foi realizado a contagem de células GFAP e IBA1 positivas dos cornos dorsais no segmento L5, nos lados ipsilateral e contralateral à ruptura do tendão.

As análises para GFAP (figura 11- gráfico A) demonstraram haver diferença significativa ($p < 0.01$) na quantidade de células positivas, exclusivamente no grupo ruptura no sétimo dia de análise, entre os cornos dorsais ipsilateral (305 ± 49.4) vs contralateral (183 ± 14.1) à ruptura. Não houve diferença entre os lados nos grupos controle (ipsilateral = 161 ± 16.9 vs contralateral = 149 ± 14.8) e Ruptura14 (ipsilateral = 218 ± 26.5 vs contralateral = 204 ± 11.3).

Por outro lado, as análises para IBA-1 (Figura 11- gráfico B) demonstraram haver diferença significativa ($p < 0.01$) na quantidade de células positivas no grupo ruptura no 7º dia de análise entre os corno dorsal ipsilateral (39 ± 1.4) quando comparado ao corno dorsal contralateral (18.5 ± 3.5). E também no 14º dia de análise, entre os corno dorsal ipsilateral ($178,5 \pm 17,6$) quando comparado ao corno dorsal contralateral ($104 \pm 5,6$).

Observamos então, que após a ruptura do tendão de Aquiles, ocorre ativação de astrócitos e micróglia em ambos cornos dorsais. No entanto, o padrão de ativação glial na medula espinhal (L5) ocorre majoritariamente no corno dorsal ipsilateral à ruptura.

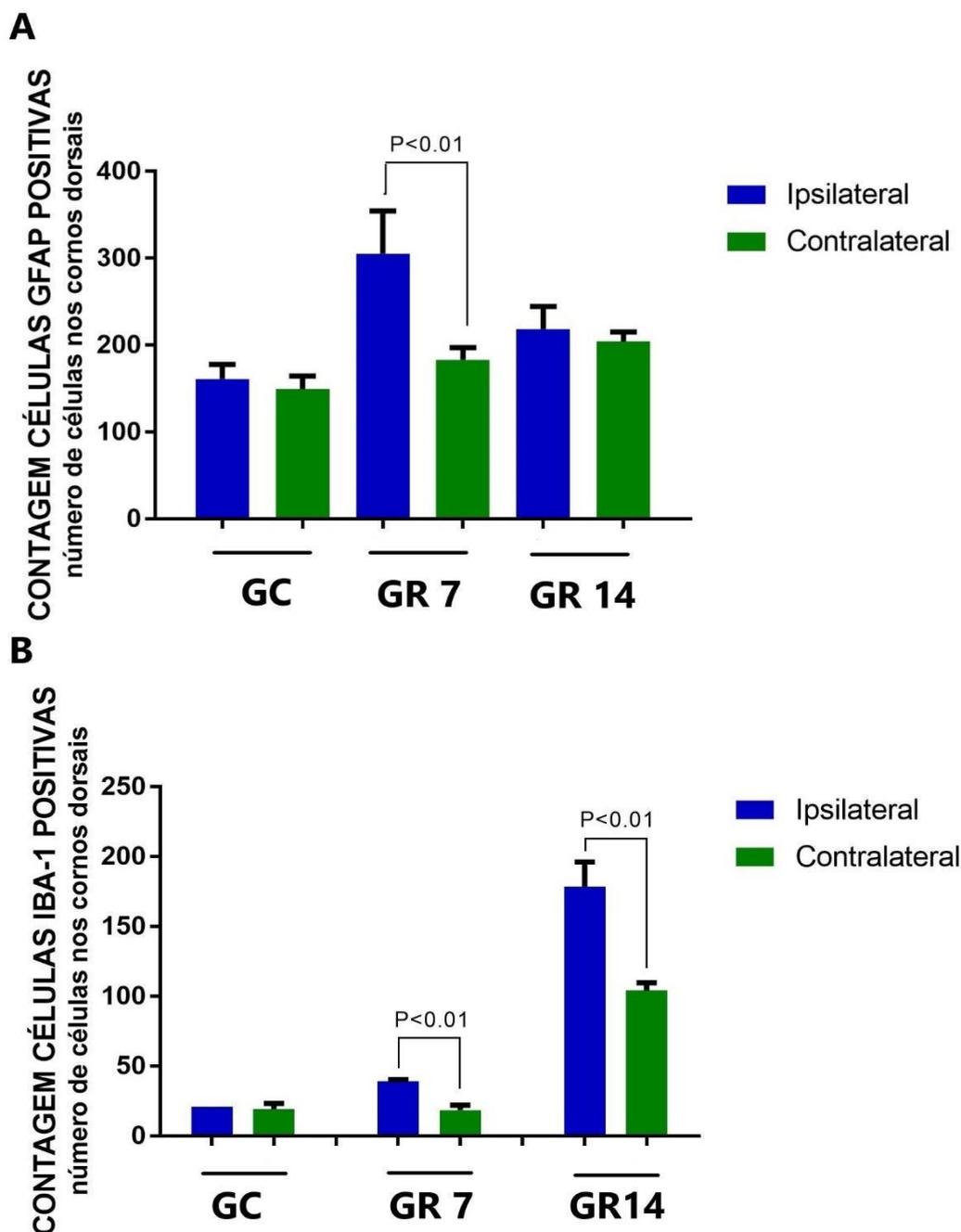


Figura 11: Efeitos da ruptura do tendão de Aquiles na reatividade glial nos cornos dorsais lados ipsilateral e contralateral à ruptura. A- Contagem de células GFAP positivas apenas nos cornos dorsais da medula espinal L5. **B-** Contagem de células IBA-1 positiva apenas nos cornos dorsais da medula espinal L5. Os dados são apresentados como média \pm SD, $p < 0.01$, $n = 3$ /grupo, avaliados por ANOVA de uma via seguida de comparações post hoc de Tukey.

4.6 EFEITOS DA RUPTURA DO TENDÃO DE AQUILES NA ATIVAÇÃO INFLAMATÓRIA DO SNC: EXPRESSÃO DE COX-2 E NOS-2 NO SEGMENTO L5 DA MEDULA ESPINHAL.

Para avaliar se a ativação glial na medula espinhal L5 do grupo tenotomizado está associada à expressão de proteínas mediadoras da resposta inflamatória, foi analisada a imunofluorescência para as proteínas COX-2 e NOS-2, conforme descrito.

Conforme observado na figura 12, nenhuma coloração para COX-2 foi encontrada na medula espinhal L5 de animais tenotomizados no 7º dia após a lesão. No entanto, a ruptura do tendão de Aquiles induziu expressão intensa de COX-2 na medula espinhal no 14º dia de análise (Figura 12).

Da mesma forma, não foram identificadas nenhuma marcação para expressão de NOS-2 nos grupos controle e ruptura no 7º dia de análise em L5. Porém foi detectada expressiva marcação de NOS-2 no 14º dia pós-rotura (Figura 13).

A imunorreatividade desses mediadores inflamatórios (NOS-2 e COX-2), apresentaram padrões semelhantes de marcação, que se concentram em maior parte nos cornos dorsais da medula espinhal. Entretanto, também observamos marcação nos cornos ventrais ipsilateral e contralateral à ruptura do tendão.

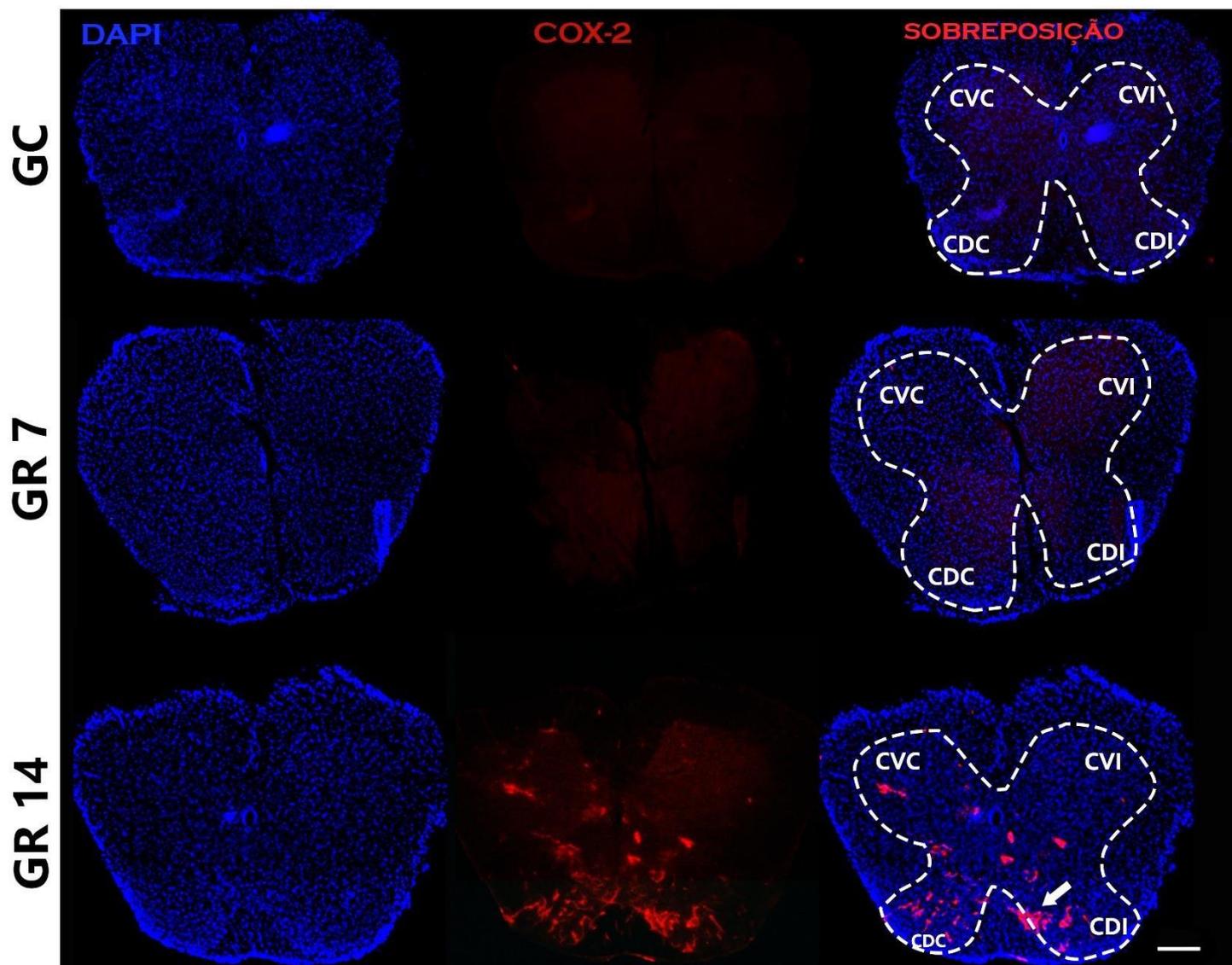


Figura 12: Resposta inflamatória na medula espinhal induzida pela ruptura do tendão de Aquiles: Expressão de COX-2. Imunofluorescência para COX-2 de cortes transversais de medula espinhal de camundongos (segmento L5) no 7^o e 14^o dias pós tenotomia do tendão de Aquiles (dpt). **GC** grupo controle, **GR 7** grupo ruptura analisado no 7^o dpt. **GR 14** grupo ruptura analisado no 14^o dpt. Os núcleos das células foram corados com DAPI. CVC- corno ventral contralateral, CVI- corno ventral ipsilateral, CDC- corno dorsal contralateral e CDI- corno dorsal ipsilateral. A seta branca mostra forte reatividade no corno dorsal do lado ipsilateral à lesão. n=6/grupo. Barra de escala = 100µm.

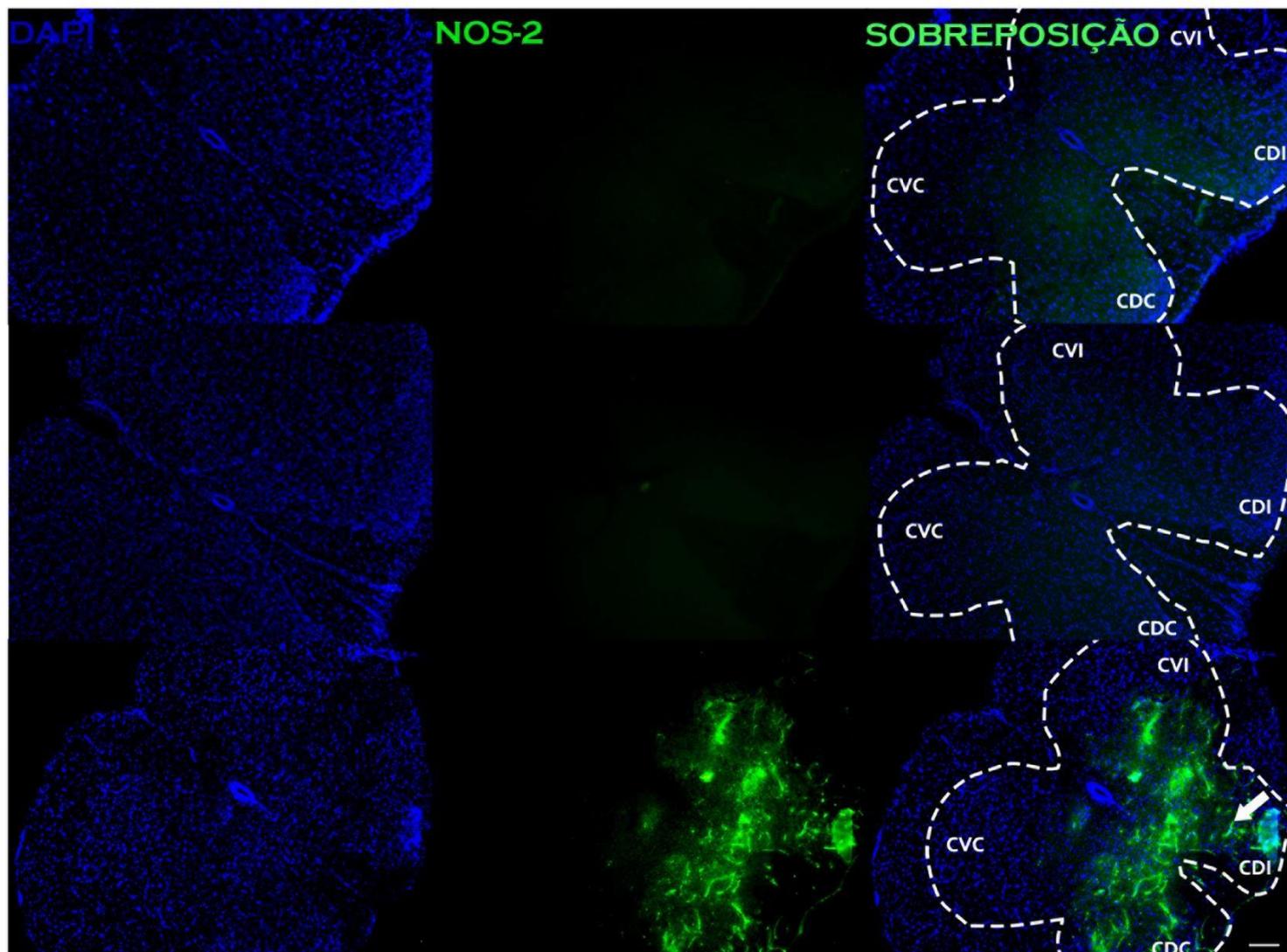


Figura 13: Resposta inflamatória na medula espinhal induzida pela ruptura do tendão de Aquiles: Expressão de NOS-2. Imunofluorescência para NOS-2 de cortes transversais de medula espinhal de camundongos (segmento L5) no 7º e 14º dias pós tenotomia do tendão de Aquiles (dpt). **GC** grupo controle, **GR 7** grupo ruptura analisado no 7º dpt. **GR 14** grupo ruptura analisado no 14º dpt. Os núcleos das células foram corados com DAPI. CVC- cornu ventral contralateral, CVI- cornu ventral ipsilateral, CDC- cornu dorsal contralateral e CDI- cornu dorsal ipsilateral. A seta branca mostra forte reatividade no cornu dorsal do lado ipsilateral à lesão. n=6/grupo. Barra de escala = 100µm

4.7 EFEITOS DA RUPTURA DO TENDÃO DE AQUILES NOS NÍVEIS DE NITRITO NA MEDULA ESPINHAL DE CAMUNDONGOS.

Realizamos esta análise bioquímica afim de investigar evidências da presença de óxido nítrico na medula espinhal (segmento lombar), frente a ocorrência de ruptura total do tendão de Aquiles, através da quantificação dos níveis de nitrito por espectrofotometria em 7 e 14 dias após a lesão no tendão do grupo ruptura.

Observamos que em 7 dias após a lesão os níveis de nitrito do grupo Ruptura ($0,0004 \pm 10,8 \times 10^{-5}$) foi significativamente ($p < 0,01$) mais alto se comparado ao grupo controle ($0,0002 \pm 3,45 \times 10^{-5}$) (Figura 14).

A análise realizada 14 dias após a lesão demonstrou um aumento estatisticamente significativo nos níveis de nitrito do grupo Ruptura ($0,0006 \pm 1,06 \times 10^{-5}$) em relação ao grupo controle ($p < 0,01$) e em relação aos resultados observados no dia 7 para este mesmo grupo.

Dessa forma, identificamos a presença de níveis elevados de nitrito na medula espinhal no grupo Ruptura no sétimo e, em maior quantidade, no décimo quarto dia de análise em camundongos submetidos a ruptura do tendão de Aquiles.

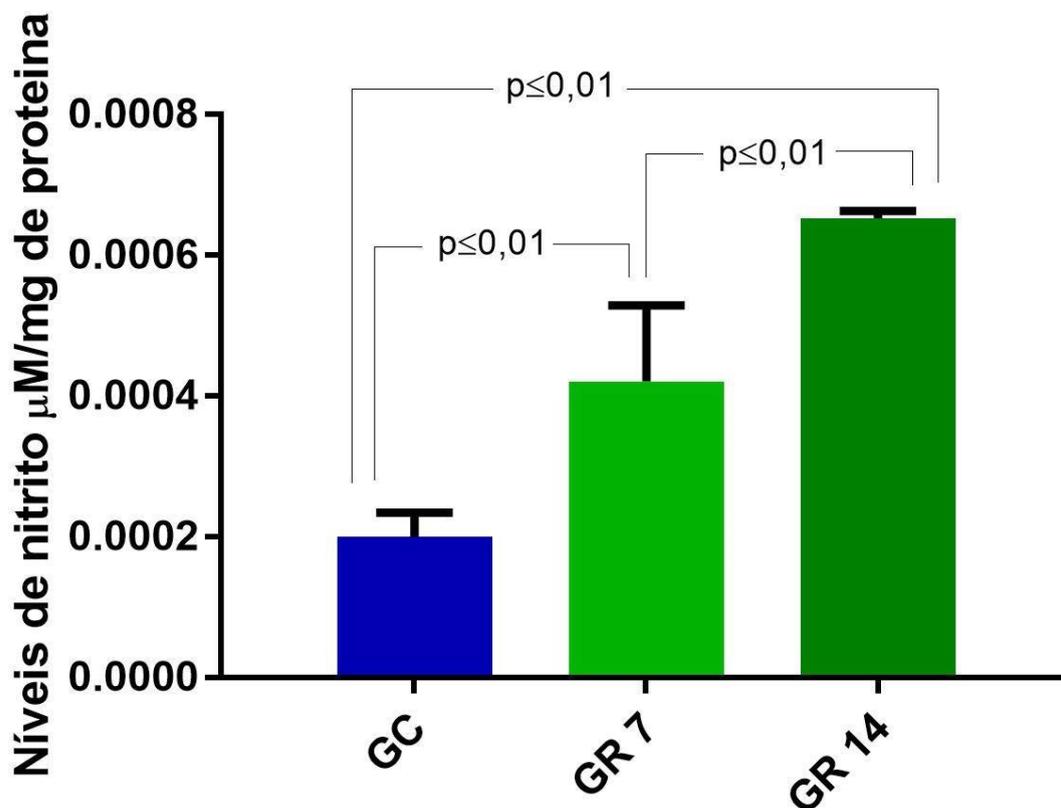


Figura 14: Efeito da ruptura do tendão nos níveis de nitrito no SNC de camundongos tenotomizados. Quantificação de nitrito da medula espinhal no 7º e 14º dias pós tenotomia do tendão de Aquiles (dpt). **GC** grupo controle, **GR 7** grupo ruptura analisado no 7º dpt. **GR 14** analisado no 14º dpt. A intumescência lombar foi removida para avaliar os níveis de nitrito no tecido pelo método de Griess. Os dados são apresentados como média \pm SD, $*p < 0,01$, $n = 5-6/\text{grupo}$, avaliados por ANOVA de uma via seguida por comparações post hoc de Tukey.

5. DISCUSSÃO

Embora seja amplamente descrito que a tendinopatia do tendão de Aquiles é caracterizada por gerar um quadro de dor aguda e crônica em sujeitos lesionados, há poucos dados na literatura investigando os efeitos da lesão de tendões no sistema nervoso central (SILBERNAGEL *et al*, 2006; YANG *et al*, 2008; ANDERSON *et al*, 2011; MENDES *et al*, 2021). O presente estudo demonstrou pela primeira vez que a ruptura total do tendão de Aquiles induz resposta neuroinflamatória associada a ativação glial na medula espinhal (L5) de camundongos.

Conforme descrito anteriormente, a ruptura do tendão de Aquiles desencadeia uma ativação *in loco* da resposta inflamatória caracterizada por intensa inervação, angiogênese local e liberação de neuropeptídeos (ANDERSON *et al*, 2010; ACKERMANN *et al*, 2002; PUFE *et al*, 2005). Eventos esses que geram uma redução do limiar nociceptivo, através da ativação de nociceptores aferentes. Demostramos através do teste de sensibilidade mecânica diminuição significativa do limiar nociceptivo na pata ipsilateral à ruptura do tendão, que se manteve até o 14º dia pós ruptura. Confirmando que todos os animais submetidos a lesão apresentaram comportamento compatível com hiperalgesia.

Diversos tipos de células não neuronais podem influenciar na nocicepção, incluindo células imunes, epiteliais, mesenquimais e células da glia (HANISCH; KETTENMANN, 2007; JI *et al*, 2016). Nossos dados demonstraram a ativação de astrócitos na medula espinhal (L5) em resposta a lesão do tendão de Aquiles, dado este, que se assemelha ao já reportado na literatura em lesões nervosas periféricas que demonstram a expressão de astrócitos conjuntamente a expressão de micróglia, acreditando-se haver um caminho direto de comunicação entre esses dois tipos de células gliais para coordenar seus padrões temporais de ativação (SCHOLZ; WOOLF, 2005; XU *et al.*, 2016; ADÃES *et al.*, 2017).

Wang *et al.* (2009), em um modelo de lesão nervosa reportou o aumento da expressão de GFAP na medula espinhal, associado a redução do limiar nociceptivo. Além disso, um estudo recente de tendinopatia demonstrou que a sensibilidade mecânica e a piora na locomoção provocadas pela lesão do tendão de Aquiles estão associadas ao aumento da expressão de GFAP na medula de ratos (MENDES *et al.*, 2021).

Em nossos resultados, o padrão de expressão de GFAP foi tempo-dependente, onde observamos em 7 dpt intensa astrogliose, especialmente no lado ipsilateral à ruptura do tendão. Em 14 dpt houve uma redução no número de células GFAP positivas, no entanto ainda presente e com seu formato celular com muitas ramificações espessas, semelhante a achados de lesões provenientes de nervo periférico (GARRISON *et al.*, 1991; YANG *et al.*, 2017). Neste mesmo modelo de lesão é descrito a relação da ativação dos astrócitos com a expressão e liberação da quimiocina CCL2, por neurônios. Essa quimiocina é conhecida por recrutar monócitos, células T de memória e células dendríticas para os locais de inflamação produzidos por lesão ou infecção tecidual, demonstrando que astrócitos tem potencial função na neuromodulação da resposta inflamatória (YANG *et al.*, 2017).

Além disso, após lesão nervosa, astrócitos perdem sua capacidade de manter as concentrações homeostáticas de potássio extracelular (K⁺) e glutamato, levando à hiperexcitabilidade neuronal (JI *et al.*, 2016). Em nossos resultados, a evidente marcação de GFAP no corno dorsal de L5 sustenta a hipótese de que estes astrócitos ativados podem estar envolvidos na modulação da transmissão sináptica de neurônios sensoriais.

Adicionalmente, a imunorreatividade de micróglia foi investigada pela expressão de IBA-1, demonstrando que 14 dias após a ruptura do tendão as micróglia são ativadas na medula espinhal (L5), apresentando clássico fenótipo de micróglia reativa, com corpos celulares arredondados e ramificações retraídas e espessas. A depender dos fatores que a estimulam esse fenótipo pode adotar um perfil anti-inflamatório e neuroprotetor (micróglia M2) ou pró inflamatório e citotóxico (micróglia M1) (HANISCH; KETTENMANN, 2007). A micróglia M1 é caracterizada pela produção de fatores pró inflamatórios como a

IL-1, IL-1 β , IL-6, TNF- α , além da superprodução de óxido nítrico (ROMERO-SANDOVAL *et al*, 2008; HANISCH; KETTENMANN, 2007).

A participação das células gliais em lesões periféricas são atribuídas aos processos degenerativos neuronais e, no caso específico das micróglias, é atribuído um papel especial na sustentação da resposta inflamatória (DE LUCA *et al*, 2016; BUTOVSKY; WEINER, 2018). Assim como em nossos achados, estudos anteriores já descreveram a ativação de micróglias, com a imunomarcagem de IBA-1, tanto em lesão traumática da medula espinhal de humanos (SOMINSKY *et al*, 2018) como em modelo animal de lesão nervosa periférica (ZHOU *et al*, 2018). Ambas associando sua ativação com a exacerbação ou manutenção da resposta inflamatória.

Vários estudos sobre lesão nervosa periférica e lesão medular sugeriram que a reatividade de astrócitos ocorre secundária à reatividade microglial (ROMERO-SANDOVAL *et al*, 2008; PENG *et al*, 2016; SOMINSKY *et al*, 2018; ZHOU *et al*, 2018). Entretanto, em nosso modelo experimental de lesão tendínea foi identificado que ocorre o oposto, pois em 7 dias após a lesão é visto a ativação predominante dos astrócitos enquanto que somente em 14 dias após a lesão no tendão é que as micróglias foram ativadas de modo mais expressivo (SCHOLZ; WOOLF, 2005). Nesse sentido, já é descrito que a liberação de quimiocinas derivadas de astrócitos, como o ligante 2 de quimiocina (CCL2) além de atuar como um neuromodulador e potencializar a transmissão sináptica excitatória (JI *et al*, 2016), também funcionam como sinalizadores parácrinos para ativação de micróglia (CHEN *et al*, 2014). O que poderia justificar nossos achados onde a ativação microglial foi secundária a de astrócitos.

Em um estudo comparativo entre dois modelos de lesão aguda e crônica (incisão da pata e lesão do nervo L5), Romero-Sandoval *et al*, mostraram que o padrão de expressão glial é diferenciado em cada condição de lesão e divergente no curso temporal, sugerindo que o início e a intensidade da expressão de GFAP e IBA-1 nos cornos dorsais da medula espinhal estão relacionadas com a causa da lesão primária. Além disso, já é descrito que a intensidade e o tipo de estímulo inicial provocado, é o que irá determinar o padrão de ativação microglial, e suas respectivas respostas pró-inflamatória ou anti-inflamatória (HANISCH;

KETTENMANN, 2007). Nossos dados, juntamente com esses achados, mostram a natureza dinâmica e plástica das células gliais em condições patológicas, e que a reatividade glial pode apresentar padrões temporais distintos de expressão, dependendo da lesão inicial (ROMERO-SANDOVAL *et al*, 2008; PENG *et al*, 2016).

Nosso grupo mostrou que o aumento da reatividade dos astrócitos e micróglia na fase aguda (7dias) foi predominante no lado ipsilateral à ruptura do tendão. Demonstrando que essa ativação segue o padrão da via de sinalização nociceptiva na medula, que ocorre ipsilateral à lesão do membro, e cruza ao lado contralateral no mesmo segmento (LOESER, 2001). Em 14 dias pós ruptura a reatividade de micróglia se manteve ipsilateral, no entanto, a reatividade de astrócitos ocorreu em ambos os lados da medula espinhal no segmento L5. Em relação a esse achado, estudos anteriores que induziram uma monoartrite unilateral em ratos observaram um aumento na reatividade glial em ambos os lados dos cornos dorsais espinhais em 1, 3 e 10 dias pós a indução (SHAN *et al.*, 2007; SUN *et al.*, 2008). Nossos dados junto a estes sugerem que, em casos de lesão periférica, a reatividade de astrócitos ocorre desde a fase aguda, mas podem ou não seguir um padrão de expressão ipsilateral, devido à possibilidade de ativação de múltiplas vias sensoriais ascendentes, o que pode explicar nossos achados (BRESSAN *et al.*, 2010).

Nesse sentido, nossos resultados mostram evidências para sustentar a hipótese de que, no modelo de ruptura de tendão utilizado, a ativação espinhal (L5) de micróglia estão possivelmente envolvidas na manutenção, mas não no desenvolvimento inicial da hiperalgesia, sendo esta função inicial atribuída aos astrócitos.

A notável astrogliose e a ativação microglial dependente do tempo observadas em nossos resultados sugerem que a ruptura do tendão de Aquiles provoca a ativação de uma resposta neuroinflamatória na medula espinhal no segmento L5.

Os marcadores da neuroinflamação são a ativação e infiltração de leucócitos, ativação de células gliais e aumento da produção de mediadores inflamatórios (JI *et al*, 2016; XANTHOS; SANDKÜHLER, 2013). As interações

entre inflamação e dor são bidirecionais, neurônios sensoriais nociceptivos não apenas respondem a sinais imunológicos, mas também modulam diretamente a inflamação (XANTOS; SANDKÜHLER, 2013).

A resposta inflamatória na medula espinhal L5 induzida pela ruptura do tendão de Aquiles foi confirmada pela expressão *in loco* de COX-2 e NOS-2, ambas exclusivamente no 14º dia pós ruptura do tendão. Foi amplamente descrito na literatura que as expressões de COX-2 e NOS-2 estão intimamente relacionadas com a superprodução de prostaglandina E2 (PGE2) e óxido nítrico (NO), respectivamente, que são importantes mediadores inflamatórios (MCCLESKEY; GOLD, 2002; VANE *et al*, 2002, ABRAMSON *et al*, 2008).

A produção de PGE2 e NO também é evidenciada em diferentes tipos de lesão do sistema nervoso: na lesão medular em humanos (RESNICK *et al*, 2001) e na constrição nervosa periférica em modelo murino (NAIK *et al*, 2006). Também já é descrito que a inibição central da expressão de COX-2, reduz a produção de PGE2 nos cornos dorsais da medula espinhal, com concomitante redução da hipersensibilidade mecânica, em um modelo de lesão nervosa periférica em ratos (SAMAD *et al*, 2001). Além disso, no estudo de Naik, *et al*, a produção de nitrito e nitrato no local da lesão do nervo ciático foram relacionadas ao aumento do limiar nociceptivo. Estes estudos apontam uma estreita correlação entre esses mediadores inflamatórios e alterações na sensibilidade mecânica e consequentemente no desempenho motor.

Nossos resultados de imunofluorescência para NOS-2 também foram sustentados por achados bioquímicos que demonstraram elevação significativa dos níveis de nitrito na medula espinhal lombar, no 7º e 14º dia pós ruptura do tendão de Aquiles. Em condições semelhantes à de nosso modelo experimental já tem sido atribuído a produção imediata de NO via NOS2 na medula espinhal em consequência a indução precoce de dano tecidual periférico e inflamação (GUHRING *et al*., 2000; LIANG *et al*., 2017). Sobretudo, evidências demonstraram que há uma correlação entre a quantidade de NO e a severidade da sensação dolorosa em pacientes com dor crônica, que apresentaram aumento significativo de nitrito no líquido cefalorraquidiano e no plasma sanguíneo (KOCH *et al*, 2007).

A participação nitrérgica nesta lesão, sobretudo nestas regiões relacionadas ao processamento sensorial na medula, corrobora a dados na literatura que sugere que o NO desempenha importante papel na neurotransmissão da medula espinhal por diversas vias, incluindo a somatossensorial (SAITO et al., 1994). E ainda, que a expressão desta isoforma no tecido nervoso se dá em resposta a mediadores inflamatórios e pró-inflamatórios que atuam sobre macrófagos, astrócitos e micróglia. Portanto, reforçam a provável relação do NO e da reatividade glial identificado neste trabalho, ao que já tem sido descrito em estudos anteriores sobre a capacidade de indução da NOS2 em células gliais (FILHO, B. ZILBERSTEIN 2000; FREIRE et al., 2009; LEE et al., 2009)

Em nossos resultados, o fato da ativação de NOS e COX nas suas isoformas induzíveis ocorrer concomitante a expressão de IBA-1, ambas em 14 dias após a ruptura e predominantemente nos cornos dorsais, sugerem que elas podem estar sendo produzidas pelas micróglia, que neste caso estariam adotando um fenótipo pró inflamatório, e provavelmente induzindo hiper sensibilização de neurônios sensoriais. Porém, mais estudos precisam ser realizados para confirmar esta hipótese, uma vez que ainda não está claro quais fatores estariam induzindo a micróglia a adquirir tal estado frente a lesão do tendão, e como ela se correlaciona com dano tecidual e comprometimento sensorial/funcional.

Nesse sentido, a inibição da atividade da NOS2 juntamente com inibição da ativação microglial já tem sido sugerida como potencial alvo terapêutico por apresentar um papel neuroprotetor em algumas desordens neurológicas, incluindo a dor crônica e neuropática, investigadas em modelo animal (ZEMKE; MAJID, 2004).

Desse modo, destacamos que este estudo é pioneiro em relatar a ocorrência de resposta inflamatória no sistema nervoso central, em função de uma lesão de tendão. Ressaltamos a relevância desses achados para a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos nas tendinopatias, sobretudo a respeito da resposta central e sua provável correlação com alterações no processamento nociceptivo.

6. CONCLUSÃO

- ✓ A ruptura do Tendão de Aquiles induz ativação de astrócitos e micróglia no segmento lombar L5, associado a redução do limiar nociceptivo.
- ✓ O padrão de ativação de astrócitos e micróglia na medula é predominantemente ipsilateral à lesão do tendão de Aquiles em 7 e 14 dias após a ruptura.
- ✓ A ruptura tendínea é capaz de desencadear resposta inflamatória através da expressão de mediadores inflamatórios (COX2, NOS2) na medula espinhal.
- ✓ A ruptura do tendão de Aquiles resulta em aumento nos níveis de nitrito na medula espinhal (lombar) em 7 e 14 dias após a lesão.

REFERÊNCIAS

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.* 2009 11: 235-250.

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

ACKERMANN, P. W. **Neuronal regulation of tendon homeostasis.** *Int J Exp Pathol.* 2013;94(4):271-86.

ACKERMANN, P. W., FRANKLIN, S. L, DEAN, B. J, CARR, A. J., SALO, P. T., HART, D. A. **Neuronal pathways in tendon healing and tendinopathy--update.** *Front Biosci (Landmark Ed).* 2014; 1;19:1251-78.

ACKERMANN, P.W, LI, J., LUNDEBERG, T., KREICBERGS, A. **Neuronal plasticity in relation to nociception and healing of rat achilles tendon.** *J Orthop Res.* 2003;21(3):432-41.

ACKERMANN, P.W., AHMED, M., KREICBERGS A. Early nerve regeneration after achilles tendon rupture--a prerequisite for healing? A study in the rat. *J Orthop Res.* 2002 Jul;20(4):849-56

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

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

ANDERSSON, G., FORSGREN, S., SCOTT, A., GAIDA, J. E., STJERNFELDT, J. E., LORENTZON, R., ALFREDSON, H., BACKMAN, C., DANIELSON, P. **Tenocyte hypercellularity and vascular proliferation in a rabbit model of tendinopathy: contralateral effects suggest the involvement of central neuronal mechanisms.** *Br J Sports Med.* 2011;45(5):399-406.

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

BICAN O, MINAGAR A, PRUITT AA. **The spinal cord: a review of functional neuroanatomy.** *Neurol Clin.* 2013;31(1):1-18. doi:10.1016/j.ncl.2012.09.009

BJUR, D., ALFREDSON, H., FORSGRE, S. **The innervation pattern of the human Achilles tendon: studies of the normal and tendinosis tendon with markers for general and sensory innervation.** *Cell Tissue Res.* 2005;320(1):201-6.

BRESSAN, E., MITKOVSKI, M., TONUSSI, C.R. **LPS-induced knee-joint reactive arthritis and spinal cord glial activation were reduced after intrathecal thalidomide injection in rats.** *Life Sci.* 2010;87(15–16).

BRING, D. K., KREICBERGS, A., RENSTROM, P. A., ACKERMANN, P.W. **Physical activity modulates nerve plasticity and stimulates repair after Achilles tendon rupture.** *J Orthop Res.* 2007;25(2):164-72.

BUTOVSKY, O., WEINER, H. L. **Microglial signatures and their role in health and disease.** *Nat Rev Neurosci.* 2018;19(10):622-635.

CHAPLAN, S. R., BACH, F. W., POGREL, J. W., CHUNG, J. M., YAKSH, T. L. **Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw.** *J Neurosci Methods.* 1994;53(1):55-63.

CHEN, G., PARK, C.K., XIE, R., BERTA, T., NEDERGAARD, M., JI, R.R. **Connexin-43 induces chemokine release from spinal cord astrocytes to maintain late-phase neuropathic pain in mice.** *Brain.* 2014 Aug;137(Pt

8):2193-209. doi: 10.1093/brain/awu140. Epub 2014 Jun 11. PMID: 24919967; PMCID: PMC4107738.

CHRISTENSEN, J., ALFREDSON, H., ANDERSSON, G. **Protease-activated receptors in the Achilles tendon-a potential explanation for the excessive pain signalling in tendinopathy.** *Mol Pain.* 2015;17;11:13.

CLAYTON, R.A.E., COURT-BROWN, C.M. **The epidemiology of musculoskeletal tendinous and ligamentous injuries.** *Injury* 2008; 39(12): 1338-1344.

DARMANI, H., CROSSAN, J. C., CURTIS, A. **Single dose of inducible nitric oxide synthase inhibitor induces prolonged inflammatory cell accumulation and fibrosis around injured tendon and synovium.** *Mediators Inflamm.* 2004;13(3):157-64.

DE LUCA, C., SAVARESE, L., COLANGELO, A. M., BIANCO, M. R., CIRILLO, G., ALBERGHINA, L., PAPA, M. **Astrocytes and Microglia-Mediated Immune Response in Maladaptive Plasticity is Differently Modulated by NGF in the Ventral Horn of the Spinal Cord Following Peripheral Nerve Injury.** *Cell Mol Neurobiol.* 2016;36(1):37-46.

DOCKING, S., RIO, E., FORTINGTON, L., ORCHARD, J., COOK, J. **Prevalence and impact of achilles and patellar tendinopathy in the Australian Football League: The role of imaging in the diagnosis and prediction of symptoms.** *Jornal of science and medicine in sport* 2017. Vol.20.

DOCKING, S., RIO, E., FORTINGTON, L., ORCHARD, J.; COOK, J. **Prevalence and impact of achilles and patellar tendinopathy in the Australian Football League: The role of imaging in the diagnosis and prediction of symptoms.** *Journal of Science and Medicine in Sport.* 2017; 20, e106–e128.

DRAKE, R., VOGL, W., MITCHELL, A.W.M. **Gray's Anatomy for Students.** 2^o Ed. Inglaterra: Churchill Livingstone, 2010.

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

FISH, A. **Neuroanatomy: Draw It to Know It**. 2^oEd. Oxford: 2009).

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

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

GAJHEDE-KNUDSEN M, EKSTRAND J, MAGNUSSON H, MAFFULLI N. **Recurrence of Achilles tendon injuries in elite male football players is more common after early return to play: an 11-year follow-up of the UEFA Champions League injury study**. *Br J Sports Med*. 2013 Aug;47(12):763-8. Epub 2013 Jun 14. Erratum in: *Br J Sports Med*. 2013 Sep;47(13):856.

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

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

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

GÜHRING. H., GÖRIG, M., ATEŞ, M. ET AL. **Suppressed Injury-Induced Rise in Spinal Prostaglandin E₂ Production and Reduced Early Thermal Hyperalgesia in iNOS-Deficient Mice**. *J Neurosci*. 2000;20(17):6714-6720. doi:10.1523/jneurosci.20-17-06714.2000

HANISCH, U., KETTENMANN, H. **Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain**. *Nat Neurosci*. 2007;10(11):1387-1394. doi:10.1038/nn1997

HERVERA, A., NEGRETE, R., LEÁNEZ, S., MARTÍN-CAMPOS, J. M., POL, O. **The spinal cord expression of neuronal and inducible nitric oxide synthases and their contribution in the maintenance of neuropathic pain in mice.** PLoS One. 2010;13;5(12):e14321.

JÄRVINEN, T. A., KANNUS, P., MAFFULLI, N., KHAN, K. M. **Achilles tendon disorders: etiology and epidemiology.** Foot Ankle Clin. 2005;10(2):255-66.

JÄRVINEN, T.A.H., KANNUS, P., MAFFULLI, N., KHAN, K.M. **Achilles Tendon Disorders: Etiology and Epidemiology.** Foot Ankle Clin, 2005 N Am. 10: 255 – 266.

JI, R. R., CHAMESSIAN, A., ZHANG, Y. Q. **Pain regulation by non-neuronal cells and inflammation.** Science. 2016; 4;354(6312):572-577.

KANNUS, P. **Structure of the tendon connective tissue.** Scand J Med Sci Sports. 2000;10(6):312-20.

KHALID, S., TUBBS, R. S. **Neuroanatomy and Neuropsychology of Pain.** Cureus. 2017; 6;9(10):e1754.

KNAPIK JJ, POPE R. **Achilles Tendinopathy: Pathophysiology, Epidemiology, Diagnosis, Treatment, Prevention, and Screening.** Journal of Special Operations Medicine : a Peer Reviewed Journal for SOF Medical Professionals. Spring 2020;20(1):125-140. PMID: 32203618.

KOCH, A., ZACHAROWSKI, K., BOEHM, O., STEVENS, M., LIPFERT, P., VON GIESEN, H.-J., FREYNHAGEN, R.. **Nitric oxide and pro-inflammatory cytokines correlate with pain intensity in chronic pain patients.** *Inflammation Research*, 2007 56(1), 32–37. doi:10.1007/s00011-007-6088-4

LEE, J., RYU, H., KOWALL, N.W. **Differential regulation of neuronal and inducible nitric oxide synthase (NOS) in the spinal cord of mutant SOD1 (G93A) ALS mice.** 67 *Biochem Biophys Res Commun*. 2009; 387(1):202-206. doi:10.1016/j.bbrc.2009.07.007

LEPPILAHTI, J., PURANEN, J., ORAVA, S. **Incidence of Achilles tendon rupture.** Acta Orthop Scand. 1996; 67(3): 277-279.

LIAN, Ø., DAHL, J., ACKERMANN, P. W., FRIHAGEN, F., ENGBRETSSEN, L., BAHR, R. **Pronociceptive and antinociceptive neuromediators in patellar tendinopathy.** *Am J Sports Med.* 2006;34(11):1801-8.

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

LOESER, J. D., BONICA, J. J. **Bonica's management of pain.** 3^oEd. **Philadelphia:** Lippincott Williams & Wilkins, 2010

MANEGOLD, S., TSITSILONIS, S., GEHLEN, T., KOPF, S., DUDA, G. N., AGRES, N. A. **Alterations in structure of the muscle-tendon unit and gait pattern after percutaneous repair of Achilles tendon rupture with the Dresden instrument.** *Foot Ankle Surg.* 2019 Aug;25(4):529-533.

MCCLESKEY, E. W., GOLD, M. S. **Ion channels of nociception.** *Annu Rev Physiol.* 1999;61:835-56.

MENDES, Á., DE SOUSA G., FRANÇA M., DE CARVALHO C., BATISTA E., PASSOS, A., OLIVEIRA, K., HERCULANO A., DE MORAES, S. **Astrocyte reactivity in spinal cord and functional impairment after tendon injury in rats.** *Heliyon.* 2021 Apr 19;7(4):e06845. doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e06845.

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

MOLLOY, T. J, KEMP, M. W, WANG, Y., MURRELL, G. A. **Microarray analysis of the tendinopathic rat supraspinatus tendon: glutamate signaling and its potential role in tendon degeneration.** *J Appl Physiol* (1985). 2006;101(6):1702-9.

MORAES, S.A, OLIVEIRA, K.R., CRESPO-LÓPEZ, M.E., PICANÇO-DINIZ, D.L., HERCULANO, A.M. **Local NO synthase inhibition produces histological and functional recovery in Achilles tendon of rats after tenotomy: tendon repair**

and local NOS inhibition. *Cell and Tissue Research.* 2013 Sep;353(3):457-463. DOI: 10.1007/s00441-013-1662-2. PMID: 23839241.

MORAES, SAS. **Regeneração tendínea em modelo murino: Estudo da plasticidade central e investigação do efeito da modulação nitrérgica na plasticidade periférica.** Tese (doutorado em Neurociência e Biologia celular) – instituto de ciências biológicas da Universidade federal do Pará. Pará, 2015.

NAIK, A. K., TANDAN, S. K., KUMAR, D., DUDHGAONKAR, S. P. Nitric oxide and its modulators in chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats. *Eur J Pharmacol.* 2006. 530, 59-69

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

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

PADANILAM, T. G. **Chronic Achilles tendon ruptures.** *Foot Ankle Clin.* 2009;14(4):711-28.

PAREKH, S. G, WRAY, W. H, BRIMMO, O., SENNETT, B. J, WAPNER, K. L. **Epidemiology and outcomes of Achilles tendon ruptures in the National Football League.** *Foot Ankle Spec.* 2009 Dec;2(6):283-6.

PENG, J., GU, N., ZHOU, L., BEYO, U., MURUGAN, M., GAN, W. B., WU, L. J. **Microglia and monocytes synergistically promote the transition from acute to chronic pain after nerve injury.** *Nat Commun.* 2016. 28;7:12029.

PHILLIPS, L. H., PARK, T. S. **Electrophysiologic mapping of the segmental anatomy of the muscles of the lower extremity.** *Muscle Nerve.* 1991;14(12):1213-8.

PUFE, T., PETERSEN, W. J., MENTLEIN, R., TILLMANN, B. N. **The role of vasculature and angiogenesis for the pathogenesis of degenerative tendons disease.** *Scand J Med Sci Sports.* 2005;15(4):211-22.

PURVES, D., AUGUSTINE, G. J., FITZPATRICK, D. **Neuroscience**. 2^oEd. Sunderland: Sinauer, 2001.

REES, J. D., MAFFULLI, N., COOK, J. **Management of tendinopathy**. Am J Sports Med. 2009;37, 1855–1867.

RESNICK, D. K, NGUYEN, P., CECHVALA, C. F. **Regional and temporal changes in prostaglandin E2 and thromboxane B2 concentrations after spinal cord injury**. Spine L. 2001, Nov-Dec; 1(6):432-6.

RILEY, G. **Tendinopathy - From basic science to treatment**. Nat Clin Pract Rheumatol. 2009; 4, 82–89.

RILEY, G. **The pathogenesis of tendinopathy. A molecular perspective**. Rheumatology (Oxford). 2004;43(2):131-42.

ROMERO-SANDOVAL, A., CHAI, N., NUTILE-MCMENEMY, N., DELEO, J. A. **A comparison of spinal Iba1 and GFAP expression in rodent models of acute and chronic pain**. Brain Res. 2008,11;1219:116-26.

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

SAMAD, T. A., MOORE, K. A, SAPIRSTEIN, A., BILLET, S., ALLCHORNE, A., POOLE, S., BONVENTRE, J. V, WOOLF, C. J. **Interleukin-1beta-mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity**. Nature. 2001;22;410(6827):471-5.

SAMAD, T. A., MOORE, K. A., SAPIRSTEIN, A., BILLET, S., ALLCHORNE, A., POOLE, S., BONVENTRE, J. V., & WOOLF, C. J. **Interleukin-1beta-mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity**. *Nature* 2001, 410(6827), 471–475.

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

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

SHAMS, Z., KHALATBARY, A. R., AHMADVAND, H., ZARE, Z., KIAN, K. **Neuroprotective effects of hyperbaric oxygen (HBO) therapy on neuronal death induced by sciatic nerve transection in rat.** *BMC Neurol.* 2017; 16;17(1):220.

SHAN S., QI-LIANG M.Y., HONG C., TINGTING L., MEI H., HAILI P., YAN-QING W., ZHI-QI Z., YU-QIU Z. **Is functional state of spinal microglia involved in the anti-allodynic and anti-hyperalgesic effects of electroacupuncture in rat model of monoarthritis?** *Neurobiol. Dis.* 2007;26(3)

SILBERNAGEL, K. G., GUSTAVSSON, A., THOMEÉ, R., KARLSSON, J. **Evaluation of lower leg function in patients with Achilles tendinopathy.** *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2006;14(11):1207-17.

SOMINSKY, L., DE LUCA S., SPENCER, S. J. **Microglia: Key players in neurodevelopment and neuronal plasticity.** *Int J Biochem Cell Biol.* 2018;94:56-60.

SOUZA, M.; MORAES, S.A.S.; PAULA, D.R. de; MACIEL, A.A.; BATISTA, E.J.O.; SILVA, D.G.F.; BAHIA, C.P.; OLIVEIRA, K.R.H.M.; HERCULANO, A.M.. **Local treatment with ascorbic acid accelerates recovery of post-sutured Achilles tendon in male Wistar rats.** *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 2019 v. 52, n. 9, e8290, Aug.

Spine (Phila Pa 1976). 1983;8(6):616-24.

SUN S., CAO H., HAN M., LI T.T., ZHAO Z.Q., ZHANG Y.Q. **Evidence for suppression of electroacupuncture on spinal glial activation and behavioral hypersensitivity in a rat model of monoarthritis.** *Brain Res. Bull.* 2008;75(1)

SVEDMAN, S., JUTHBERG, R., EDMAN, G., ACKERMANN, P. W. **Reduced Time to Surgery Improves Patient-Reported Outcome After Achilles Tendon Rupture.** *Am J Sports Med.* 2009;46, 2929–2934.

TODD, A. **Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn.** *Nat Rev Neurosci* 11, 823–836 (2010). <https://doi.org/10.1038/nrn2947>

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

TSUDA, M. **Spinal dorsal horn astrocytes: New players in chronic itch.** *Allergol Int.* 2017;66(1):31-35.

VALLANCE, P. **Nitric oxide: therapeutic opportunities.** *Fundam Clin Pharmacol.* 2003;17(1):1-10.

VANE, J. R., BAKHLE, Y. S., BOTTING, R. M. **Cyclooxygenases 1 and 2.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1998;38:97-120.

VANEGAS, H., SCHAIBLE, H. G. **Prostaglandins and cyclooxygenases [correction of cyclooxygenases] in the spinal cord.** *Prog Neurobiol* 2001; 64(4):327-6

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

WANG, W., WANG, W., MEI, X., HUANG, J., WEI, Y., WANG, Y., WU, S., LI, Y. **Crosstalk between spinal astrocytes and neurons in nerve injury-induced neuropathic pain.** *PLoS One.* 2009;11;4(9):e6973.

XANTHOS, D. N., SANDKÜHLER, J. **Neurogenic neuroinflammation: inflammatory CNS reactions in response to neuronal activity.** *Nat Rev Neurosci.* 2014;15(1):43-53. doi: 10.1038/nrn3617.

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

XU, Y., MURRELL, G. A., **The basic science of tendinopathy.** *Clin Orthop Relat Res.* 2008 Jul;466(7):1528-38.

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

YANG, W., FAN, X. L., ZHANG, H., SONG, X. A. **Effects of hindlimb unloading and reloading on c-fos expression of spinal cord evoked by vibration of rat Achille tendon.** *Neurosci Lett.* 2008;4;439(1):1-6.

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

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

ZHOU, Y., LI, N., ZHU, L., LIN, Y., CHENG, H. **The microglial activation profile and associated factors after experimental spinal cord injury in rats.** *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2018;20; 14:2401-2413.